

112 E 1

9
2e1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA INMUNODEPRESION SOBRE EL
PROCESO DE DEGENERACION DE LA MEDULA
ESPINAL LESIONADA EXPERIMENTALMENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

JOSE **JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS**



MEXICO, D. F.

259648

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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

DOCTOR IGNACIO MADRAZO NAVARRO

Director Comité Científico

Centro de Investigación CAMINA A.C.

DOCTORA DOLORES CORREA BELTRAN

Directora de Investigación

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

DOCTORA KAETHE WILLMS MANNING

Jefe del Departamento de Microbiología e Inmunoparasitología

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

DOCTOR GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

Investigador Titular

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas

Instituto Mexicano del Seguro Social

DOCTOR ROBERTO KRETSCHMER SCHMID

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología

Instituto Mexicano del Seguro Social

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en forma importante a todos los que de alguna u otra forma me ofrecieron apoyo para la realización de esta tesis.

De manera especial a mis padres, cuyo ejemplo vivo en mi vida a sido lo más valioso que podría recibir.

A “el amor de mi vida”, mi compañera de siempre: Cecilia García, por todo el apoyo y comprensión que día con día siempre me ha entregado.

A mis hermanos, quienes siempre me han ofrecido apoyo y cariño incomparables.

A mis tutores, por su gran apoyo y por todos los conocimientos y consejos que siempre me ofrecieron.

A mis familiares y amigos por todo el apoyo recibido y por todos aquellos momentos de alegría que hemos compartido.

A mis alumnos: Alberto Mora, Judith Villegas y Alba Bercian por su colaboración en este trabajo.

Y claro, a ti DIOS por darme tanto en esta vida, por darme la oportunidad de poner al servicio de los demás mi trabajo científico; por darme la oportunidad de ayudar de alguna forma a aquellos, que no tienen la posibilidad de caminar; porque día a día me animas a seguir adelante y porque gracias a ti he aprendido que la ciencia debe estar siempre al servicio del hombre y no el hombre al servicio de la ciencia. Por todo, ¡GRACIAS SEÑOR!

*“La riqueza del científico no se encuentra en los premios que gane por sus descubrimientos;
sino en la satisfacción de haber generado el conocimiento que contribuyó a mejorar la
calidad de vida de su semejante”*

J. Antonio Ibarra

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	6
Aspectos fisiopatológicos de la lesión de la médula espinal	6
Aspectos inmunológicos de la lesión de la médula espinal	7
ASPECTOS GENERALES SOBRE MIELINIZACIÓN Y DESMIELINIZACIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL DE LA RATA.....	10
Mielinización	10
Desmielinización después de una lesión.....	11
INMUNIDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	12
Células presentadoras de antígenos en el SNC.....	13
Moléculas del MHC en el SNC	13
Antígenos menores de histocompatibilidad en el SNC	14
Drenaje linfático en el SNC.....	14
Barrera hematoencefálica	15
Respuesta humoral en el SNC	15
Respuesta celular en el SNC	16
INMUNOSUPRESIÓN.....	17
Corticosteroides, Azatioprina, Ciclofosfamida, Anticuerpos monoclonales	18
FK-506, Ácido micofenólico (RS-61446), Ciclosporina-A	19
GENERALIDADES SOBRE CICLOSPORINA-A	20
Absorción, Distribución	20
Biotransformación, Eliminación, Acciones inmunosupresoras.....	21
Efectos tóxicos, Métodos de análisis.....	22
Selección de la dosis, Biodisponibilidad	23
JUSTIFICACIÓN	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Diseño experimental	28
Descripción de técnicas.....	31

Método estadístico	50
Consideraciones éticas	51
RESULTADOS	52
Análisis estadístico	52
Evaluación de la inmunosupresión	52
Respuesta celular específica	58
Análisis morfométrico	62
Evaluación clínica	75
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS A FUTURO	87
BIBLIOGRAFÍA	88

RESUMEN

Aunque los resultados de algunos estudios sugieren la participación del sistema inmunológico como factor inhibidor de la regeneración y promotor de un mayor daño en la médula espinal (ME), actualmente, existe aún controversia al respecto. A la fecha, no se ha demostrado en forma precisa y reproducible la existencia de una respuesta autoinmune contra los constituyentes de la ME después de una lesión traumática (LTME). Por otra parte, tampoco se ha demostrado el efecto que pueda tener un tratamiento inmunosupresor sobre dicha respuesta y sobre los cambios morfofuncionales de animales con LTME. Los objetivos de este trabajo fueron para identificar una respuesta celular específica contra constituyentes de la ME en modelos con LTME. Posteriormente, se procedió a determinar el efecto de la inmunosupresión sobre la respuesta celular específica y sobre los cambios morfofuncionales de animales con LTME. Para tal efecto se utilizaron ratas hembras de la cepa Fischer 344, adultas. Dos grupos experimentales fueron sometidos a una lesión por compresión de la ME y 2 testigo fueron sometidos sólo al procedimiento quirúrgico (PQ) sin lesionar la ME. Uno de los grupos experimentales y otro de los testigo, recibieron un tratamiento con ciclosporina-A (CsA) durante todo el seguimiento bajo un esquema preestablecido, mientras que los animales de los grupos restantes recibieron solo el vehículo de la CsA bajo el mismo esquema. En todos los grupos se realizaron estudios de: proliferación de linfocitos a un extracto crudo de médula espinal, morfometría del tejido medular preservado después de la LTME o PQ, determinación morfométrica del índice de mielinización de los axones en el epicentro de la lesión y evaluación clínica. Todas las evaluaciones se realizaron a los 15, 45 y 90 días después de la LTME o PQ. Se identificó una respuesta celular específica contra constituyentes de la médula espinal en los animales con LTME sin tratamiento con CsA sobre todo a los 15 y 45 días, aunque no se observó a los 90 días poslesión. Dicha respuesta no fue identificada en los animales con LTME y tratamiento con CsA y tampoco en las ratas de los grupos testigo (sin LTME). Por otra parte los animales con LTME tratados con CsA presentaron una mayor preservación del tejido medular en la zona de lesión con respecto a las ratas con LTME no tratadas, más aún, en los estudios morfométricos dirigidos a evaluar el índice de mielinización de

los axones en la zona del epicentro, los animales lesionados que recibieron CsA, presentaron una menor desmielinización y una mayor remielinización, durante el seguimiento, datos que fueron significativamente diferentes a los de las ratas lesionadas sin tratamiento con CsA. Por otro lado, al realizar el análisis del diámetro axonal, se observó una cantidad de colaterales axónicas (axones con diámetro menor a $0.5\mu\text{m}$) que fue significativamente mayor en los animales lesionados que recibieron CsA con respecto a los lesionados sin tratamiento. Finalmente, las pruebas de evaluación clínica, demostraron una recuperación de la función motora que fue significativamente mayor en los animales lesionados con tratamiento inmunosupresor con respecto a los lesionados no inmunosuprimidos. Estos resultados demuestran la existencia de una respuesta celular específica contra constituyentes de la médula espinal después de una LTME, dicha respuesta puede ser inhibida al proporcionar un tratamiento con CsA. Además sugieren, que la inmunosupresión disminuye la desmielinización, incrementa la remielinización y promueve el número de colaterales axónicas.

ABSTRACT

Although some studies have suggested a role of the immune system on spinal cord (SC) regeneration inhibition and neural tissue damage after injury, there is still a great controversy about this matter. Neither the presence of an autoimmune response against SC constituents, nor a positive effect of immunosuppressive therapy on such autoimmune response after injury has been demonstrated. In order to identify a specific lymphocyte response against SC constituents after injury and to evaluate the effect of immunosuppression on such specific lymphocyte response as well as on morphological and clinical aspects of SC injured animals, four groups of Fischer 344 female adult rats were studied. Two groups (experimental groups) were subjected to SC compression, while another 2 (control groups) were subjected only to laminectomy without compression. Animals of one experimental and one control groups, received cyclosporin-A (CsA) therapy, while rats of the other two groups received the CsA vehicle only. In all the groups, studies of lymphocyte proliferation against a crude SC extract, morphometric analysis of SC tissue preservation after injury, morphometric analysis of the myelination index of preserved axons at the epicenter of the lesion and clinical evaluation were performed. All studies were done at 15, 45 and 90 days after SC injury or laminectomy. A specific lymphocyte response against SC antigens was found in untreated SC injured rats. This response was observed at 15 and 45 but not at 90 days after SC compression. SC injured animals with CsA treatment and control groups, did not respond to SC antigens. On the other hand, SC injured rats treated with CsA, exhibited a better preservation of SC tissue in comparison with untreated animals. The myelination index showed a higher number of myelinated axons and a lower number of demyelinated axons from 15 to 90 days after lesion in the SC injured rats with CsA treatment, as compared to untreated animals. Furthermore, SC injured animals with CsA treatment, had a significant increase in the number of axonal fibers of 0.5 μm or smaller diameter between 45 to 90 days after lesion (these could be newly formed collateral axons). Finally, the clinical evaluation demonstrated a significant improvement of motor recovery of the SC injured rats treated with CsA, when compared to the untreated group. These results demonstrate the existence of an immune response against SC constituents after injury, which can be inhibited by cyclosporin-A treatment. Furthermore, it is suggested that CsA treatment, diminishes the demyelination process, promotes better remyelination and plasticity phenomena and increases clinical improvement of SC injured rats.

INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) en los seres humanos suele dejar graves secuelas neurológicas; no solo se asocia con paraplejía sino que también involucra la alteración de varias funciones somáticas y autonómicas (Das y cols. 1989), originando una serie de alteraciones a nivel sistémico que rompen con la homeostasis del organismo. Después de producirse una lesión medular mecánica (lesión primaria), en adición al daño traumático *per se*, se desencadena una cascada de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que contribuyen a una mayor destrucción del parénquima medular. Finalmente, persiste un proceso neurodegenerativo crónico, con la posible participación de una respuesta de tipo autoinmune (Goodkin y Campbell 1969, Lemke y cols. 1987). En esta tesis se analizará la presencia de una respuesta celular específica contra constituyentes de la ME y se evaluará el efecto de la inmunosupresión sobre la preservación del tejido medular, la desmielinización axonal, la formación de colaterales axónicas y sobre la recuperación clínica de animales con LTME.

ANTECEDENTES

Aspectos Fisiopatológicos 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, con el 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 (Feringa y cols. 1983; Feringa y cols. 1988; Goodkin y Campbell JB 1969).

El periodo de latencia relativamente largo entre el momento de la lesión y el desarrollo de necrosis máxima, permite diferenciar los eventos de la LTME en "primarios" y "secundarios". Los eventos primarios son el resultado directo del trauma inicial y varían de acuerdo al tipo e intensidad del mismo, mientras que la lesión secundaria es la producida por una secuencia de eventos deletéreos

que siguen a la lesión primaria y que conllevan a un grado mucho mayor de necrosis parenquimal (Goodkin y Campbell JB 1969; Kao y cols. 1977)

Diferentes grupos de investigadores han generado datos que sugieren diversos mecanismos "secundarios" como responsables del daño final en la LTME, entre los que se pueden mencionar la desregulación iónica, la producción de radicales libres y peroxidación de lípidos, la isquemia, la liberación de enzimas líticas, la acidosis y la liberación de neurotransmisores con efecto tóxico (Lemke y cols. 1987; Faden y Simon 1988; Hall y cols. 1989; Balentine y cols. 1978.). Entre toda esta serie de fenómenos autodestructivos, la respuesta inflamatoria juega un papel muy importante ya que muchas de las células inflamatorias permanecen en el sitio de la lesión mucho tiempo después de haber ingerido productos de degeneración: siete días después de la lesión, los macrófagos constituyen el 30% del volumen del área lesionada (Blight 1985). Estos macrófagos activados secretan una gran cantidad de sustancias dañinas algunas de las cuales están involucradas en la desmielinización de origen autoinmune (Blight 1985). Finalmente, persiste un proceso tardío, denominado neurodegenerativo crónico, con la posible participación de una respuesta deleterea autoinmune de tipo específico (Mizrachi y cols 1983, Palladini y cols. 1987).

Aspectos Inmunológicos de la lesión traumática de la médula espinal

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

1. Los axones centrales no se regeneran porque son incapaces de penetrar la cicatriz glial y la colágena producida en el sitio de lesión.
2. El SNC de mamíferos adultos carece de células gliales indiferenciadas por lo cual no existe un sustrato para el crecimiento axonal.
3. Existe un mecanismo inhibitor de sustratos en el SNC adulto (materia blanca), originado por la unión de proteínas de superficie en la membrana de oligodendrocitos, así como en sus productos mielínicos.

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

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

Durante el desarrollo embrionario los vasos sanguíneos del SNC adquieren una característica diferente a los del resto del organismo: se forma la barrera hematoencefálica (BHE) que impide a las células del SI reconocer como propios a muchos de los antígenos neurales (Lampson 1987). Tradicionalmente se ha considerado al SNC como inmunológicamente privilegiado y existen hallazgos clínicos que apoyan esta idea tales como el patrón de crecimiento poco usual de los virus, el crecimiento agresivo de los tumores neurales y la viabilidad prolongada de los trasplantes neurales (Lampson 1987). Dicho privilegio inmunológico se ha atribuido al SNC por: 1. La existencia de la BHE que por las uniones fuertes existentes entre las células endoteliales y las prolongaciones astrocíticas impiden el paso de inmunoglobulinas, inmunomoduladores de gran tamaño y células inmunocompetentes en general (Rapaport 1976). 2. El SNC carece de un drenaje linfático convencional por lo que, se supone, está impedido el transporte de los antígenos neurales a los órganos linfoides. 3. En condiciones normales las células neurales (neuronas y células gliales) aparentemente no expresan moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, de las siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) clase I y clase II, de tal forma que, las células neurales en cierto modo quedan protegidas de la respuesta inmunológica celular (RIC) de tipo celular (Wekerle y cols. 1986). Los conceptos antes mencionados no son absolutos, ya que por ejemplo, la BHE deja algunas áreas libres en los órganos periventriculares, los antígenos pueden ser acarreados a los órganos linfoides a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) y las moléculas del MHC pueden expresarse en células neurales bajo

condiciones especiales por ejemplo cuando entran en contacto con interferón gamma (Berry 1974, Cotman 1987, Nicholas y Arnason 1989, Willenborg y cols. 1977).

Barker y Billingham (1977) analizaron el privilegio inmunológico de la cámara anterior del ojo y afirmaron que a pesar de tener una gran cantidad de vasos linfáticos a nivel corneal, capaces de iniciar una sensibilización inmunológica, los trasplantes no son rechazados. Estos autores afirmaron que este fenómeno se explicaba por la ausencia de vasos sanguíneos en dicha región, de tal manera que las células inmunológicas sensibilizadas no podrían llegar al tejido trasplantado. En forma contraria, el SNC carece de tejido linfático convencional pero cuenta con abundantes vasos sanguíneos, de tal manera que, al llevarse a cabo la sensibilización inmunológica (fenómeno que en la actualidad se ha demostrado que puede llevarse a cabo) (Bradbury y Westrop 1983, Bradbury 1990) existe una rama aferente al SNC. Medawar por otra parte (Nicholas y Arnason 1989, Medawar 1948) demostró en conejos que un trasplante en el SNC es rechazado más rápidamente cuando el animal es sensibilizado previamente con un injerto de piel del mismo donador del futuro trasplante en el SNC, en comparación con el rechazo tardío de un injerto al SNC de un animal no sensibilizado. Las células inmunológicas del conejo sensibilizado fueron capaces de infiltrar y destruir el trasplante en el SNC.

Después de una lesión del SNC, puede desencadenarse una respuesta autoinmune contra los componentes normales del tejido nervioso. Uno de los primeros eventos es la ruptura de la BHE, lo que permite un estrecho contacto entre el SI y el SNC. Los astrocitos, las células del endotelio vascular, las células de la microglia e incluso los oligodendrocitos, expresan moléculas del MHC y algunas de estas células pueden ser capaces de presentar antígenos a linfocitos T activados, por lo que se consideran bajo estas condiciones células coadyuvantes del SI (Fabry y cols. 1994). La respuesta inmune humoral también participa en el daño al SNC, se han detectado autoanticuerpos contra antígenos del SNC en el suero de pacientes a diferentes tiempos después de una LTME (Mizrachi y cols. 1983). Por otro lado las células cebadas y los macrófagos activados reclutados en la zona de lesión, secretan proteasas mielinolíticas que contribuyen de manera importante a la desmielinización (Blight 1985; Willenborg y cols. 1977). Probablemente algunos o todos los

fenómenos inmunológicos antes descritos pueden estar participando en el proceso degenerativo progresivo observado en los estadios tardíos a la LTME.

ASPECTOS GENERALES SOBRE MIELINIZACIÓN Y DESMIELINIZACIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL DE LA RATA

Mielinización

La mielina es una membrana rica en lípidos ya que en un 80% esta constituida por lípidos (colesterol, cerebrósido, etanolamina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina) y solo en un 20% por proteínas (proteína básica de la mielina (MBP), proteínas proteolipídicas, proteínas Wolfgram y la glucoproteína asociada a la mielina (MAG)).

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

La mielinización en el SNC esta a cargo de los oligodendrocitos mientras que en el sistema nervioso periférico se lleva a cabo por parte de las células de Schwann. En el SNC, la mielinogénesis se inicia en la rata aproximadamente 10 días después del nacimiento y se completa a los 30 días de vida (Stoffel 1990).

La mielinización de la ME sigue una dirección rostro-caudal (Schwab y Schnell 1989) y generalmente el orden en el que los tractos aparecen durante el desarrollo es el orden que siguen para su mielinización. La mielinización inicia en los axones que posteriormente van a ser de gran calibre y se extiende mas tarde a aquellos que cada vez van teniendo menor diámetro. La mayoría de estos axones son mielinizados cuando alcanzan diámetros de 1 a 1.5µm. Los axones que en estadios posteriores, van a tener un gran calibre, presentan un aumento considerable en sus diámetros, mientras son amielínicos, y pueden incrementarse de 5 a 10 veces más cuando son mielinizados, mientras que las pequeñas fibras mielínicas que solo se ven en estadios mas avanzados

de maduración, parecen crecer muy poco antes de ser mielinizadas y permanecen pequeñas aún después de la mielinización (Mattews y Duncan 1972).

Morfometría de la mielinización

En los tractos del SNC las fibras amialínicas son pequeñas al principio y relativamente uniformes en su calibre. Posteriormente algunas de estas fibras comienzan a crecer y presentan variaciones de 0.1 a 1.5 μm en su diámetro. (Mattews 1968). No se ha descrito en el SNC un diámetro axonal crítico por arriba del cual todos los axones son mielínicos o por abajo del cual éstos sean amielínicos. Por lo general, los axones pequeños de 0.2 a 0.4 μm son mielinizados.

La velocidad de conducción de los potenciales de acción en sus fibras, es proporcional al diámetro del axon y se incrementa notablemente con la mielinización, de tal forma que en una fibra mielinizada, la transmisión ocurre 100 veces más rápido que en ausencia de mielina (Stoffel 1990).

En mamíferos adultos se ha observado una correlación directa entre el espesor de la mielina y el diámetro axonal (Williams y Wendell-Smith 1971). Al parecer, el diámetro del axón es el que determina la presencia y el espesor de la mielina (Waxman y Sims 1984).

El índice de mielinización (IM) o radio "g" (Blight y Young 1989) se emplea para establecer el espesor relativo de la vaina de mielina. Mientras más pequeño sea el IM, la vaina de mielina será más gruesa, es decir un axón mielinizado presentará índices inferiores a la unidad y uno amielínico tendrá un IM igual a 1. (Guy y cols. 1989). El IM óptimo para que exista una adecuada propagación del impulso nervioso oscila entre 0.60 y 0.80, con variaciones específicas entre las diferentes especies y entre distintas estructuras de la misma especie (Williams y Chalupa 1983).

Desmielinización después de una lesión en la médula espinal

Una lesión en la ME produce la destrucción de axones y mielina, lo que puede determinar disfunción motora, sensitiva y autonómica (Banik y cols. 1986).

Después de una contusión, el daño a la mielina se observa durante las primeras 4 horas (Dohrmann 1972). Veintiún horas después de la lesión, se observa desmielinización, misma que se incrementa entre el segundo y el séptimo día debido a la fagocitosis de las vainas dañadas (Gledhill y cols. 1973; Blight 1985). Los axones que sobreviven a este tipo de lesión se concentran en un anillo externo y aparentemente tienen vainas de mielina intactas (Blight 1985).

En el sitio de la lesión se observa una pérdida global de axones. Entre el segundo y el séptimo día de la lesión existe una pérdida secundaria de axones (Blight y Young 1989) y otra adicional se puede observar a los 3 meses (Blight 1985). El total de axones perdidos es extenso, comprende entre el 87 y 99 % de las fibras mielinizadas (Blight y Young 1989). Gran parte de las fibras que permanecen con continuidad anatómica se desmielinizan en el sitio de la lesión en el transcurso de la primera semana (Blight 1985).

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

INMUNIDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los factores que participan en la RI del SNC se agrupan en componentes de la vía aferente (reconocimiento del antígeno) y componentes de la vía eferente (destrucción del antígeno). Las células presentadoras de antígenos (CPA) y el drenaje linfático del SNC a los órganos linfoides constituyen los componentes de la vía aferente, mientras que los linfocitos activados, las células NK (del inglés Natural Killer) y LAK (del inglés leukocyte activating killer cells) así como los anticuerpos secretados constituyen los componentes de la vía eferente.

Después de una contusión, el daño a la mielina se observa durante las primeras 4 horas (Dohrmann 1972). Veintiún horas después de la lesión, se observa desmielinización, misma que se incrementa entre el segundo y el séptimo día debido a la fagocitosis de las vainas dañadas (Gledhill y cols. 1973; Blight 1985). Los axones que sobreviven a este tipo de lesión se concentran en un anillo externo y aparentemente tienen vainas de mielina intactas (Blight 1985).

En el sitio de la lesión se observa una pérdida global de axones. Entre el segundo y el séptimo día de la lesión existe una pérdida secundaria de axones (Blight y Young 1989) y otra adicional se puede observar a los 3 meses (Blight 1985). El total de axones perdidos es extenso, comprende entre el 87 y 99 % de las fibras mielinizadas (Blight y Young 1989). Gran parte de las fibras que permanecen con continuidad anatómica se desmielinizan en el sitio de la lesión en el transcurso de la primera semana (Blight 1985).

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

INMUNIDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los factores que participan en la RI del SNC se agrupan en componentes de la vía aferente (reconocimiento del antígeno) y componentes de la vía eferente (destrucción del antígeno). Las células presentadoras de antígenos (CPA) y el drenaje linfático del SNC a los órganos linfoides constituyen los componentes de la vía aferente, mientras que los linfocitos activados, las células NK (del inglés Natural Killer) y LAK (del inglés leukocyte activating killer cells) así como los anticuerpos secretados constituyen los componentes de la vía eferente.

Células presentadoras de antígenos en el SNC.

Las células presentadoras de antígenos (CPA) clásicas (células dendríticas) que residen en casi todos los tejidos del organismo están ausentes en el SNC. Sin embargo existen células que expresan moléculas del MHC y pueden funcionar como CPA (Fontana y cols. 1987, Streit y Graeber 1988); dichas células son conocidas como células de la microglia, mismas que se consideran macrófagos residentes del SNC. Además existe evidencia de que otras células como los astrocitos, también son capaces de expresar MHC clase I y clase II, siendo capaces de funcionar como CPA (Fontana y cols. 1984, Fabry y cols. 1994). Así también los oligodendrocitos (Ting y cols. 1981, Fabry y cols. 1994), las células del endotelio vascular (Sloan y cols 1991, McCarron y cols. 1991, Fabry y cols. 1994) y los pericitos (Fabry y cols. 1994) son capaces de expresar moléculas del MHC y convertirse en CPA. Finalmente, en regiones periventriculares, leptomeninges y plexo coroideo de cerebro humano normal se han localizado poblaciones de células mononucleares con receptores para la región Fc de las IgG (R Fc IgG), mismos que presentan una actividad muy similar a la presentada por los R Fc IgG de los monocitos y macrófagos de sangre periférica (Peress y cols. 1989).

Moléculas del MHC en el SNC

En el ser humano la regulación de la expresión de moléculas clase I y clase II es compleja, puede estar afectada por la edad, la anatomía regional y por lesiones locales o remotas. Estas moléculas pueden influir en patrones y grados de RI mediada por linfocitos T (Sobel y Ames 1988) y pueden identificarse también en placas de esclerosis múltiple y en la vecindad de ciertos tumores neurales (Lampson 1987).

En condiciones normales sólo algunas células del SNC expresan pequeñas concentraciones de moléculas del MHC. La expresión de dichas moléculas en el SNC no es constitutiva, sino más bien inducida (Fabry y cols. 1994). Algunos estudios han demostrado que varias células del SNC (microglia, células endoteliales, astrocitos, pericitos e incluso oligodendrocitos) (Fabry y cols. 1994, Konno y cols. 1989, Massa 1987, Wekerle y cols. 1986, Fontana y cols. 1984, MacCarron

y cols 1991, Ting y cols. 1981) así como células del plexo coroideo y leptomeninges también son capaces de expresar moléculas del MHC.

Antígenos menores de histocompatibilidad en el SNC

Los antígenos menores de histocompatibilidad se expresan en un gran número de tejidos y pueden ser específicos de tejidos. Su expresión puede llevarse a cabo en coordinación con las moléculas del MHC. En las células neurales se ha observado la expresión de antígenos como el Skn-1 y el H-Y (Steinmuller 1983) pero hasta el momento no existen datos que determinen si estos antígenos son capaces de inducir una respuesta autoinmune después de una lesión al SNC, aunque si existen datos que demuestran su capacidad antigénica cuando son trasplantados (Nicholas y Arnason 1989).

Drenaje linfático en el SNC

No existen vasos linfáticos convencionales en el parénquima del SNC (Yoffey y Courtice 1970), sin embargo no es posible concluir que no exista paso de líquidos o partículas del parénquima del SNC al sistema linfático. Si se inyecta material macromolecular radioactivo en el núcleo caudado de conejos, el 50% de la marca radioactiva es recuperada en los ganglios linfáticos cervicales (Bradbury y Westrop 1983). Se han realizado estudios similares en otras especies y también se ha encontrado marca radioactiva en los ganglios linfáticos cervicales (Bradbury 1990). Estos hallazgos indican que existe una vía por la cual se comunica el SNC con el sistema linfático. En roedores existen dos rutas de drenaje del LCR: a través de las vellosidades aracnoideas y a través de la lámina cribiforme. Con respecto a esta última, existen estudios ultraestructurales que indican que a nivel de la mucosa nasal existen numerosos espacios similares a capilares linfáticos terminales (Erlich y cols. 1986). En reacciones inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple en el ser humano, se ha descrito que los espacios perivasculares se transforman en tejido linfático (Prineas 1989). Además, en condiciones normales, se sabe que una gran proporción de LCR drena directamente del espacio subaracnoideo a la circulación venosa a través de la vellosidades

aracnoideas y más aún, pequeñas cantidades de LCR pueden llegar al sistema linfático a través de la raíz de los nervios espinales y nervios ópticos.

La barrera hematoencefálica

En condiciones normales la BHE impide el paso de las células del SI al SNC, sin embargo se ha demostrado que los linfocitos activados, independientemente de su especificidad antigénica en condiciones fisiológicas son capaces de atravesar la BHE (Wekerle y cols. 1986). Bajo ciertas condiciones, las células del endotelio vascular en el SNC, son capaces de expresar moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) que facilitan el ingreso de los linfocitos T al SNC; así mismo, son capaces al igual que los astrocitos, los pericitos y las células de la microglia, de expresar MHC clase II y funcionar como CPA (Wekerle y cols. 1986). Por otra parte, existen áreas libres de BHE a nivel de los órganos periventriculares (Lampson 1987). Finalmente, en enfermedades neurológicas se puede inducir la producción de inmunoglobulinas dentro del SNC (Sharief y cols. 1990).

Respuesta humoral en el SNC

En el SNC pueden llevarse a cabo reacciones inmunológicas, entre ellas la activación y proliferación de linfocitos T; por lo tanto es factible también la activación de linfocitos B y con ello la formación de anticuerpos específicos. Los anticuerpos son producidos por las células plasmáticas, mismas que son el resultado de la diferenciación de los linfocitos B. Los linfocitos B, al igual que los linfocitos T, tienen la capacidad de adherirse al endotelio vascular de los vasos sanguíneos en el SNC (Pryce y cols. 1991) y de atravesar la BHE por medio de diapedesis e ingresar al parénquima del SNC (Guizar-Sahagún y cols. 1994). Algunos estudios han demostrado la participación de los anticuerpos en enfermedades desmielinizantes como la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y la esclerosis múltiple (Bernheimer y cols. 1988, Link y cols. 1990), e inclusive se han identificado los epitopos en la MBP, contra los que está dirigida la respuesta humoral (Hashim y Day 1988). Por otra parte es necesario mencionar también que se ha

demostrado la presencia de algunas proteínas del complemento en el SNC (Rodríguez y cols. 1990) lo que permite la activación de vías efectoras mediadas por anticuerpos.

Respuesta celular en el SNC

En condiciones normales un número pequeño de linfocitos T CD4+ "vigilan" el SNC. Dichos linfocitos tienen la capacidad de adherirse en forma inespecífica a las células endoteliales para posteriormente atravesar la BHE y migrar al SNC (Steinman 1990). Al parecer los linfocitos T durante su activación adquieren una serie de enzimas y receptores que les ayudan a abrir y atravesar las uniones cerradas entre las células endoteliales (Wekerle y cols. 1986); así una célula T activada, puede atravesar la BHE (Cross y cols. 1990, Steinman 1990). En las células endoteliales de los vasos del SNC pueden expresarse moléculas de adhesión como la ICAM-1 y la VCAM-1 por la acción de citocinas como el interferón gamma, la interleucina- 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) ((Cross y cols. 1990, Steinman 1990) y funcionar como medio de adhesión entre la célula endotelial y el linfocito, a través de los receptores LFA-1 y VLA-4 de este último. Esta adhesión podría facilitar el paso del linfocito a través del endotelio vascular al parénquima del SNC (Pryce y cols. 1991), constituyendo la principal ruta de migración del linfocito al SNC, pero no la única, pues también se sabe que los linfocitos T CD4+ pueden interactuar con las células endoteliales a través de las moléculas del MHC clase II y dicha interacción puede facilitar también la migración de estas células al SNC (McCarron y cols. 1991). Por otra parte, las diferentes poblaciones de linfocitos T se adhieren en forma distinta al endotelio vascular cerebral, por ejemplo, los CD8+ se adhieren más que los CD4+ (Pryce y cols. 1991), pero una vez que los linfocitos ingresan al SNC, presentan propiedades inmunoregulatorias y fenotípicas comparables a las presentadas por los linfocitos de sangre periférica (Freedman y cols. 1990). Algunos estudios realizados en modelos experimentales de EAE han demostrado que los linfocitos T sensibilizados contra antígenos neurales son altamente específicos a una porción peptídica dominante localizada en la secuencia 86-105 y 152-170 de la proteína básica de la mielina (PBM) (Chou y cols. 1989, Richert y cols. 1989).

Con lo mencionado hasta el momento, se puede concluir que el supuesto "privilegio inmunológico" del SNC no es absoluto, que en condiciones patológicas como neoplasias, enfermedades autoinmunes, intervenciones quirúrgicas, lesiones traumáticas etc., puede desarrollarse una RI. En un estudio reciente Popovich (Popovich y cols. 1996) identificó una respuesta celular contra antígenos neurales en ratas con lesión de la médula espinal. Otros autores (Iumashev y cols. 1991; Taranova y cols. 1992) han realizado estudios en pacientes con LTME y sus resultados también apoyan la existencia de una RI contra antígenos neurales. Sin embargo, hasta el momento, existe aun gran controversia en relación con dicha respuesta ya que estudios previos no lograron demostrar una RI específica contra antígenos neurales después de una lesión (Willenborg y cols. 1977). Así pues, sería muy importante demostrar la existencia de dicha respuesta después de LTME ya que, en caso de existir, el SI puede estar funcionando como un factor que aumente la destrucción del tejido neural al atacar a las células neurales. En caso de demostrar la existencia de una RI inducida por antígenos neurales, sería muy interesante, demostrar que la administración de un inmunosupresor es capaz de inhibir la RI con ello, disminuir el daño al tejido neural.

INMUNOSUPRESIÓN

A partir de la década de los 50s se empezaron a ensayar diferentes tipos de inmunosupresión, entre ellos la irradiación corporal total (Dempster y cols. 1950, Lindsley y cols. 1955) o el uso de fármacos como los corticosteroides (Billingham y cols. 1951), la 6-mercaptopurina, (Calne 1960) azatioprina y la ciclofosfamida (Starzl 1990). Algunos de estos fármacos en su momento fueron útiles, pero dejaron de ser utilizados por su alta toxicidad. Se utilizó la globulina antilinfocítica (Starzl y cols. 1967), misma que tuvo que administrarse en combinación con los fármacos anteriores para obtener mejores resultados. A partir de 1980 se empezó a hacer uso de inmunosupresores con una menor citotoxicidad y una mayor selectividad por células del SI. La ciclosporina A (CsA) y el FK506 son fármacos que inhiben en forma selectiva la proliferación de los linfocitos T CD4⁺; siendo la CsA la más utilizada actualmente (Kahan 1989). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores específicos en los linfocitos T CD4⁺ también podrían

Con lo mencionado hasta el momento, se puede concluir que el supuesto "privilegio inmunológico" del SNC no es absoluto, que en condiciones patológicas como neoplasias, enfermedades autoinmunes, intervenciones quirúrgicas, lesiones traumáticas etc., puede desarrollarse una RI. En un estudio reciente Popovich (Popovich y cols. 1996) identificó una respuesta celular contra antígenos neurales en ratas con lesión de la médula espinal. Otros autores (Iumashev y cols. 1991; Taranova y cols. 1992) han realizado estudios en pacientes con LTME y sus resultados también apoyan la existencia de una RI contra antígenos neurales. Sin embargo, hasta el momento, existe aun gran controversia en relación con dicha respuesta ya que estudios previos no lograron demostrar una RI específica contra antígenos neurales después de una lesión (Willenborg y cols. 1977). Así pues, sería muy importante demostrar la existencia de dicha respuesta después de LTME ya que, en caso de existir, el SI puede estar funcionando como un factor que aumente la destrucción del tejido neural al atacar a las células neurales. En caso de demostrar la existencia de una RI inducida por antígenos neurales, sería muy interesante, demostrar que la administración de un inmunosupresor es capaz de inhibir la RI con ello, disminuir el daño al tejido neural.

INMUNOSUPRESIÓN

A partir de la década de los 50s se empezaron a ensayar diferentes tipos de inmunosupresión, entre ellos la irradiación corporal total (Dempster y cols. 1950, Lindsley y cols. 1955) o el uso de fármacos como los corticosteroides (Billingham y cols. 1951), la 6-mercaptopurina (Calne 1960) azatioprina y la ciclofosfamida (Starzl 1990). Algunos de estos fármacos en su momento fueron útiles, pero dejaron de ser utilizados por su alta toxicidad. Se utilizó la globulina antilinfocítica (Starzl y cols. 1967), misma que tuvo que administrarse en combinación con los fármacos anteriores para obtener mejores resultados. A partir de 1980 se empezó a hacer uso de inmunosupresores con una menor citotoxicidad y una mayor selectividad por células del SI. La ciclosporina A (CsA) y el FK506 son fármacos que inhiben en forma selectiva la proliferación de los linfocitos T CD4+, siendo la CsA la más utilizada actualmente (Kahan 1989). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores específicos en los linfocitos T CD4+ también podrían

ofrecer grandes ventajas como parte de un esquema inmunosupresor y por ello actualmente también son objeto de estudio (Starzl 1990).

Corticosteroides

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

Azatioprina

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

Ciclofosfamida

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

Anticuerpos monoclonales

Los linfocitos T para ser activados requieren de la interacción de sus moléculas CD4 o CD8 (cooperadores y citotóxicos respectivamente) y su receptor para linfocitos T (RLT), con sus respectivas moléculas en las células presentadoras de antígenos. Algunos estudios han demostrado que la inyección de anticuerpos monoclonales anti-CD4 a ratones trasplantados, produce tolerancia y una gran sobrevida del trasplante (Sloan y cols. 1991). Otro sitio posible de acción de los anticuerpos es el RLT y el receptor de IL-2 en el linfocito. La administración de anticuerpos contra dichos receptores también ha demostrado que prolonga la sobrevida de los trasplantes al inhibir la activación del linfocito (Starzl 1990).

FK 506

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

Ácido micofenólico (RS-61443)

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

Ciclosporina A

Actualmente es el fármaco más utilizado y que da los mejores resultados en relación a la prolongación de la supervivencia de un trasplante. La CsA es un polipéptido neutral, cíclico lipofílico de 11 aminoácidos y con peso molecular de 1,202 daltones. A bajas concentraciones ($< 10 \mu\text{M}$) inhibe la transcripción del mRNA para la síntesis de IL-2 y otras linfocinas durante el proceso de activación de los linfocitos T por tanto inhibe su activación y proliferación en forma selectiva (Kahan 1989).

A diferencia de los corticosteroides, la azatioprina y la ciclofosfamida, la CsA actúa en forma selectiva sobre los linfocitos T CD4+ y produce mucho menor citotoxicidad ya que no actúa sobre la proliferación de otras células; además también a diferencia de los anticuerpos monoclonales, el FK506 y el RS-61443, la CsA es un inmunosupresor bastante investigado y que ha dejado de estar en fase experimental, pues una gran cantidad de estudios experimentales (Nakayasu y cols. 1990, Green 1988) y clínicos (Vries y cols. 1990, Hodgkinson y cols. 1990, Tugwell y cols. 1990) apoyan sus efectos terapéuticos. También a nivel del SNC, se ha demostrado su efectividad en animales de experimentación al promover la supervivencia de aloinjertos

y xenoinjertos intracerebrales. (Nicholas y Arnason 1989, Finsen y cols. 1988, Marion y cols. 1990, Brundin y cols. 1985). En México, la CsA es el fármaco inmunosupresor más accesible. Todo lo anterior lo hace ser hasta el momento el inmunosupresor de elección. Por tales motivos se revisarán de manera más detallada las características de este fármaco.

GENERALIDADES SOBRE CICLOSPORINA-A

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

Absorción

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

Distribución

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

y xenoinjertos intracerebrales. (Nicholas y Arnason 1989, Finsen y cols. 1988, Marion y cols. 1990, Brundin y cols. 1985). En México, la CsA es el fármaco inmunosupresor más accesible. Todo lo anterior lo hace ser hasta el momento el inmunosupresor de elección. Por tales motivos se revisarán de manera más detallada las características de este fármaco.

GENERALIDADES SOBRE CICLOSPORINA-A

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

Absorción

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

Distribución

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

Biotransformación

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

Eliminación

La CsA se elimina principalmente a través de la bilis luego de su biotransformación y sólo una pequeña proporción (el 6% aproximadamente) se elimina por vía renal. Su vida media es de 6.4 a 8.7 horas. La eliminación de la CsA es muy variable de paciente a paciente, obteniéndose un rango de depuración de 2 a 32 mL por minuto por kg (Kahan 1989).

Acciones inmunosupresoras

La CsA inhibe la cascada de activación necesaria para las funciones inmunes específicas, particularmente la producción de linfocinas (IL-2). El mecanismo preciso de acción de la CsA esta bien estudiado. Al ingresar este fármaco al citoplasma celular se une a una proteína denominada ciclofilina; una vez realizada esta unión, el complejo ciclofilina-CsA se une a su vez a la calcineurina (fosfatasa dependiente de calcio) inactivándola. La calcineurina es en realidad la molécula que, por diversos mecanismos, puede desencadenar la activación de los factores nucleares que finalmente dan inicio a la transcripción de la IL-2 y del receptor para la IL-2. El complejo ciclofilina - CsA al inactivar a la calcineurina, impide la transcripción de dichas moléculas y con ello la cascada de eventos inmunológicos. A nivel tímico, la CsA disminuye el número total de timocitos e inhibe su desarrollo (Beschoner y cols. 1988). Disminuye la expresión de moléculas del MHC clase II y la síntesis de prostaglandina E2 en células accesorias (Kahan 1989).

Efectos tóxicos

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

Detección

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

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

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

Radioinmunoanálisis (RIA)

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

Son menos específicas las técnicas que utilizan un anticuerpo policlonal (^{125}I -RIA policlonal) pues miden la CsA y sus metabolitos de manera global. Las que utilizan un anticuerpo monoclonal son más específicas (^3H -RIA monoclonal y ^{125}I -RIA-monoclonal). El anticuerpo se obtiene después de inmunizar ratones con ovalbúmina de pollo conjugada a una molécula de CsA que contenga una

substitución de D-lysyl en la posición 8. Este anticuerpo no reacciona con los metabolitos de la CsA permitiendo así una medición más exacta de la concentración real de la CsA (Quesniaux y cols. 1987). Existen dos sistemas de RIA diferentes, el Sandimmun-específico y el Cyclo-Trac SP; ambos basados también en el sistema de anticuerpos monoclonales contra la CsA. Ninguno de los dos da reacción cruzada con los metabolitos de la CsA (Sung y cols. 1988)

Selección de la dosis de acuerdo a las variables farmacocinéticas

La "ventana terapéutica" de la CsA en el ser humano es de 0.12 a 0.275 $\mu\text{g/mL}$ en plasma, de 0.05 a 0.3 $\mu\text{g/mL}$ en plasma y de 0.25 a 0.8 $\mu\text{g/mL}$ en sangre total determinada por RIA. Los valores séricos por arriba o por abajo de dicho rango se correlacionan con episodios de rechazo del trasplante, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, infecciones o crisis convulsivas (Kahan 1985). Aún teniendo esto en consideración, cada individuo presenta un perfil farmacocinético diferente; por lo tanto la dosis que cada individuo necesita para alcanzar y no sobrepasar el rango terapéutico también es diferente. Debido a las variaciones individuales, es importante la realización de un perfil farmacocinético previo al tratamiento, para predecir la dosis que alcanzará el rango requerido. Por ejemplo la dosis inicial de CsA que se debe administrar a un individuo que va a recibir un trasplante, se debe calcular, basándose en la relación lineal entre la dosis y el área bajo la curva (AUC). La dosis necesaria para alcanzar una concentración sérica promedio de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ en la mayoría de los pacientes con trasplante renal es de 6mg/kg/día (Kahan 1989).

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

En la tabla I se presentan los parámetros de biodisponibilidad reportados para seres humanos y ratas sin LTME.

TABLA I

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

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

Los valores se presentan como promedio ± la desviación estándar, determinados por RIA. Cmax= concentración máxima; AUC= área bajo la curva; iv= intravenosa; ip= intraperitoneal.

Como se puede observar, la biodisponibilidad de la CsA es muy variable; se encuentran diferencias inter-especie e inclusive intra-especie en condiciones fisiológicas y más aún, en modelos experimentales con LTME se han reportado alteraciones en la farmacocinetica de la CsA (Ibarra y cols 1996a). Durante la fase aguda de la lesión, la biodisponibilidad del fármaco se ve muy disminuida cuando éste se administra por la vía oral, pero se eleva enormemente cuando la administración es por la vía intraperitoneal. Ya durante la fase crónica, dichas alteraciones parecen revertir y la biodisponibilidad se regulariza al administrarse el fármaco por la vía oral. Antes de realizar el presente trabajo, se llevaron a cabo una serie de estudios encaminados a diseñar un esquema de administración de la CsA en el modelo de LTME (Ibarra y cols 1996b). Con dicho esquema se consiguió mantener los niveles de CsA dentro de la ventana terapéutica, durante las 24 horas del día.

JUSTIFICACIÓN

Después de una LTME se originan una serie de fenómenos auto destructivos entre los cuales el sistema inmunológico puede jugar un papel importante en la destrucción del tejido neural y la inhibición de una probable regeneración. Hasta el momento no se ha demostrado en forma precisa dicha participación del SI, más aún, existe controversia sobre la existencia de una respuesta celular específica contra antígenos neurales después de una LTME. En un trabajo previo, realizado en nuestro laboratorio, observamos que las ratas con LTME sometidas a un tratamiento inmunosupresor con CsA presentaron una mayor recuperación de la actividad motora comparada con la de ratas con LTME no tratadas. Se sabe que la CsA es un potente agente inmunosupresor de tal forma que la inmunosupresión originada por este fármaco, pudo haber participado de manera importante en dicha recuperación. El estudio mencionado, se enfocó principalmente a evaluar la recuperación clínica de los animales después del tratamiento. Sin embargo, no se evaluó la existencia de una RI celular contra antígenos neurales ni se evaluó el efecto de la inmunosupresión sobre dicha respuesta. Tampoco se evaluó el efecto de la inmunosupresión sobre el proceso de degeneración del tejido medular lesionado. Por tales motivos se diseñó el presente estudio que evalúa de manera integral los parámetros antes mencionados, para así, poder comprender en mejor forma los fenómenos que se desarrollan después de una lesión traumática y así mismo poder brindar una terapia que logre disminuir los procesos de degeneración y origine un medio propicio para la regeneración.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Existe una respuesta inmunológica celular (RIC) dirigida contra los antígenos neurales después de una lesión traumática de la médula espinal?

1.1 ¿Si existe dicha respuesta, el tratamiento con CsA la inhibe?

2. ¿La administración de un tratamiento inmunosupresor con CsA incrementa la proporción de tejido neural preservado y disminuye la desmielinización de la médula espinal después de una lesión traumática?

3. ¿La administración de un tratamiento con CsA favorece la remielinización y la formación de colaterales axónicas de la médula espinal después de una lesión traumática?

4. La administración de un tratamiento con CsA favorece la recuperación clínica después de una lesión traumática?

HIPÓTESIS

1. Después de una lesión en la médula espinal, se origina una RIC dirigida contra antígenos neurales, misma que puede ser inhibida al administrar un tratamiento con CsA.

Si la RI participa en la degeneración y desmielinización de la médula espinal e inhibe la remielinización, la formación de colaterales axónicas y la recuperación clínica después de una lesión traumática, y la CsA inhibe en gran parte dicho factor, entonces:

2. La administración de dicho fármaco, preservará una mayor proporción del tejido en la médula espinal y disminuirá la desmielinización axonal después de una lesión traumática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Existe una respuesta inmunológica celular (RIC) dirigida contra los antígenos neurales después de una lesión traumática de la médula espinal?

1.1 ¿Si existe dicha respuesta, el tratamiento con CsA la inhibe?

2. ¿La administración de un tratamiento inmunosupresor con CsA incrementa la proporción de tejido neural preservado y disminuye la desmielinización de la médula espinal después de una lesión traumática?

3. ¿La administración de un tratamiento con CsA favorece la remielinización y la formación de colaterales axónicas de la médula espinal después de una lesión traumática?

4. La administración de un tratamiento con CsA favorece la recuperación clínica después de una lesión traumática?

HIPÓTESIS

1. Después de una lesión en la médula espinal, se origina una RIC dirigida contra antígenos neurales, misma que puede ser inhibida al administrar un tratamiento con CsA.

Si la RI participa en la degeneración y desmielinización de la médula espinal e inhibe la remielinización, la formación de colaterales axónicas y la recuperación clínica después de una lesión traumática, y la CsA inhibe en gran parte dicho factor, entonces:

2. La administración de dicho fármaco, preservará una mayor proporción del tejido en la médula espinal y disminuirá la desmielinización axonal después de una lesión traumática.

3. La administración de CsA favorecerá la remielinización y la formación de colaterales axónicas en los axones después de una lesión traumática.

4. La administración de CsA favorecerá la recuperación clínica después de una lesión traumática.

OBJETIVOS

1. Identificación de una RIC específica, dirigida contra antígenos neurales en animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal.

1.1 Evaluar el efecto de la CsA sobre la RIC dirigida contra antígenos neurales.

2. Evaluar el efecto del tratamiento con CsA sobre la proporción de tejido preservado neural y sobre el índice de mielinización axonal después de una lesión traumática.

3. Evaluar el efecto de la CsA sobre la formación de colaterales axónicas en los axones de la médula espinal después de una lesión mecánica

4. Evaluar el efecto de la CsA sobre la recuperación clínica después de una lesión traumática.

3. La administración de CsA favorecerá la remielinización y la formación de colaterales axónicas en los axones después de una lesión traumática.

4. La administración de CsA favorecerá la recuperación clínica después de una lesión traumática.

OBJETIVOS

1. Identificación de una RIC específica, dirigida contra antígenos neurales en animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal.

1.1 Evaluar el efecto de la CsA sobre la RIC dirigida contra antígenos neurales.

2. Evaluar el efecto del tratamiento con CsA sobre la proporción de tejido preservado neural y sobre el índice de mielinización axonal después de una lesión traumática.

3. Evaluar el efecto de la CsA sobre la formación de colaterales axónicas en los axones de la médula espinal después de una lesión mecánica.

4. Evaluar el efecto de la CsA sobre la recuperación clínica después de una lesión traumática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

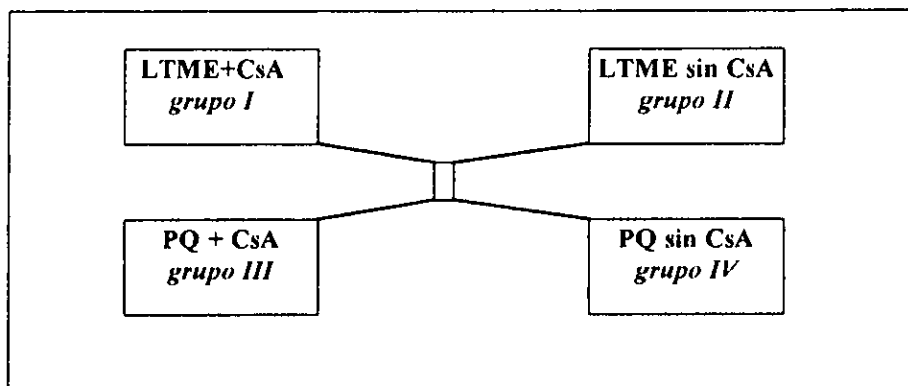
Se utilizaron un total de 118 ratas de la cepa Fischer 344, adultas, hembras de 160 a 200 g de peso, con las cuales se formaron 4 grupos:

GRUPO I : N= 42 . Ratas con lesión de la médula espinal e inicio de la CsA 48 h antes del trauma medular.

GRUPO II: N= 42. Ratas con lesión de la médula espinal , sin CsA.

GRUPO III: N= 24. Ratas sin lesión de la médula espinal e inicio de la CsA 48 h antes del procedimiento quirúrgico (PQ).

GRUPO IV: N= 10. Ratas con PQ pero sin lesión de la médula espinal, y sin CsA.



Consideraciones técnicas

a) Las ratas de los grupos III y IV fueron sometidas al mismo procedimiento quirúrgico que las ratas de los grupos I y II, pero sin ser lesionadas.

b) A las ratas de los grupos II y IV se les administró únicamente el vehículo de la CsA.

c) Se determinaron los niveles de CsA en 2 ratas elegidas al azar de los grupos I, II y III a los 14, 45 y 90 días después de la lesión mediante radioinmunoanálisis (RIA) con el fin de corroborar que los animales tratados (grupos I y III) tenían niveles séricos de CsA dentro de la ventana terapéutica.

d) Se corroboró la inmunosupresión por la proporción de células CD4+ y CD8+ en sangre periférica mediante citofluorometría, se demostró la incapacidad de los animales para responder a un estímulo antigénico heterólogo mediante pruebas de hemaglutinación y se evaluó mediante una escala ordinal la presencia o ausencia de células inmunes en la zona de lesión.

Para tal efecto, se eligieron 3 ratas de cada grupo al azar a los 7, 14, 45 y 90 días después del procedimiento quirúrgico.

Estudio inmunológico

La respuesta celular específica contra antígenos neurales se evaluó mediante pruebas de proliferación celular (incorporación de timidina tritiada), realizadas el día del sacrificio.

Estudios morfométricos

Se realizaron estudios morfométricos para evaluar la cantidad de tejido preservado (mediante microscopía de luz) o bien el índice de mielinización axonal (mediante microscopía electrónica e imágenes digitalizadas) el día del sacrificio de los animales.

Para realizar las evaluaciones antes mencionadas, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas en 3 diferentes tiempos: a los 15 (fase de mayor desmielinización), 45 (fase intermedia) y 90 días (fase de estabilización) después del procedimiento quirúrgico. Para dichos estudios las ratas fueron sacrificadas como se indica en la tabla II:

TABLA II

Distribución de ratas sacrificadas por grupo en cada periodo posesión

GRUPOS	15 días	45 días	90 días	TOTAL
LTME+CsA	14	14	14	42
LTME sin CsA	14	14	14	42
Lamin. + CsA	8	8	8	24
Lamin. sin CsA	10	----	----	10
TOTAL	46	36	36	118

Un día antes del sacrificio se seleccionaron al azar los animales de los diferentes grupos para una de las pruebas morfométricas. En los animales seleccionados para los estudios de microscopía de luz, también se llevó a cabo la prueba de proliferación celular. La tabla III indica en forma precisa la distribución de las ratas para estos estudios.

TABLA III

Distribución de ratas utilizadas para cada estudio en los diferentes periodos posesión

GRUPOS	15 DÍAS		45 DÍAS		90 DÍAS		TOTAL
	Tejido preservado y RIC	I. de mielinizac.	Tejido preservado y RIC	I. de mielinizac.	Tejido preservado y RIC	I. de mielinizac.	
LTME+ CsA	10	4	10	4	10	4	42
LTME sin CsA	10	4	10	4	10	4	42
Lamin. + CsA	4	4	4	4	4	4	24
Lamin. sin CsA	5	5	----	----	----	----	10
TOTAL	29	17	24	12	24	12	118

Evaluación clínica

Las ratas de los grupos I, II y III fueron evaluadas mediante una batería de pruebas finas para conocer la recuperación de la fuerza y la actividad motora de las extremidades posteriores, a los 15, 45 y 90 días después del procedimiento quirúrgico (ver tabla IV).

TABLA IV

Distribución de ratas utilizadas por grupo para la evaluación clínica en cada periodo poslesión

GRUPOS	15 días	45 días	90 días
LTME+CsA	24	16	8
LTME sin CsA	24	16	8
Lamin. + CsA	24	16	8

Descripción de técnicas

Lesión traumática

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (77.5 mg/kg) e hidrocloruro de xilazina (12.5 mg/kg). Previa asepsia y antisepsia de la región toraco-lumbar se realizó una incisión de 2cm aproximadamente por planos hasta llegar a la columna vertebral. Posteriormente se llevó a cabo la laminectomía de la vértebra T8 ò T9 hasta dejar expuesta la médula espinal sin dañar las meninges. Una vez expuesta la médula espinal, se colocó una grapa para aneurisma de 63 g/ cm² de fuerza de compresión, por un periodo de 15 segundos, para comprimir y lesionar la médula espinal (técnica de lesión previamente estandarizada en nuestro laboratorio). La lesión se corroboró mediante la observación de un hematoma central en el tejido medular, a través de un microscopio quirúrgico. Finalmente se cerró por planos con sutura dermalón 5-0 y el animal se colocó en una unidad de cuidados intensivos previa administración intramuscular de 250,000 U de penicilina benzatínica.

Cuidados posquirúrgicos

Todos los animales fueron mantenidos en cajas con aserrín estéril y en una habitación aséptica. El agua y el aserrín estéril, se cambiaron cada 3 días. Se evacuó el intestino y la vejiga neurogénicos de cada animal cada 12 h mediante expresión manual.

Esquema de administración de la ciclosporina A

Se utilizó CsA solución oral (solución de 100 mg/mL) e intravenosa (solución de 50mg/mL) (Sandimmune, Sandoz; Suiza). La solución oral fue diluida en aceite de oliva como vehículo y mezclada mediante agitación a 2000 r.p.m. durante 2 min; de esta mezcla se tomaron 0.5 mL para administrar la dosis correspondiente a través de una cánula orogástrica. La solución intravenosa, se diluyó en una solución de NaCl 0.9% y se mezcló mediante agitación a 2000 r.p.m. durante 2 min. De esta mezcla se tomaron también 0.5 mL para inyectar finalmente la dosis correspondiente con una jeringa de tuberculina (previa asepsia y antisepsia de la región abdominal) en la cavidad intraperitoneal.

El tratamiento se realizó mediante un esquema de administración establecido previamente (Ibarra y cols. 1996b):

* Se inició 48 h antes del procedimiento quirúrgico administrando la CsA por vía oral, a una dosis de 5 mg/kg/12h.

* Durante las primeras 72 h poslesión, la CsA se administró por la vía intraperitoneal a una dosis de 2.5 mg/kg/12h y posteriormente se continuó administrando a dosis de 5mg/kg/12h por la vía oral hasta el final del experimento.

Evaluación de los niveles de la ciclosporina-A

Los niveles séricos de CsA se determinaron mediante radioinmunoanálisis en los grupos I, II y III a los 15, 45 y 90 días después de la lesión.

Obtención y procesamiento de las muestras.

Se obtuvieron 0.5 mL de sangre mediante punción intracardiaca con una jeringa de tuberculina. Una vez obtenida la muestra, se dejó reposar por 30 min y previa retracción del coagulo, se centrifugó a 1000 r.p.m. a temperatura ambiente (TA) durante 13 min. Posteriormente se tomaron 300 µl del suero obtenido en cada muestra y se congelaron a -20°C hasta ser procesados.

Técnica de radioinmunoanálisis

Se utilizó el kit CYCLO-Trac SP (INCSTAR Corporation, Stillwater, MN) para determinación de CsA en suero/plasma. La técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas en el kit. Este kit emplea un anticuerpo monoclonal específico para CsA, mismo que no presenta reacción cruzada con alguno de sus metabolitos.

Los resultados fueron calculados obteniendo una curva de calibración graficando el porcentaje de unión contra el logaritmo de la concentración de los estándares para calibración. El porcentaje de unión (U/U₀) fue calculado mediante la siguiente fórmula .

$$U/U_0 (\%) = \frac{\text{CPM del estándar o muestra a analizar} - \text{CPM de UNE}}{\text{CPM del estándar 0} - \text{CPM del NSB}} \times 100$$

Donde:

1. Se calculó el promedio de las cuentas por minuto (CPM) de cada estándar y cada muestra a analizar.
2. Se restó el promedio de CPM de los tubos de unión no específica (UNE) a todos los tubos.
3. Se dividieron las CPM corregidas de cada estándar, testigo o muestra a analizar entre las CPM corregidas del estándar 0.
4. En una hoja de papel semilogarítmico se anotó el porcentaje de unión para los estándar CYCLO-Trac en el eje de las "Y" y su respectiva concentración en el eje de las "X".
5. Se trazó una línea a través de cada punto para dar origen a la gráfica de calibración.

6. Se interpolaron los niveles de ciclosporina de las muestras a analizar.
7. Se calculó la capacidad de unión máxima dividiendo las CPM del estándar 0 entre el promedio de las cuentas obtenidas en los tubos de cuenta total.

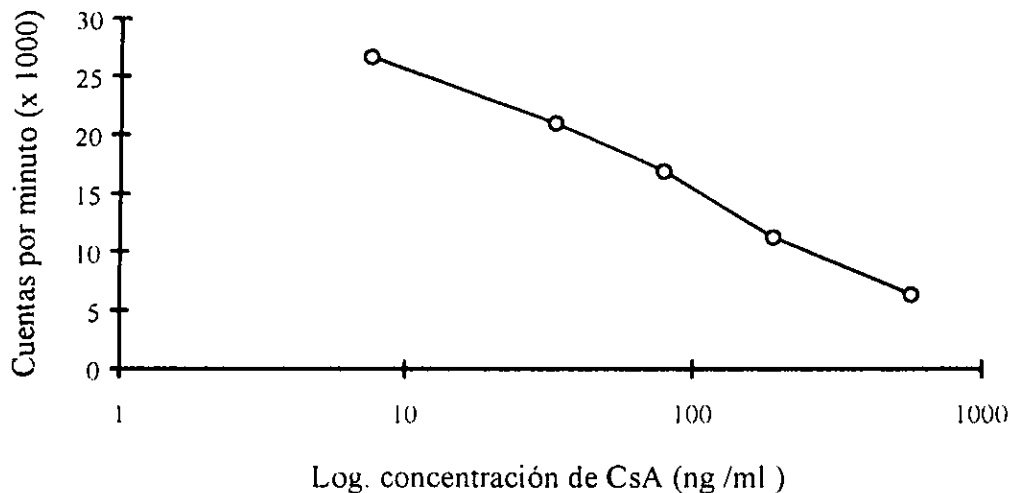


FIGURA 1 Curva de calibración obtenida utilizando el sistema CYCLO-Trac SP para la medición sérica de CsA.

Prueba de hemaglutinación

Para la realización de esta prueba las ratas estudiadas fueron inmunizadas con eritrocitos de carnero para evaluar la respuesta inmune a un antígeno timodependiente.

Obtención y preparación de los eritrocitos de carnero

A un carnero se le extrajeron 15 mL de sangre, misma que fue colocada en un recipiente estéril y mezclada con un volumen igual de solución Alsever estéril (0.07 M de NaCl, 0.02 M de citrato de Na y 0.002 M de ácido cítrico). Inmediatamente después se dejó en refrigeración a 4 °C hasta su uso (7 días después). El día en que se inició la inmunización, se centrifugaron 3mL de la sangre durante 10 min a 1500 r.p.m. y en seguida se agregó 1 mL de agua destilada para lisar los eritrocitos. Se centrifugó nuevamente, desechándose el sobrenadante. Inmediatamente después se

realizaron 3 lavados con solución salina al 0.75% y al botón se le agregaron 300 μ l de la misma solución para y fueron inoculados finalmente por vía intraperitoneal a la rata.

Protocolo de inmunización

El día cero (inicio de la inmunización), se inocularon 300 μ l de eritrocitos de carnero via intraperitoneal inmediatamente después de haber sido preparados. Tres días después de esta primera inmunización se realizó una segunda llevando a cabo el mismo procedimiento y 7 días después de la primera inmunización se obtuvo por vía intracardiaca 1 mL de sangre de cada rata inmunizada para realizar la técnica de hemaglutinación.

Procesamiento de las muestras de sangre

Una vez obtenidas las muestras, se dejaron reposar a TA por 30 minutos y posteriormente previa retracción del coagulo, se centrifugaron por 20 min TA a 1500 r.p.m.. Después se obtuvo el suero correspondiente y se decomplexó incubándolo durante 20 min a 56°C. Finalmente, los sueros fueron congelados a -20°C hasta ser utilizados.

Técnica

1. Se obtuvieron 5 mL de sangre de carnero, mismos que se mezclaron con un volumen igual de solución Alsever.
2. Esta mezcla se dejó en refrigeración a 4°C por 4 - 7 días.
3. Posteriormente los eritrocitos de esta mezcla, fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 y se diluyeron 1:50 en la misma solución, para realizar la prueba de aglutinación.
4. En placas de 96 pozos con fondo en "U" se colocaron 50 μ L del suero problema o testigo en el primer pozo de la primera fila de pozos y se realizaron diluciones seriadas dobles a lo largo de la fila hasta terminar con una dilución final de 1:2048 y un volumen parcial de 25 μ l en cada pozo.

5. Posteriormente se agregaron 25 μ l de la solución de eritrocitos diluidos 1:50 en PBS, para obtener un volumen final de 50 μ l por pozo.
6. Una vez que se realizó esta mezcla, se dejó reposar por 30 min TA, y se observaron a simple vista los sitios donde se llevó a cabo la aglutinación.

Citofluorometria

Obtención y procesamiento de la muestra.

Se obtuvieron 0.5 mL de sangre de las ratas mediante punción intracardiaca con una jeringa de insulina previamente cargada con ácido etilendiamino-tetra acético (EDTA) 0.25 M como anticoagulante. Una vez obtenida la muestra se agitó suavemente y se dejó reposar a TA hasta ser utilizada.

Técnica

1. Se colocaron 20 μ l del primer anticuerpo diluido 1:50 (anti-CD8) y 1:200 (anti-CD4) en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 + suero fetal bovino (SFB) al 2%.
2. Se agregaron 100 μ l de la sangre problema.
3. Se incubó por 20 min TA.
4. Al término de la incubación se agregaron 2 mL de solución de lisis (Isoton II de Culten) y se dejó incubando durante 6 minutos.
5. Se agregaron 2 mL de PBS y se centrifugó por 5 min. TA a 1000 r.p.m..
6. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 μ l de PBS.
7. Se agregaron 20 μ l del segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón acoplada a isotiocianato de fluoresceína) a una concentración de 10 μ g/mL diluido en PBS.
8. Se incubó a TA y en la oscuridad por 30min.
9. Al terminar la incubación se agregaron 4 mL de PBS y se centrifugó la muestra 5 min. TA a
1000 rpm

10. Se resuspendieron las células en 1 mL de una solución PBS y se procedió a la lectura en un citofluorómetro (Facsort, Becton Dickinson), bajo el sistema sort 32 y el programa de análisis Lisis 2.

Evaluación de la proporción de células inmunes en la zona de lesión

Se formuló una escala ordinal tomando como base el número de células presentes en un campo con amplificación de 100X. Se establecieron 3 grados:

Grado 0: Sin células presentes

Grado I: 1 a 2 células por campo

Grado II: 3 a 4 células por campo

Grado III: 5 a 6 células por campo

Este estudio se realizó a los 15 días posesión y solo en los animales de los grupos experimentales (grupos I y II).

Proliferación celular

Obtención del extracto crudo de médula espinal

Se sacrificaron 15 ratas hembras Fischer 344, singénicas y sin lesión de la médula espinal, mediante inhalación con éter etílico e inmediatamente se procedió a realizar laminectomía de toda la columna vertebral hasta dejar expuesta la médula espinal en toda su longitud. Una vez expuesta, se realizó un corte transversal a la médula espinal a nivel de la segunda vértebra lumbar y con una pinza de Kelly se tomó la médula en este extremo y poco a poco se desprendieron las raíces nerviosas con una navaja de bisturí del número 11 hasta llegar a nivel de la primera vértebra cervical. Posteriormente se realizó un nuevo corte transversal a la médula en esta misma región para poder extirparla. Una vez obtenida, se colocó inmediatamente en una solución de Tris 0.010 M pH 8 a 4°C. Posteriormente se procedió con los siguientes pasos (todos a una temperatura de 4°C):

1. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico, se retiraron en su totalidad las meninges.

2. Ya sin meninges, las médulas fueron despojadas de todo residuo de sangre mediante lavado suave con el mismo Tris.
3. Todas las médulas se colocaron en 4 mL de una solución inhibidora de enzimas (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TLCK) 1mg/mL, N-tosil-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) 1mg/mL y Fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) 0.1 M en Tris base 0.010M).
4. En dicha solución y con la ayuda de un emulsificador tubular de cristal, se emulsificaron las médulas por un periodo de 15 min.
5. Se dejó reposando la solución emulsificada durante 15 min.
6. Al término de los 15 min la solución fue centrifugada a 2000 r.p.m. 4°C durante 10 min.
7. Se tomó el sobrenadante y se realizó cuantificación de proteínas del mismo, dando como resultado un total de 1.8 mg/mL.

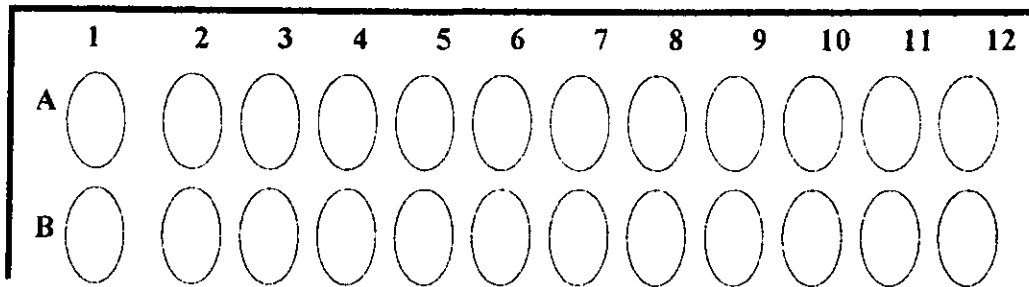
Obtención de los ganglios y preparación de la muestra

Bajo anestesia y en condiciones de asepsia y antisepsia se realizó un corte longitudinal de la región media del maxilar inferior a la región media del esternón. Se disecó el tejido subcutáneo y se localizaron los 4 ganglios cervicales (2 en cada extremo de la cadena cervical). Se disecaron y se extrajeron para ser colocados inmediatamente en solución de RPMI+ suero fetal bovino (SFB) al 20% para posteriormente ser macerados (sin llegar a triturar) con el émbolo de una jeringa estéril, para obtener las células que fueron utilizadas en los estudios de proliferación celular.

Técnica

- 1 Las células en suspensión, se centrifugaron a 1000 rpm TA durante 4 min.
2. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en RPMI+SFB para ser nuevamente centrifugadas. De esta forma se lavaron las células veces.
3. Se procedió a contar las células y a verificar su viabilidad con azul de tripano al 2%.
4. En placas de 96 pozos para cultivo de células, se colocaron 200,000 células por pozo en RMPI+SFB.
5. A cada pozo se le agregaron 100µl ya sea de RPMI + SFB (testigo negativo), RPMI + SFB mezclado con un extracto crudo de médula espinal a diferentes concentraciones, o bien RPMI +

SFB mezclado con un mitógeno (concanavalina-A y fitohemaglutinina) (testigo positivo) como sigue:



Células + RPMI: A1 a A3

Células + extracto crudo de médula espinal (15 μ g/mL): A4 a A6

Células + extracto crudo de médula espinal (30 μ g/mL): A7 a A9

Células + extracto crudo de médula espinal (50 μ g/mL): A10 a A12

Células + concanavalina A (ConA) (5 μ g/mL): B1 a B3

Células + fitohemaglutinina (PHA) (10 μ g/mL): B4 a B6

6. Se incubaron las placas a 37°C en presencia de 5% de CO₂

7. Setenta y dos horas después, se agregó 1 μ curie de timidina-H³ por pozo.

8. Veinticuatro horas después las células fueron procesadas en un cosechador (Skatron Instruments)

9. La muestra correspondiente a cada pozo se colocó en viales que contenían 5 mL de líquido de centelleo (Aquasol, Sigma Corp.)

10. Todas las muestras fueron evaluadas en un analizador de radioactividad β Beckman LS 6000 TA para obtener los valores correspondientes expresados en cuentas por minuto.

Una vez obtenidos los valores, se procedió a promediar cada triplicado y el valor resultante se utilizó para obtener el índice de proliferación (IP) correspondiente, mismo que resultó de dividir las cuentas por minuto promedio de los pozos problema entre las cuentas por minuto de los pozos

testigo (células + RPMI). Se tomó como IP positivo aquel que fuera igual o mayor a 1.5, tomando en consideración que el antígeno utilizado en esta prueba (extracto crudo de médula espinal) fue un antígeno homólogo y que en los estudios de proliferación con células de rata sin lesión (testigo) el IP no rebasó el IP de 1.1.

Estudios morfológicos

Las ratas se sacrificaron a los tiempos descritos en el diseño experimental.

Morfometría del tejido preservado (estudios con microscopía de luz).

Para determinar mediante estudios morfométricos el porcentaje de tejido preservado en la médula espinal después de la lesión, previa anestesia con una mezcla de ketamina (77.5 mg/kg) e hidrocloreuro de xilazina (12.5 mg/kg), los animales se perfundieron vía intracardiaca con 50 mL de solución fisiológica más 1000 UI de heparina a temperatura ambiente, seguida de 500 mL de formaldehído al 10% . Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 mL/ min con el empleo de una bomba peristáltica. Al término de la perfusión se extrajo la médula espinal para obtener un segmento que abarcara 1.5 cm a partir de la región aparente del epicentro de la lesión, hacia el segmento caudal y hacia el segmento cefálico de la médula. Dicho segmento se colocó libre de meninges en la misma solución con que fue perfundida hasta el momento de ser procesada. Posteriormente se siguió el procedimiento de rutina para embeber el espécimen en parafina:

1. Deshidratación en alcoholes graduales (alcohol etílico al 50%, 80%, 95% y alcohol absoluto. 30 min en cada uno),
2. Aclaración en 2 baños de xileno (media hora en cada uno),
3. Colocación en parafina a 57°C durante 2 horas y posteriormente inclusión en un molde metálico dejándose enfriar a 4°C.

Se realizaron cortes longitudinales seriados de 30µm de espesor hasta llegar a la zona del canal endimario (zona central de la médula espinal) en un microtomo Spencer 820 (American Optical Company), a partir de este momento se realizaron cortes secuenciales de 5µm de espesor de los cuales se tomaron muestras de la región donde se observó el canal endimario en mayor grosor.

Los cortes seleccionados se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0.5 g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron sobre laminillas de vidrio convencionales para ser teñidas finalmente con hematoxilina-eosina (HE) para su estudio morfométrico (Luna 1960). Una vez teñido y montado cada espécimen, se procedió a fotografiar la zona de lesión a una ampliación de 4X. La morfometría del tejido preservado se llevó a cabo mediante un método estereológico (Weibel 1979): colocando un papel milimétrico sobre las impresiones fotográficas, se dibujó el contorno del tejido preservado con un plumón fino (ver figura 2). Esto se realizó en forma ciega.

En el papel milimétrico se contaron los cuadros de 0.5 cm por lado (25 mm²) que contenían el tejido medular preservado en ambos ejes, horizontal y vertical. En los casos en que en algún punto el tejido preservado abarcaba solo una parte de los cuadros se tomó la siguiente regla: cuando la parte abarcada del cuadro era mayor a la mitad del mismo se contó como cuadro completo. Cuando la parte abarcada del cuadro representaba la mitad del mismo, se contaba como cuadro completo una mitad si y otra no. Finalmente, cuando la parte abarcada del cuadro representaba menos de la mitad del mismo no se tomó en cuenta para el conteo.

Una vez que se obtuvo el número total de cuadros, éste fue multiplicado por 25 (área total en mm² de cada cuadro) para el área aparente (AA). Posteriormente se realizó la siguiente regla de tres:

$$\begin{array}{l} 1024 \text{ ----- } 1 \text{ mm}^2 \\ \text{AA} \text{ ----- } X \end{array}$$

Donde 1024 es el factor de ampliación total que resultó de multiplicar 32 x 32. El número 32 resultó a su vez de multiplicar el aumento del objetivo (2X) por el aumento del objetivo fotográfico (5X) por el aumento del negativo (3.2X): $2 \times 5 \times 3.2 = 32 = 1 \text{ mm}$; $32 \times 32 = 1024 = 1 \text{ mm}^2$.

Finalmente X fue el área total en mm².

El área en mm² obtenida en los grupos testigo fue considerada como 100% de tejido medular preservado. El porcentaje total de tejido preservado en los grupos experimentales fue obtenido a partir del área en mm², mediante una regla de 3 tomando como 100% el valor de los grupos testigo.

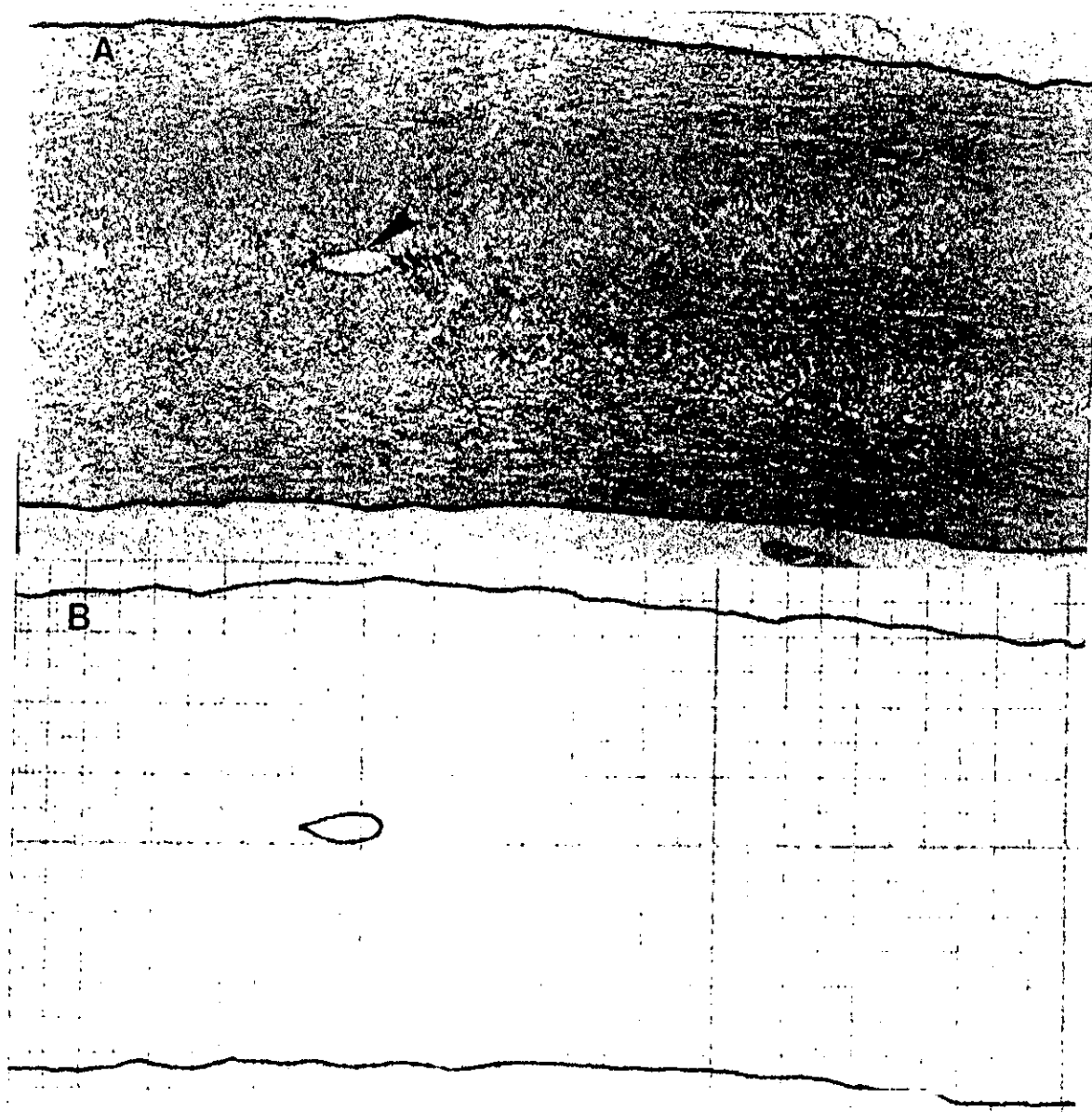
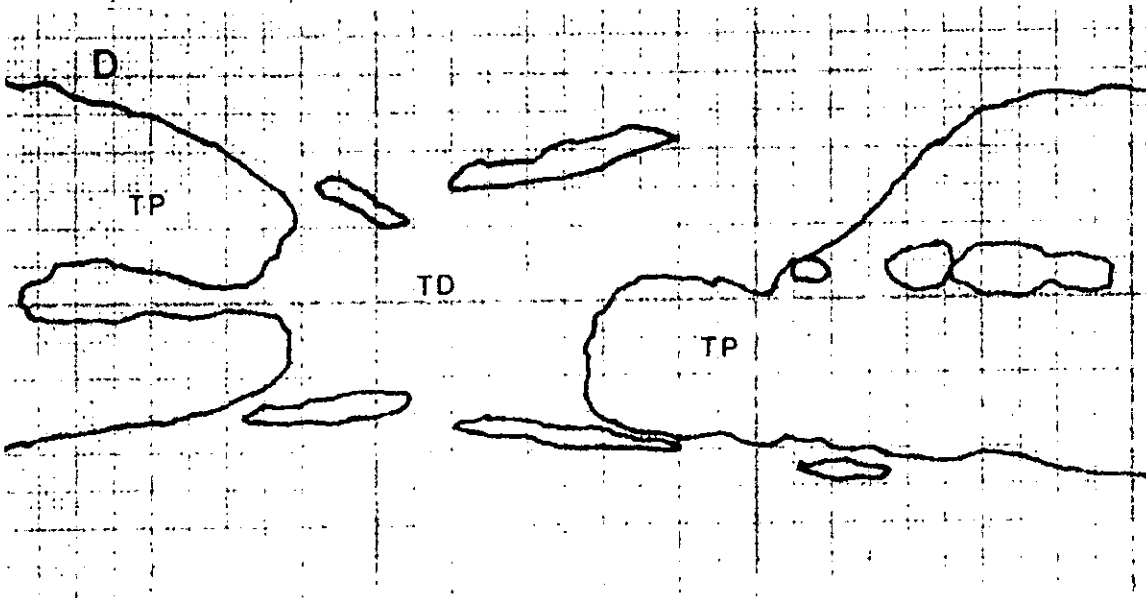
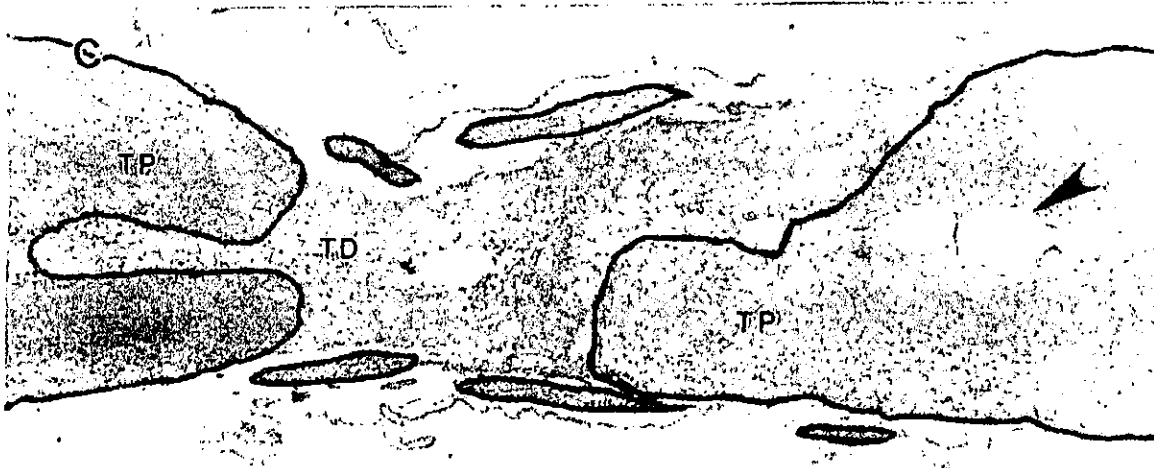


FIGURA 2. Forma en la que se determinó el área de tejido preservado. A) Corte longitudinal de médula espinal sin lesión, indicando con línea negra el área de tejido analizado; B) Proyección de este corte al papel milimétrico. C) Corte longitudinal de médula espinal con lesión, indicando el tejido preservado; D) Proyección del tejido preservado al papel milimétrico. Flechas= canal endimario; TP= Tejido preservado, TD= Tejido dañado.



Morfometría ultraestructural (Estudios con microscopía electrónica) . El índice de mielinización (IM) o radio "g" se ha empleado para establecer el espesor relativo de la vaina de mielina. Mientras más pequeño sea el IM existirá una cubierta de mielina proporcionalmente más gruesa; es decir un axón mielinizado presentará índices inferiores a la unidad y uno amielínico tendrá un IM igual a 1 (Guy y cols. 1989). Para conocer el IM de los axones de la médula espinal en los 4 grupos y en los diferentes tiempos después de la lesión, las ratas elegidas para este estudio fueron perfundidas vía intracardiaca con 100mL de una solución amortiguadora de cacodilatos 0.15M, NaCl 0.1M, pH 7.4 más 1000 UI de heparina a 4°C, seguida de 500 mL de glutaraldehído al 1%, paraformaldehído al 1.25 %, CaCl₂ al 0.05% y sacarosa 0.025 M en una solución amortiguadora de cacodilatos 0.1M, pH 7.4 a 4° C. La osmolaridad final de la solución fue de 758 mOsM / L. Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 mL/min con el empleo de una bomba peristáltica.

Al término de la perfusión se extrajo un segmento de 1 cm de longitud (5 mm a cada lado de la zona del impacto) y se colocó libre de meninges en una segunda solución fijadora (glutaraldehído al 2.5%, CaCl₂ al 0.05% y sacarosa 0.025 M en solución amortiguadora de cacodilatos 0.15M, pH 7.4) por un lapso de 2 horas, al término del cual se realizó el siguiente procedimiento:

1. Del segmento obtenido se realizaron cortes de 400 µm de ancho, en un vibratomo y en presencia de amortiguador de cacodilatos 0.15 M, NaCl 0.1 M.
2. Los cortes se realizaron del extremo caudal al extremo cefálico del segmento medular y se eligió el epicentro del impacto (fragmento que presentó la mayor destrucción del parénquima medular).
3. El fragmento elegido, fue inmediatamente posfijado en una solución de tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilatos durante una hora y media a 4°C. A partir de este paso todo se realizó bajo agitación.
4. Se deshidrató en alcoholes graduales (50%, 70%, 80%, 96%) 10 min cada uno y finalmente se incubó en alcohol absoluto 15 min x 4 veces.
5. Se inició la infiltración incubando la pieza en 4 volúmenes de alcohol absoluto por uno de la resina Spurr, durante 2 horas

6. Le siguió otra incubación durante 2 horas con 3 volúmenes de alcohol absoluto por 2 de la resina.
7. Posteriormente se dejó toda la noche a TA sin agitación en 2 volúmenes de alcohol por 2 de la resina.
8. Al día siguiente se continuó con la infiltración incubando la pieza durante 2 horas en 2 volúmenes de alcohol por 3 de la resina.
9. Para terminar con la infiltración, se incubó la pieza durante otras 2 horas, con 1 volumen de alcohol por 4 de la resina Spurr.
10. Terminada la última incubación, se colocó la pieza en resina pura y se dejó en una caja de silicagel a TA toda la noche.
11. Finalmente la pieza se incluyó en la misma resina y se dejó en una estufa a 60°C durante 3 días.

Una vez incluidas las piezas, se prepararon cortes semifinos de 1µm de espesor en un ultramicrotomo, mismos que fueron teñidos con azul de toluidina al 1% para ser observados a 100X en un microscopio de luz con el fin de seleccionar el área de interfase destrucción - tejido preservado, en el cordón lateral derecho (ver figura 3). Este sitio fue elegido en primer lugar porque en él se localizan algunos fascículos descendentes como el cerebrospinal lateral (piramidal cruzado) que se encarga de movimientos voluntarios y el rubroespinal que se encarga del tono muscular. Además al llevar a cabo la estandarización del método de lesión, este sitio fue en el que quedaba tejido que pudiera ser analizado en la mayoría de los animales. Una vez elegido el sitio, se procedió a realizar los cortes finos (80-90 nm) para finalmente montarlos en rejillas de cobre de 400 espacios donde posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes así preparados se observaron en un microscopio electrónico de transmisión y, se eligieron para ser digitalizadas las zonas de mayor destrucción que además contenían gran número de axones. En cada espécimen se digitalizaron por lo menos 8 imágenes distintas de 1000X y 1670X en el formato del software Zeiss Analysis 2.1. Con este software se analizó el área de la fibra y el área de la fibra más la mielina (área axonal) de por lo menos 200 axones en cada

espécimen. A partir del área se obtuvo el diámetro de la fibra (DF) y el diámetro axonal (DA) mediante las siguientes fórmulas (Karnes y cols 1977; Little y cols. 1994):

$$DF = 2 \times \sqrt{\text{área de la fibra} / \pi}$$

$$DA = 2 \times \sqrt{\text{área del axón} / \pi}$$

Contando con el DF y el DA de cada axón, se obtuvo el IM axonal, mismo que resultó de dividir: DF / DA

El cociente resultante de esta operación se consideró como el IM axonal. Se promediaron los IM de cada grupo en cada corte y se obtuvo el IM para cada uno.

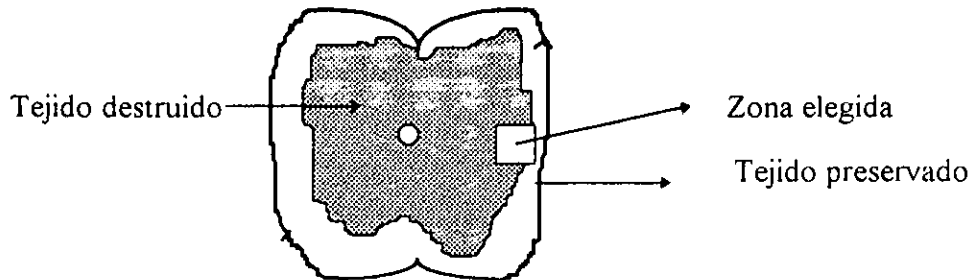


FIGURA 3. Corte transversal del segmento lesionado. Sitio que se eligió para realizar los cortes finos y el análisis morfométrico.

Evaluación clínica de la capacidad funcional

Antes de ser sometidos al procedimiento quirúrgico, todos los animales se sometieron dos veces a las pruebas funcionales programadas con intervalo de 15 días, para obtener los parámetros de normalidad.

Se aplicaron 2 pruebas que evaluaron en forma fina la recuperación de la función motora del tren posterior en las ratas estudiadas. Dichas pruebas fueron: la prueba de análisis de las huellas podálicas y la de deambulación sobre reja de alambre. Ambas fueron aplicadas a los 15, 45 y 90

días después del procedimiento quirúrgico. Para cada prueba, un observador previamente entrenado pero sin saber a que grupo pertenecía cada animal, y con variabilidad intraobservador mayor de 0.7, determinó la calificación correspondiente.

Análisis de las huellas podálicas

Para esta prueba se les puso tinta de diferente color a las patas anteriores y posteriores. Se colocó al animal en una pasarela construida de acrílico (de 1.60 cm de longitud y 10 cm de ancho) y con cartulina blanca en la superficie. Para que los animales aprendan a caminar sobre la pasarela, se les condicionó tres semanas antes de la cirugía. El análisis de las huellas se obtuvo del promedio de las medidas de 6 pasos consecutivos, obtenidos de la porción media del recorrido. Se analizó la base de sustentación (BS) (distancia entre las dos patas posteriores) y la longitud de zancada (LZ) (distancia entre las huellas de dos pasos consecutivos de cada una de las extremidades posteriores por separado) (ver figura 4a). Las mediciones se expresaron en centímetros y el total de 3 mediciones se dividió entre 3 para obtener un promedio en cada uno de los parámetros evaluados. En el caso de la LZ el valor correspondió a cada extremidad por separado por lo que para la evaluación de la tendencia y para el análisis estadístico se sumaron los resultados y se tomó en consideración el promedio de ambas extremidades.

Deambulación sobre reja de alambre (DRA)

Se evaluó la capacidad del animal de atravesar una reja de alambre elevada sobre el piso, misma 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) (ver figura 4b). La prueba duró 3 minutos de los cuales el animal caminó al menos 30 segundos, o 15 pasos. La caminata fue filmada en video y se analizó en cámara lenta. Se contó el número total de pasos fallados (caídas) y de pasos acertados (apoyo de la planta sobre el alambre). De los valores resultantes, se obtuvo un índice que correspondió al cociente obtenido de dividir el número de pasos fallidos entre el número total de pasos (fallidos + acertados).

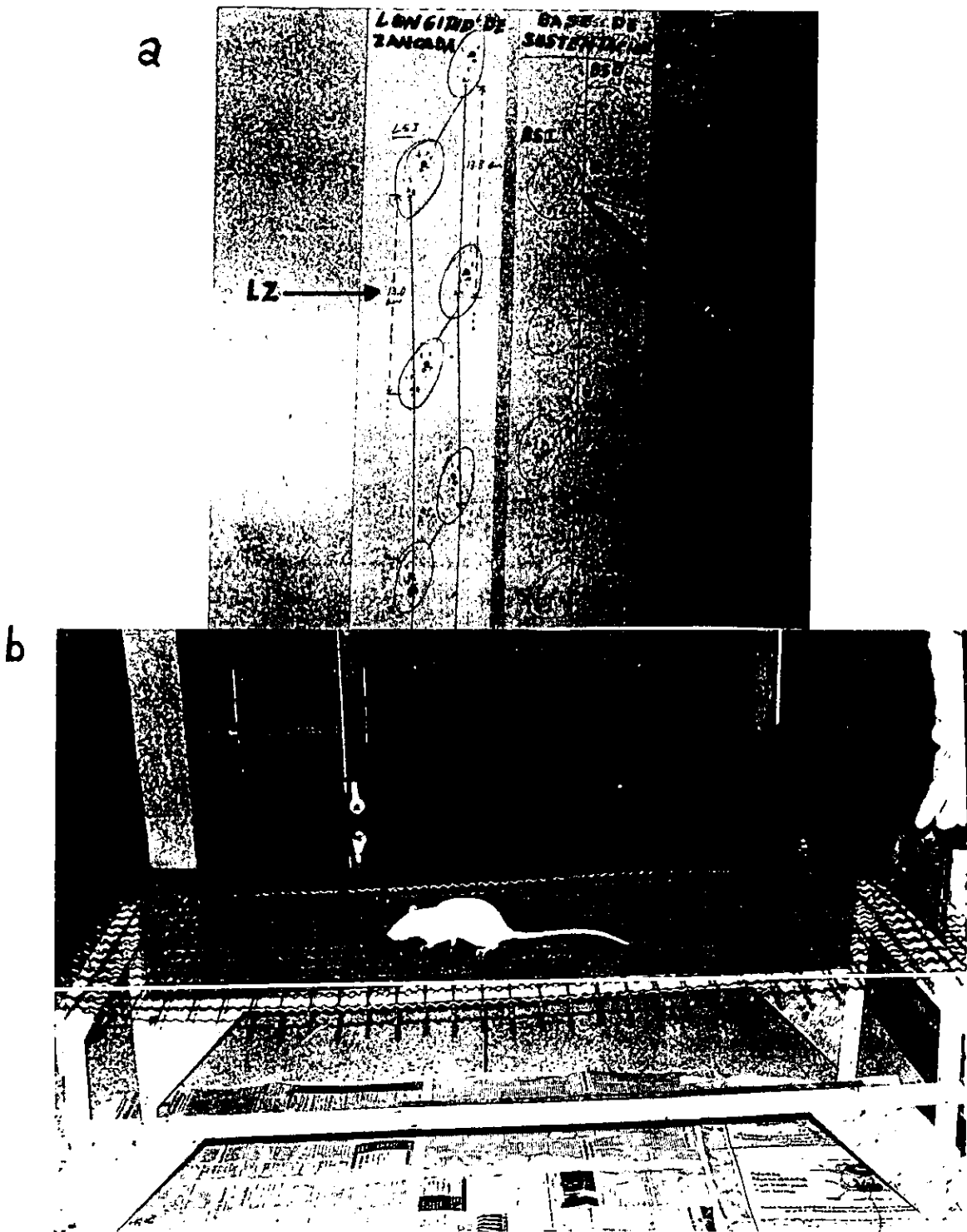


FIGURA 4. Pruebas de evaluación clínica. a) Longitud de zancada y base de sustentación. b) Deambulacion sobre reja de alambre. LZ= longitud de zancada; BS= base de sustentación; BSI= base de sustentación izquierda; BSD= base de sustentación derecha; BST= base de sustentacion total

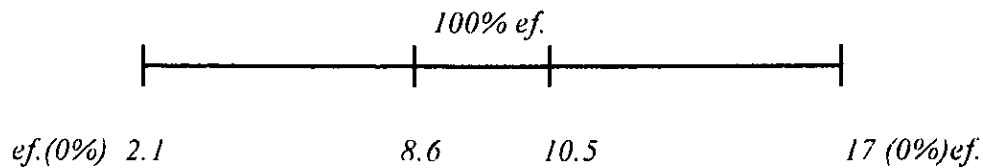
Consideraciones técnicas para la evaluación

Para las dos pruebas, se tomó como base de comparación los valores normales obtenidos en los 72 animales estudiados, antes de ser lesionados. Se consideraron como límites de normalidad a los encontrados por arriba del percentil 25 (de la curva de distribución) en el caso de la DRA y entre el percentil 25 y 75 en el caso del análisis de las huellas podálicas.(BS y LZ). En el caso de la DRA los valores desde la percentila 25 y mayores se consideraron como el 100% de eficiencia de la prueba y los encontrados por abajo de dicha percentila tomaron el valor porcentual correspondiente en orden decreciente. La asignación de 0 ó 100% se hizo de acuerdo a una regla de 3 en donde el 100% fue el valor de la percentila 25 y el porcentaje buscado se obtuvo en función al valor obtenido en la prueba clínica. En el caso de la BS y LZ se consideró la diferencia entre el valor mínimo y máximo obtenidos de ratas normales y éste se restó a la percentila 25 y se sumó a la percentila 75 para conocer el 0% de eficiencia de la prueba. Los valores intermedios entre la percentila y el valor determinado como 0% de eficiencia, constituyeron el porcentaje que mientras más cerca se encontrara de la percentila (25 ó 75), el porcentaje era mayor, mientras que los valores que se encontraban entre las percentilas 25 y 75 correspondieron al 100% de eficiencia. La diferencia entre el valor mínimo y el máximo (valor M) corresponde al 100 %. El valor obtenido en la evaluación fue restado a la percentila correspondiente (según su localización por abajo o por arriba de las percentilas) y el valor resultante (valor R) se tomó para realizar una regla de tres donde el valor M correspondió al 100% y R el porcentaje problema. Posteriormente, al valor obtenido en esta última operación, se le restaron 100 para conocer finalmente el porcentaje de eficiencia convirtiendo a positivo el número obtenido (ver ejemplo).

Ejemplo:

Percentil 25% 8.6; Percentil 75% 10.5; Valor máximo 12.9; Valor mínimo 6.4 ; Valor obtenido en la evaluación = 7.6

$$12.9 - 6.4 = 6.5 \quad \text{entonces} \longrightarrow 10.5 + 6.5 = 17 \quad \text{y} \quad 8.6 - 6.5 = 2.1$$



Así pues:

$$8.6 - 7.6 = 1 \longrightarrow 6.5 \text{-----} 100\% \longrightarrow 15.4 - 100 = 84.6\% \text{ de eficiencia}$$

$$1 \text{-----} X = 15.4$$

Método estadístico

Se realizó estadística descriptiva: se calcularon promedios, porcentajes y se elaboraron gráficas de líneas y de barras en los casos que lo ameritaban.

Para determinar que tipo de pruebas estadísticas podían utilizarse en el análisis de los datos, todas las evaluaciones resultantes se sometieron a pruebas de normalidad. Se propuso que si la distribución de los valores de una variable determinada mostraba una distribución normal en todos los casos, se realizaría una prueba estadística paramétrica, pero si en uno o más de los casos la distribución era anormal, se utilizaría una prueba no paramétrica. En todos los casos la probabilidad de demostrar diferencias entre los grupos, se taso que fuera igual o menor a 0.05.

Citofluorometría y estudios de hemaglutinación

Para conocer la diferencia estadística entre los grupos I, II y III se propuso la prueba paramétrica de análisis de varianza o la no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Estudios de proliferación celular

Para conocer la diferencia estadística entre los grupos I y II, se propuso la prueba paramétrica "t de student" o la no paramétrica U de Mann-Whitney. Para conocer la diferencia estadística entre los

cuatro grupos estudiados, se propuso la prueba paramétrica de análisis de varianza o la no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Estudios morfométricos (índice de mielinización, distribución del índice de mielinización y distribución del diámetro axonal).

Para conocer la diferencia estadística entre los 4 grupos estudiados con respecto al IM, se propuso la prueba paramétrica de análisis de varianza o la no paramétrica de Kruskal-Wallis. En lo que respecta a la distribución del IM y del diámetro axonal, se propuso la prueba exacta de Fisher o la prueba Z para conocer la diferencia estadística entre los grupos experimentales y entre el grupo testigo y cada uno de los grupos experimentales.

Evaluación clínica

Para conocer la diferencia entre los grupos I y II se propuso la prueba paramétrica "t de student" o la no paramétrica U de Mann-Whitney.

Consideraciones éticas del uso de animales en experimentación biomédica

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

RESULTADOS

Análisis estadístico

En la mayor parte de los casos el análisis de normalidad reveló que los datos en cada grupo presentaban una distribución anormal, es decir muy heterogénea. Por este motivo, prácticamente en todos los casos, las comparaciones entre los diferentes grupos se llevaron a cabo mediante pruebas no paramétricas, mismas que se especifican para cada estudio.

Evaluación de la inmunosupresión

Para demostrar que los animales tratados estaban correctamente inmunosuprimidos, se realizaron varias pruebas de evaluación.

Evaluación de los niveles de ciclosporina-A

Se corroboró que los niveles de CsA se encontraran dentro de los valores considerados como niveles terapéuticos, analizando la concentración sérica del fármaco en los grupos I, II y III. En la figura 5 se observan los niveles de CsA a los 15, 45 y 90 días después de iniciado el tratamiento. Quince días después de iniciado el estudio, los dos grupos que recibieron el tratamiento (grupos I y III), presentaron niveles de CsA por arriba de la concentración mínima terapéutica (125ng/mL) y por debajo de la concentración mínima tóxica (2000ng/mL). Dichos valores se mantuvieron a los 45 y 90 días

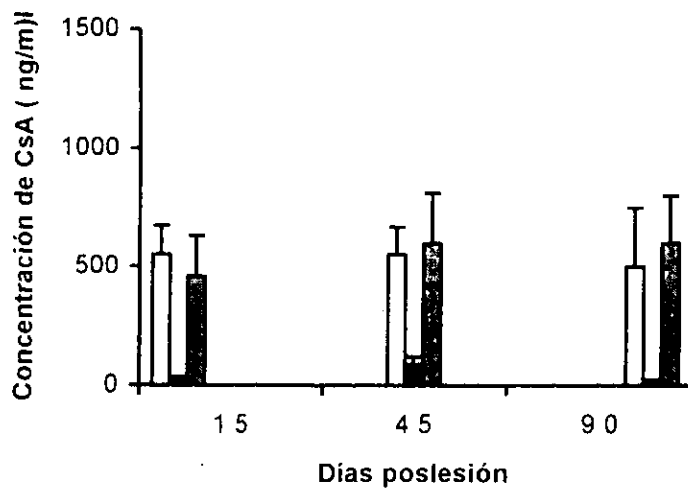


FIGURA 5. Niveles de ciclosporina-A 15, 45 y 90 días posesión. Ratas con: LTME+ CsA (barras vacías), LTME sin CsA (barras negras) y laminectomía + CsA (barras grises).

Análisis citofluorométrico

En la figura 6, se observa que el porcentaje de linfocitos T CD4+ antes del tratamiento es similar en los 3 grupos estudiados y concuerda con los valores considerados como normales en rata (35-45%). Dichos valores se mantuvieron a los 15 y 45 días después del tratamiento. A los 90 días, se observó un incremento con respecto a los valores correspondientes al día 0, mismo que no fue estadísticamente significativo (Kruskal Wallis, $p=0.08$)

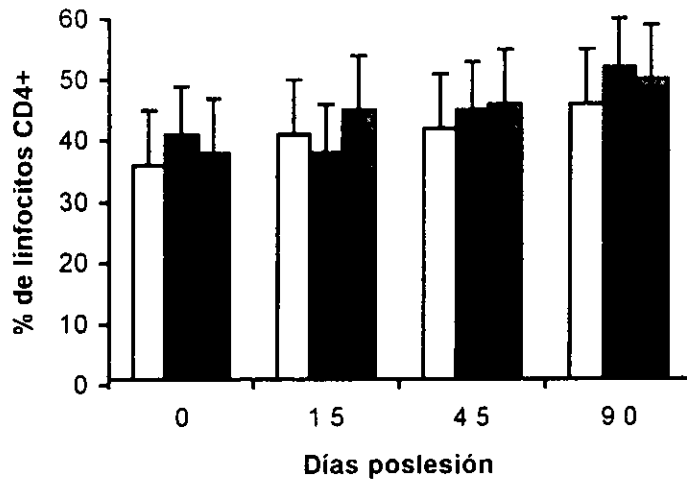


FIGURA 6. Porcentaje de linfocitos CD4+ en sangre periférica de los 3 grupos estudiados. Ratas con: LTME+CsA, grupo I (barras vacías); LTME sin CsA, grupo II (barras negras) y laminectomía + CsA, grupo III (barras grises).

En la figura 7 se observa el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los 3 grupos estudiados. Los valores basales son muy similares en los 3 grupos y concuerdan con los valores considerados como normales en rata (23- 30%). El porcentaje de estas células se mantuvo constante en los 3 grupos a lo largo del experimento. Los valores observados en los grupos con LTME (grupos I y II) no presentaron variación significativa durante el estudio. El grupo de ratas sin lesión (grupo III) presentó un ligero incremento a los 90 días del seguimiento, mismo que no fue estadísticamente significativo con respecto a los grupos I y II.

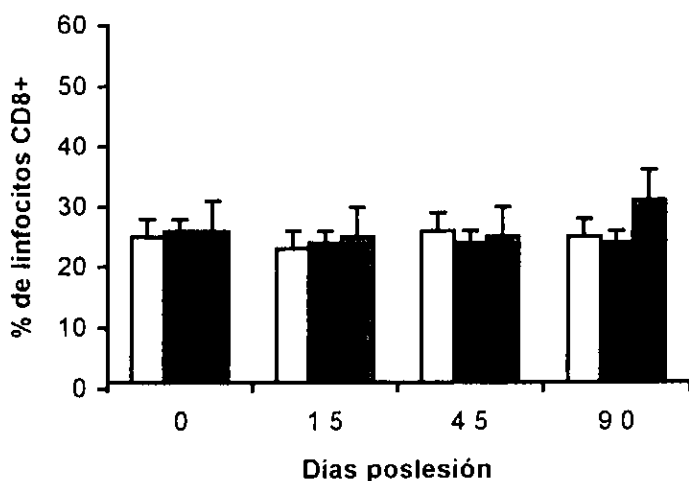


FIGURA 7. Porcentaje de linfocitos CD8+ en sangre periférica de los 3 grupos estudiados. Ratas con: LTME+CsA, grupo I (barras vacías); LTME sin CsA, grupo II (barras negras) y laminectomía + CsA, grupo III (barras grises).

Análisis de la respuesta inmune contra antígenos timo-dependientes

En la figura 8 se observa la respuesta contra un antígeno timo-dependiente en los diferentes grupos estudiados. Siete días después de iniciado el tratamiento el título de anticuerpos en los grupos tratados con CsA fue significativamente menor al observado en los animales no tratados (Kruskall Wallis; $p < 0.05$). Por otra parte, los animales con LTME sin CsA (grupo II), presentaron títulos significativamente menores a los que presentaron los animales sin lesión y sin CsA (grupo IV) (Kruskall Wallis; $p < 0.05$). Estos valores se mantuvieron durante todo el seguimiento.

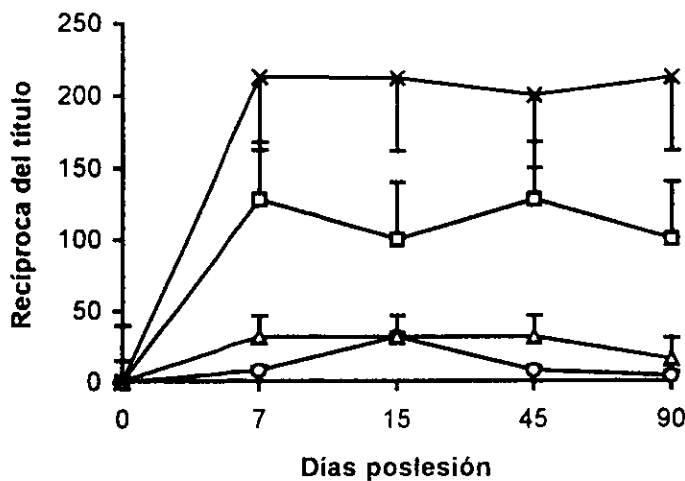
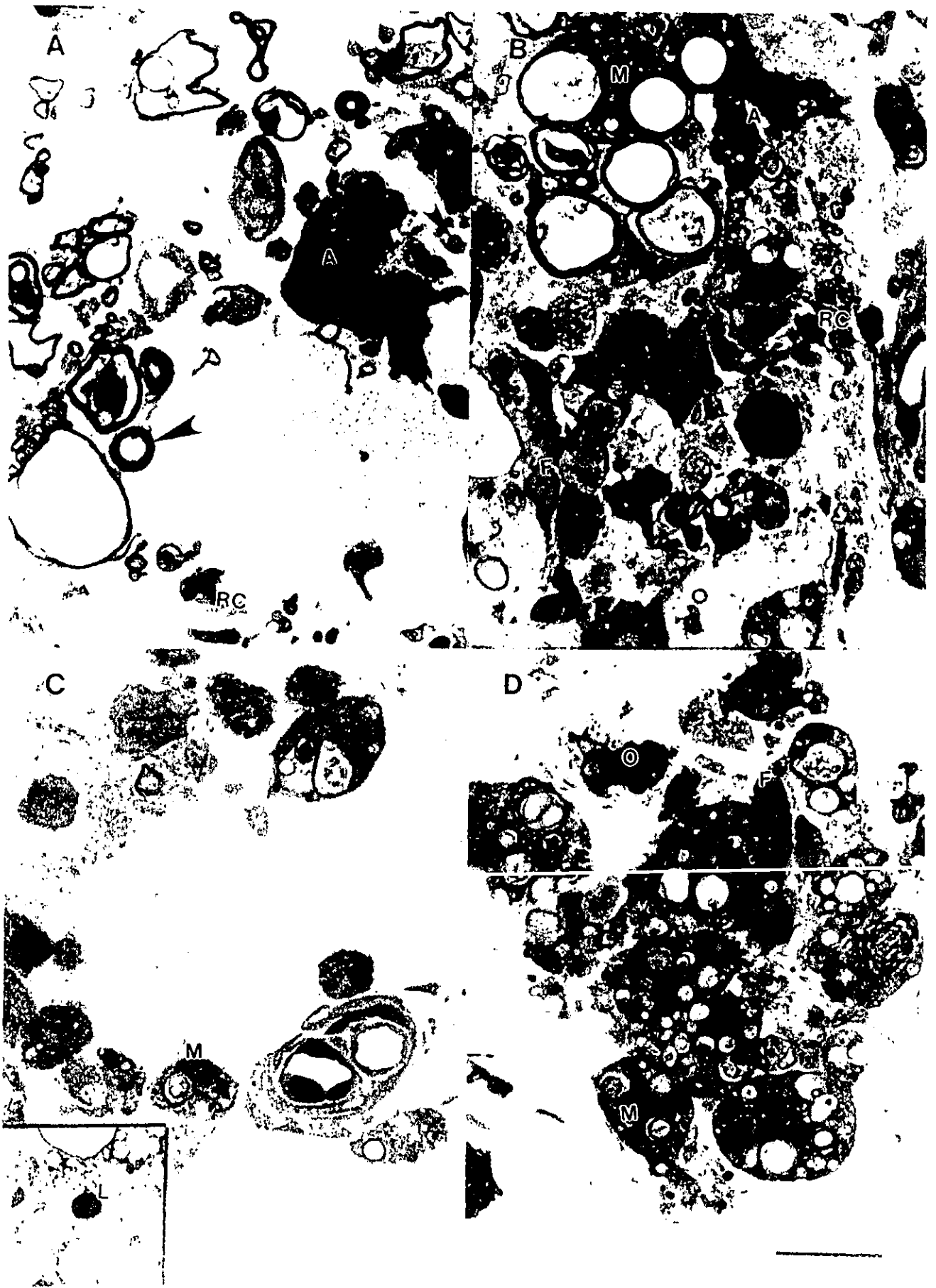


FIGURA 8. Evaluación de la respuesta humoral por hemaglutinación a un antígeno timodependiente (eritrocitos de carnero) en los grupos estudiados. Ratas con: LTME + CsA, grupo I (círculos); LTME sin CsA, grupo II (cuadros); laminectomía + CsA, grupo III (triángulos) y sin procedimiento quirúrgico y sin CsA, grupo IV (cruces).

Evaluación de la proporción de células inmunes en la zona de lesión

Las ratas con LTME+CsA presentaron un grado I (1 a 2 células por campo) de la escala propuesta, mientras que los animales con LTME sin CsA presentaron un grado III (5 a 6 células por campo). La figura 9 demuestra que los animales que recibieron el tratamiento con CsA presentaron menor proporción de células inmunes en la zona de lesión, con respecto a los animales que no recibieron el tratamiento, en este último caso se observaron sobre todo macrófagos e incluso linfocitos T.

FIGURA 9. Micrografías de luz de cortes de médula espinal de animales con LTME, 15 días después de la lesión. LTME + CsA (A y B) y sin CsA (C y D). En la figura A, observamos una de las zonas con mayor destrucción. En este caso se aprecia, un moderado número de axones de diverso calibre (flechas) todos con una vaina de mielina compacta. Además se observan restos citoplásmicos y cúmulos de astrocitos. En la figura B se ilustra una región con menor destrucción de tejido neural en la que observamos también algunos astrocitos, axones de diverso calibre (flechas), algunos fibroblastos, restos citoplásmicos y macrófagos. En la figura C se ilustra una zona de mayor destrucción en uno de los animales no tratados con CsA. En las regiones perivasculares se observan numerosos macrófagos que contienen restos celulares. En el inserto de la figura C se observa un linfocito tomado de una zona aledaña a la imagen presentada. Finalmente en la figura D se presenta una zona con gran cantidad de macrófagos y otros tipos celulares que parecen ser fibroblastos y oligodendrocitos. RC= restos citoplásmicos; A= astrocitos; F= fibroblastos; L= linfocito; M= macrófago; O= oligodendrocito. Barra = 24 μ m.



Respuesta celular específica

En la figura 10 se observa el IP (índice de proliferación) de los 4 grupos estudiados, quince días después de iniciado el estudio. Las ratas de los grupos testigo (grupos III y IV) no presentaron proliferación celular a ninguna de las concentraciones del extracto crudo. Entre ambos grupos no existió una diferencia significativa en el IP. Por otra parte, los animales lesionados que recibieron CsA no presentaron un IP significativamente mayor al de los grupos testigo ($p= 0.3$). Los animales lesionados sin CsA, presentaron un IP positivo y además significativamente mayor ($p= 0.05$) al de los grupos testigo; más aun, fue mayor al de las ratas con LTME + CsA, sobre todo cuando se utilizó una concentración de $30\mu\text{m}/\text{mL}$ de antígeno en los experimentos, con las demás concentraciones la diferencia no fue significativa. La respuesta a mitógenos, no presentó diferencias significativas entre los grupos en relación a la proliferación a ConA, sin embargo, con respecto a la PHA, en las ratas con LTME el IP se observó significativamente menor al que presentaron los grupos sin lesión ($p < 0.05$).

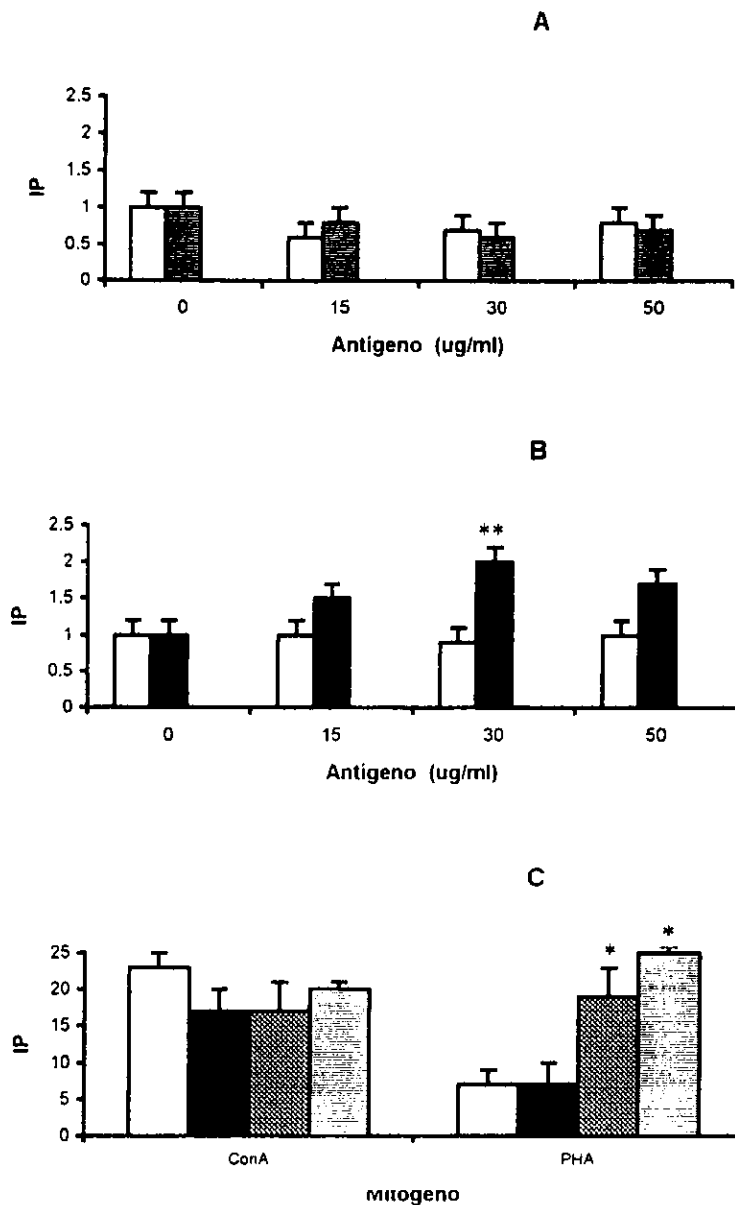


FIGURA 10. Índice de proliferación de linfocitos 15 días después de iniciado el estudio. A y B proliferación al antígeno neural. A) Grupos testigo, ratas con: laminectomía y sin CsA (barras blancas); laminectomía + CsA (barras a rayas). B) Grupos experimentales, ratas con: LTME + CsA (barras blancas); LTME sin CsA (barras negras). C) Respuesta general a mitógenos, ratas con: LTME + CsA (barras blancas); LTME sin CsA (barras negras); laminectomía + CsA (barras a cuadros); laminectomía sin CsA (barras con rayas horizontales). ** Significativamente diferente a LTME+CsA ($p < 0.05$). * Significativamente diferente a los grupos con LTME ($p < 0.05$).

Cuarenta y cinco días después, (figura 11), no se observaron cambios significativos en lo referente al IP contra el antígeno neural (extracto de médula espinal). Los animales de los grupos I (LTME + CsA) y III (laminectomía + CsA) continuaron con IP de 1.0 y las ratas del grupo II (LTME sin CsA) con un IP positivo (figura 11 A). En este caso, el IP de los animales con LTME sin CsA siguió siendo significativamente mayor ($p = 0.05$) al de los otros grupos. Por otra parte, la respuesta a ConA siguió presentándose sin diferencias significativas entre los 3 grupos y más aún, tampoco se observaron en este caso diferencias significativas cuando las células se incubaron con PHA ($p > 0.05$) (figura 11 B).

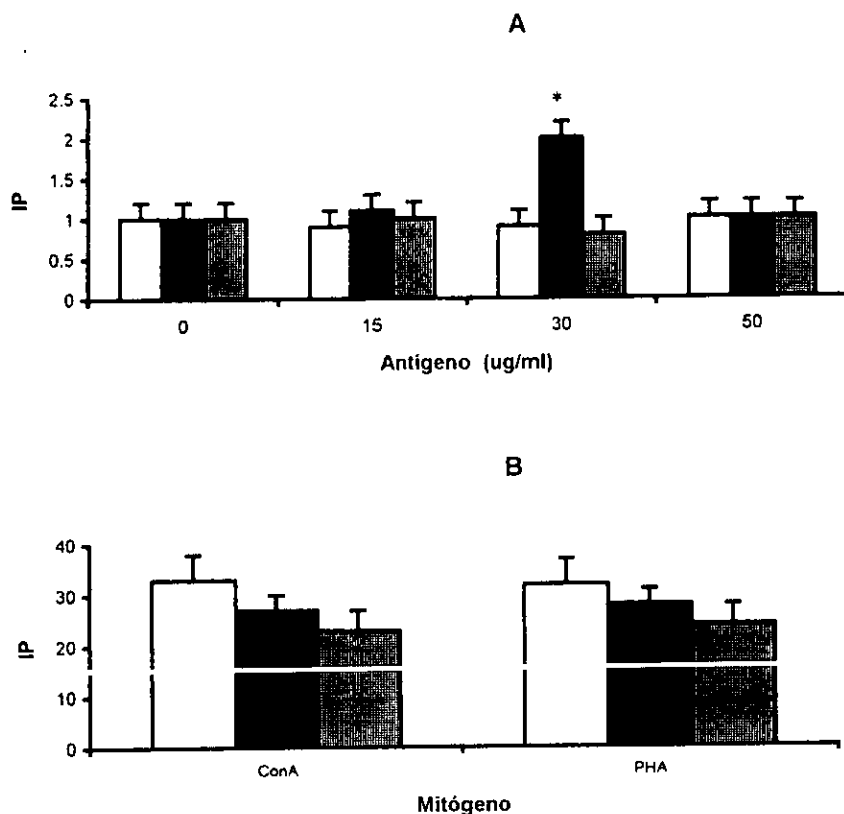


FIGURA 11. Índice de proliferación de linfocitos, 45 después de iniciado el estudio. A) Proliferación celular al antígeno neural en los grupos estudiados. B) Respuesta general a mitógenos Ratas con: LTME + CsA (barras blancas); LTME sin CsA (barras negras); laminectomía + CsA (barras a cuadros). *Significativamente diferente con respecto a los otros grupos ($p=0.05$).

Noventa días después de iniciado el estudio, no se observó ninguna diferencia significativa entre los tres grupos cuando las células fueron incubadas con el antígeno neural (figura 12 A). En ninguno de los casos se presentó un IP positivo. Los animales lesionados y sin tratamiento inmunosupresor ya no presentaron en este caso un IP mayor a 1.5, más aún éste no fue significativamente diferente al de los otros grupos. La respuesta a mitógenos también fue muy similar en los tres grupos, en ninguno de los casos se demostró una diferencia significativa ($p > 0.05$) (figura 12 B). En este caso el IP comparado con el obtenido a los 15 y 45 días fue mayor.

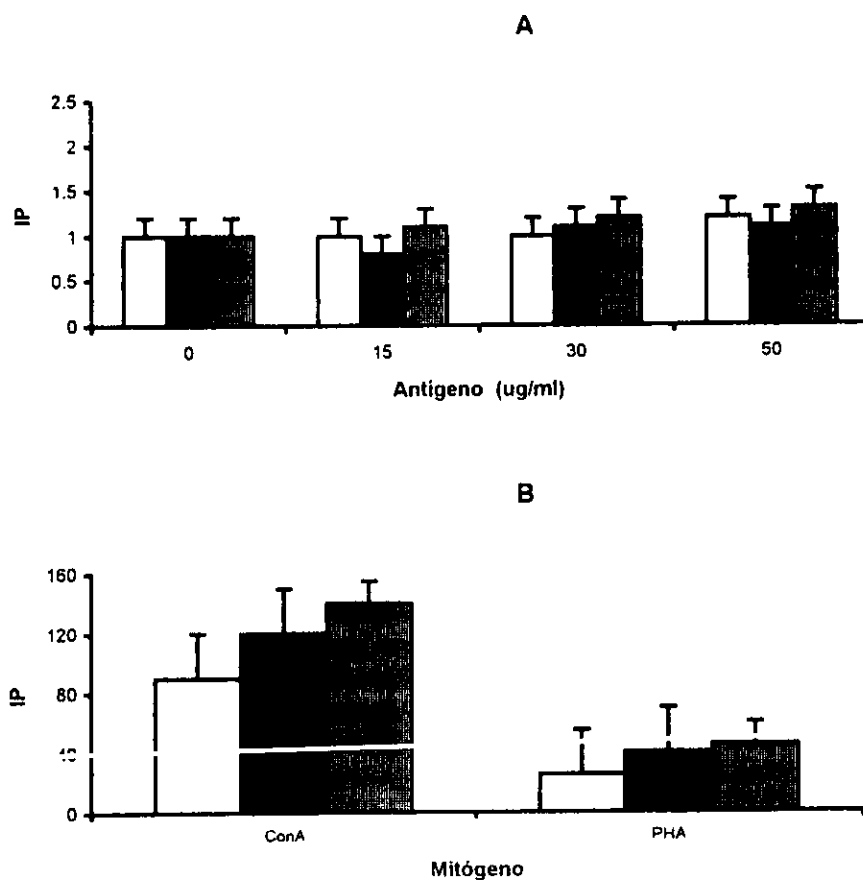


FIGURA 12. Índice de proliferación de linfocitos 90 días después de iniciado el estudio. A) Proliferación al antígeno neural en los grupos estudiados. B) Respuesta general a mitógenos. Ratas con: LTME + CsA (barras blancas); LTME sin CsA (barras negras); laminectomía + CsA (barras grises).

Análisis morfométrico

Porcentaje de tejido preservado

No existió diferencia significativa entre los dos grupos testigo 15 días después de iniciado el estudio, por lo que el análisis de los cortes posteriores (45 y 90 días) sólo se realizó con los animales del grupo III. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las áreas obtenidas en cada corte para los grupos testigo (III y IV), por lo que se decidió promediar las áreas observadas en los 3 cortes y asumir como 100% de tejido medular al promedio resultante que fue 8.41 mm^2 , para así mismo tomar este valor como base de comparación con los grupos experimentales (figura 13).

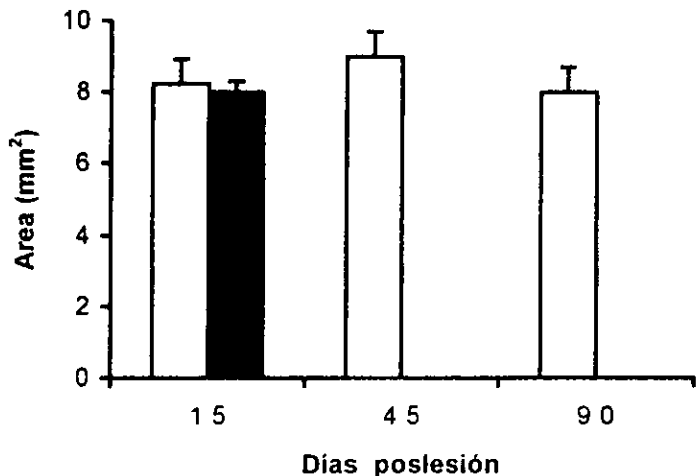


FIGURA 13. Área total en mm^2 de tejido medular en el segmento analizado de los grupos testigo. Ratas con: laminectomía + CsA (barras blancas); laminectomía sin CsA (barras negras).

Al realizar el análisis morfométrico (figura 14) se observó que desde el inicio, los animales con tratamiento inmunosupresor presentaron una mayor preservación del tejido medular con respecto a los que no recibieron el tratamiento, esta diferencia se mantuvo aunque en menor grado durante

todo el estudio, sin embargo, en ninguno de los cortes la diferencia llegó a ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

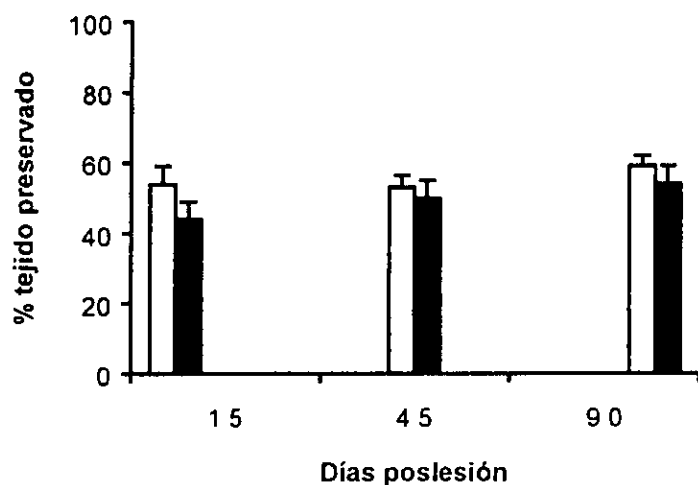
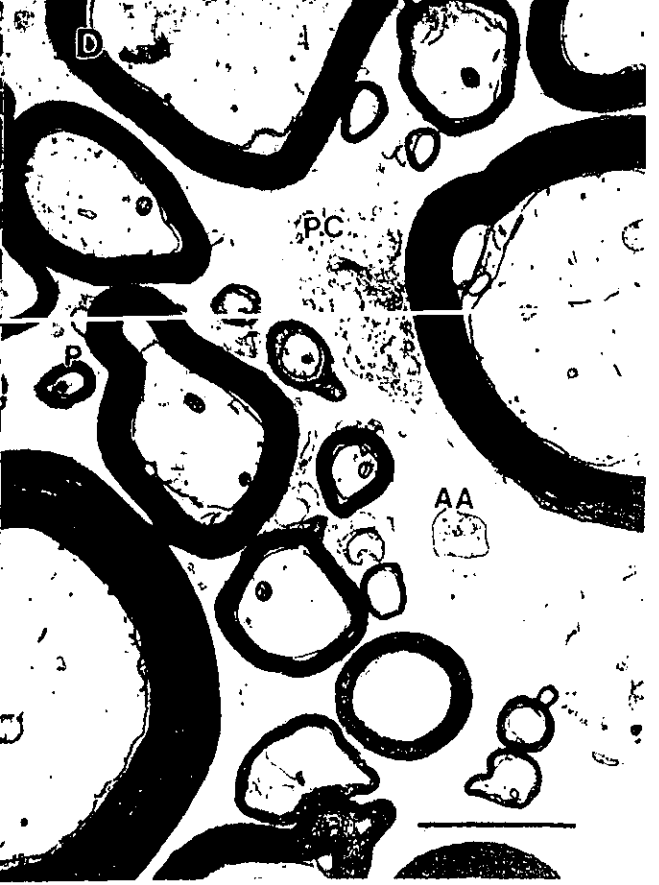
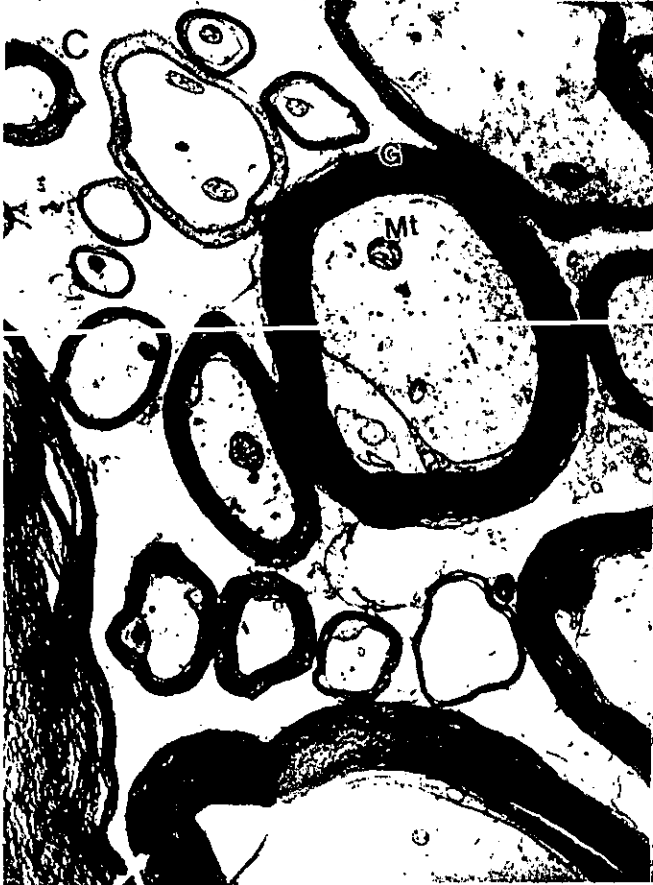
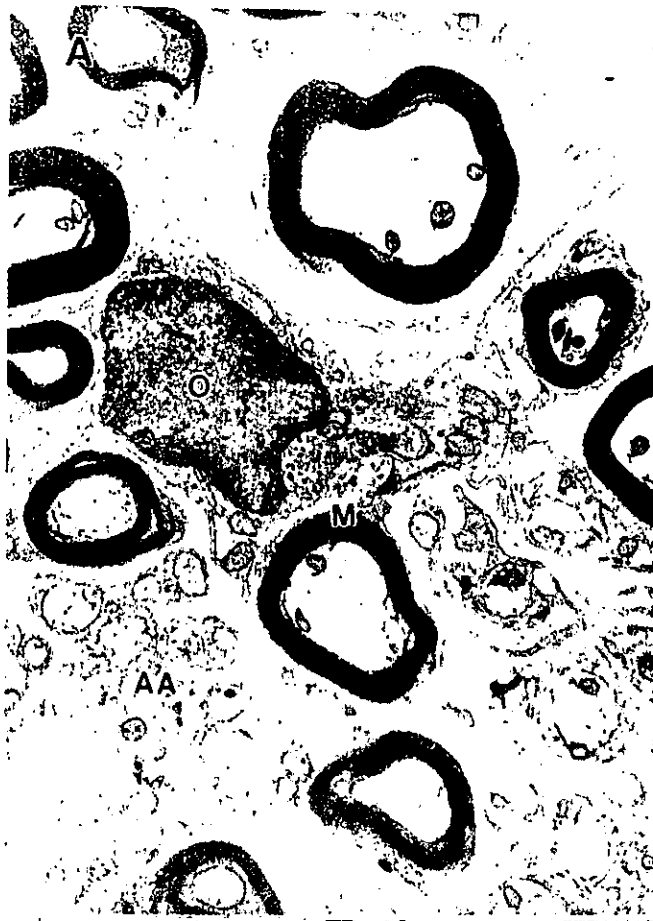


FIGURA 14. Porcentaje de tejido medular preservado en los grupos experimentales. Ratas con: LTME + CsA (barras blancas); LTME sin CsA (barras negras).

Análisis ultraestructural del epicentro de la lesión

En la figura 15 se muestra la imagen ultraestructural representativa del segmento analizado en los grupos testigo. Desde el punto de vista morfológico, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Se observaron axones de diferentes calibres con mielina compacta y con mitocondrias preservadas.

FIGURA 15. Micrografías de cortes de médula espinal de la zona analizada en ratas con laminectomía sin CsA (A y B) y con CsA (C y D). En todos los casos se aprecian axones de pequeño, mediano y mayor calibre, la mayor parte de ellos con vainas de mielina compacta. En la figura A observamos algunos conglomerados de axones amielínicos y una célula oligodendroglial. Las figuras B y C ilustran imágenes similares, en ambas observamos axones mielinizados de diferente calibre y se observa claramente la buena preservación de las mitocondrias axonales. En la figura D, observamos axones con vainas mielínicas compactas, axones amielínicos y algunas prolongaciones citoplásmicas gliales. P= axones de pequeño calibre; M= axones de mediano calibre; G= axones de mayor calibre; AA= axones amielínicos; O= oligodendrocitos; Mt= mitocondrias; PC= prolongación citoplásmica. Barra = 2.4 μm .



Cuando esta misma región fue analizada en los grupos experimentales se observaron diferentes grados de destrucción. Quince días después de la lesión, las ratas que no recibieron el tratamiento presentaron un mayor número de axones desmielinizados en relación a las que si recibieron el tratamiento, además estas últimas presentaron una mayor proporción de axones, sobretodo de pequeño calibre y una menor cantidad de restos celulares. Los animales no inmunosuprimidos presentaron también una mayor cantidad de fibroblastos y colágena en comparación con las ratas inmunosuprimidas (figura 16).

A los 45 días (figura 17), las ratas lesionadas que recibieron el tratamiento, siguieron presentando una mayor cantidad de axones, sobre todo con diámetro menor a $0.5\mu\text{m}$, en relación a las que no recibieron el tratamiento, parte de los axones se observaron en proceso de mielinización por parte de células de Schwann y oligodendrocitos. En los animales sin tratamiento, varios de los axones preservados se encontraron desmielinizados y además se observaron cantidades variables de mielina desorganizada.

Finalmente a los 90 días, las ratas tratadas presentaron varios axones con diámetro menor a $0.5\mu\text{m}$, mismos que en su mayoría se encontraron mielinizados o en proceso de mielinización por parte de células de Schwann u oligadendrocitos. Los animales no tratados presentaron un menor número de axones, de los cuales varios se observaron desmielinizados (figura 18).

FIGURA 16. Micrografías de cortes de médula espinal de una zona de los grupos experimentales 15 días después de la lesión de la médula espinal (LME). Ratas con LME + CsA (A y B) y sin CsA (C y D). En las figuras A y B se observa una buena cantidad de axones la mayoría de ellos mielinizados. La mielina se aprecia compacta en la figura A y menos compacta en la figura B. Así mismo se observan axones con diámetro menor a $0.5 \mu\text{m}$ (flechas), restos citoplásmicos y algunas prolongaciones citoplásmicas de células gliales. En las figuras C y D se observa una menor cantidad de axones, que en su mayoría están desmielinizados (*) o con una mielina poco compacta. En C se observa colágena, un fibroblasto, la prolongación de un fibroblasto y lo que podría ser una célula de la microglia por las vesículas en su interior. MC= mielina compacta; MP= mielina poco compacta; RC= restos citoplásmicos; PC= prolongación citoplásmica; F= fibroblastos; PF= prolongación de fibroblasto; PM= prolongación de célula de la microglia; C= colágena. Barra= $2.4 \mu\text{m}$



FIGURA 17. Micrografías de cortes de médula espinal de una zona de los grupos experimentales 45 días después de la LME. Ratas con LME + CsA (A y B) y sin CsA (C y D). En las figuras A y B se observan axones que en su mayoría, están mielinizados y varios de ellos tienen un diámetro menor a $0.5 \mu\text{m}$ (flechas), solo unos cuantos están desmielinizados (*). Además se observan prolongaciones muy probablemente de un oligodendrocito y células de Schwann mielinizando algunos axones. En las figuras C y D de animales no tratados con CsA se observa tejido destruido con axones desmielinizados (*), axones con diámetro menor a $0.5 \mu\text{m}$ (flechas) y mielina desorganizada. O= oligodendrocito; SW= células de Schwann; MD= mielina desorganizada. Barra = $2.4 \mu\text{m}$

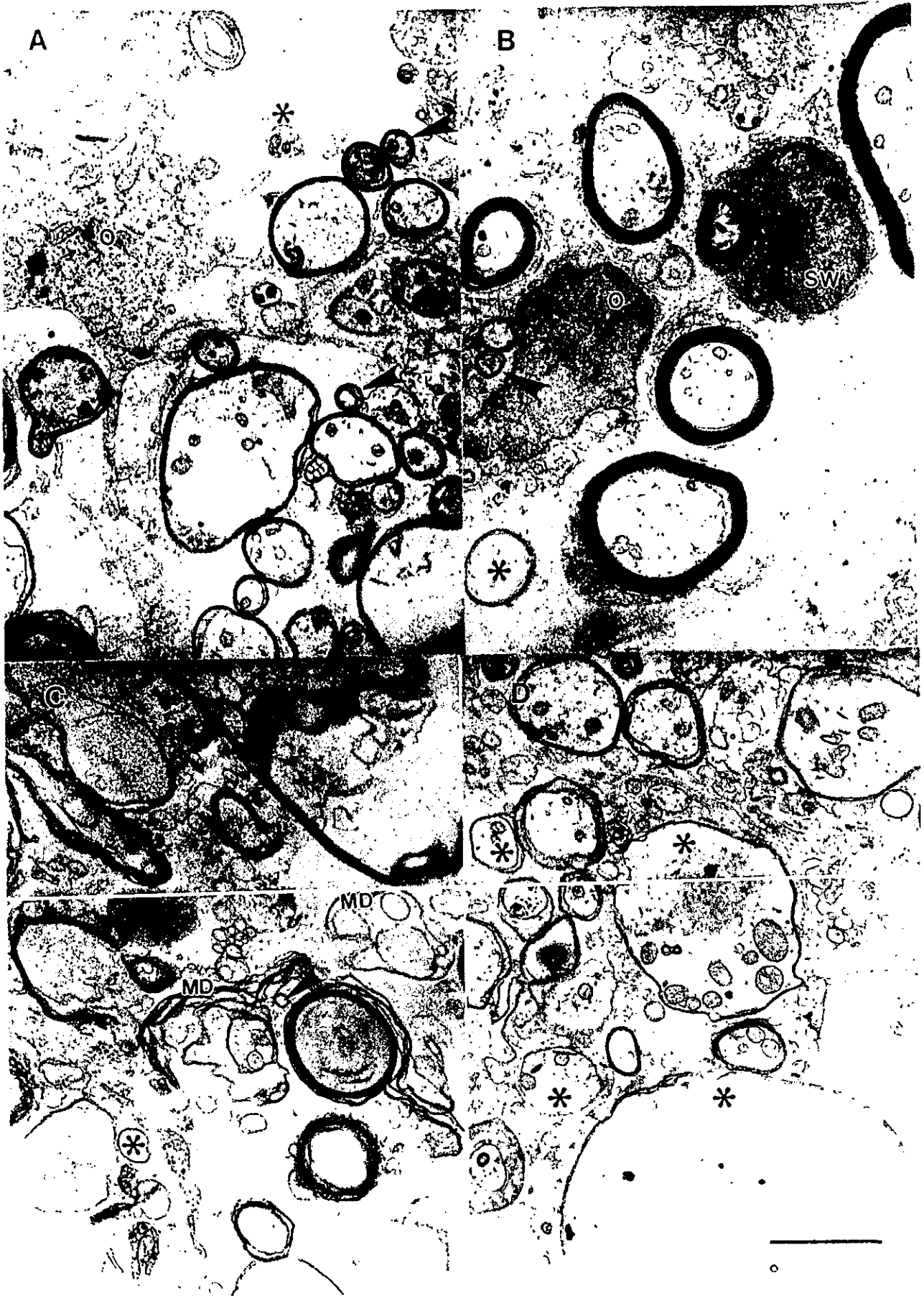


FIGURA 18. Micrografías de cortes de médula espinal de una zona de los grupos experimentales 90 días después de la LME. Ratas con LME + CsA (A y B) y sin CsA (C y D) En A y B, se observan numerosos axones todos mielinizados y varios de ellos de diámetro menor a $0.5\mu\text{m}$ (flechas). Además se observan células de Schwann mielinizando algunos axones y prolongaciones oligodendrogliales envolviendo axones de pequeño calibre. En C y D, se observa una menor cantidad de axones de los cuales muy pocos presentan una vaina de mielina compacta; la mayoría de ellos se encuentran desmielinizados (*). Además observamos prolongaciones gliales, colágena y algunos restos citoplásmicos. SW= células de Schwann, PO= prolongaciones oligodendrogliales; C= colágena, RC= restos citoplásmicos. Barra = $2.4\mu\text{m}$



En la figura 19 se observa el IM (índice de mielinización) de los 4 grupos estudiados. Quince días después de iniciado el estudio no existió diferencia significativa entre los grupos testigo, ambos presentaron un IM promedio de 0.7; este IM fue significativamente menor al de los grupos de animales lesionados ($p = 0.005$) quienes presentaron un IM de 0.77 (LTME+CsA) y 0.87 (LTME sin CsA). En el grupo III (laminectomía + CsA), no se observaron cambios significativos en los días 45 y 90, cuando fueron comparados con el del día 15. En los grupos con LTME, desde los 15 días, las ratas que recibieron la CsA presentaron un IM significativamente menor al de las ratas sin CsA ($p = 0.001$). Esta diferencia se mantuvo a los 45 ($p = 0.001$) y a los 90 días ($p < 0.001$) de iniciado el estudio.

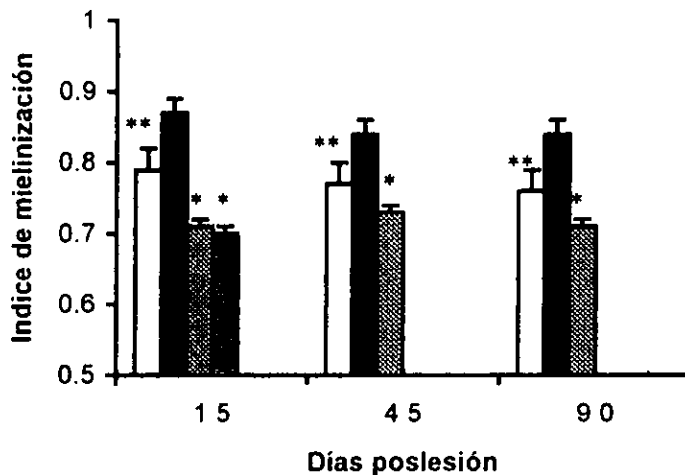


FIGURA 19. Índice de mielinización de los grupos estudiados a los 15, 45 y 90 días. Ratas con: LTME+ CsA (barras blancas), LTME sin CsA (barras negras), laminectomía + CsA (barras a cuadros), laminectomía sin CsA (barras a rayas). * Diferencia significativa con respecto a los grupos con LTME ($p = 0.005$). ** Diferencia significativa con respecto al grupo con LTME sin CsA ($p < 0.001$).

El análisis sobre la distribución del IM en los diferentes grupos, mostró un patrón unimodal en los grupos testigo a los 15 días de iniciado el estudio (figura 20 A). En ambos el IM oscilo entre 0.6 y

0.7 en el 80% de las fibras, presentándose en una mayor proporción el de 0.7 (35%). El 12% de las fibras presentaron un IM de 0.55 y el 8% restante correspondió a fibras con IM entre 0.75 y 0.9. A los 15 días posesión, los animales con LTME + CsA presentaron una cantidad significativamente mayor de fibras con IM entre 0.6 y 0.75 (52 %) con respecto a los animales con LTME sin CsA (29%) ($p < 0.05$). En ambos casos el IM predominante fue el de 0.75 (24% en LTME+ CsA y 11% en LTME sin CsA). Por otra parte, el porcentaje de fibras con IM entre 0.8 y 1, fue significativamente menor en el grupo con CsA (44%) con respecto al grupo no tratado (68%) ($p < 0.05$); más aún, los animales con LTME sin CsA presentaron una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) de fibras desmielinizadas (IM= 1) (24%) comparado con el número observado en las ratas con LTME + CsA (7%). Cuarenta y cinco días después de iniciado el estudio, las ratas del grupo testigo (laminectomía + CsA), no presentaron diferencias con respecto a los valores que se observaron en el corte de 15 días (figura 20 B). La distribución del IM fue similar. En los grupos con LTME, la proporción de fibras observadas con IM entre 0.6 y 0.75 no presentó cambios significativos (52% en LTME + CsA y 28% en LTME sin CsA) al igual que las proporciones observadas para las fibras con IM entre 0.8 y 1 (38% para LTME + CsA y 69% para LTME sin CsA) con respecto al análisis de los 15 días; sin embargo, en el grupo de LTME + CsA el IM predominante fue el de 0.7 (15% de las fibras) mientras que en los animales con LTME sin CsA los IM predominantes fueron los de 0.8 (20%) y 1 (15%). Aunque el grupo de LTME sin CsA presentó una disminución en la proporción de fibras desmielinizadas con respecto al corte de 15 días, éste siguió presentando un número significativamente mayor ($p < 0.05$) de fibras con IM de 1 al que presentó el grupo de LTME + CsA. Noventa días después de iniciado el estudio (figura 20 C) el grupo testigo (laminectomía + CsA) continuó presentando un patrón similar al de los cortes en los días 15 y 45. Los animales con LTME + CsA presentaron un patrón muy similar al observado a los 45 días, el porcentaje de fibras con IM entre 0.6 y 0.75 fue del 55% mientras que el de fibras con IM entre 0.8 y 1 fue del 44%. En lo que respecta al grupo de animales con LTME sin CsA, el porcentaje de fibras con IM entre 0.6 y 0.75 fue del 38% valor que siguió siendo significativamente menor ($p < 0.05$) al de los animales con LTME + CsA; la cantidad de fibras con

IM entre 0.8 y 1 fue del 62% porcentaje que también continuó siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) al presentado por el grupo con LTME + CsA, además siguieron presentando para este corte, una cantidad significativamente mayor ($p = 0.05$) de fibras con IM de 1 (14%) con respecto a los animales con LTME + CsA (4%).

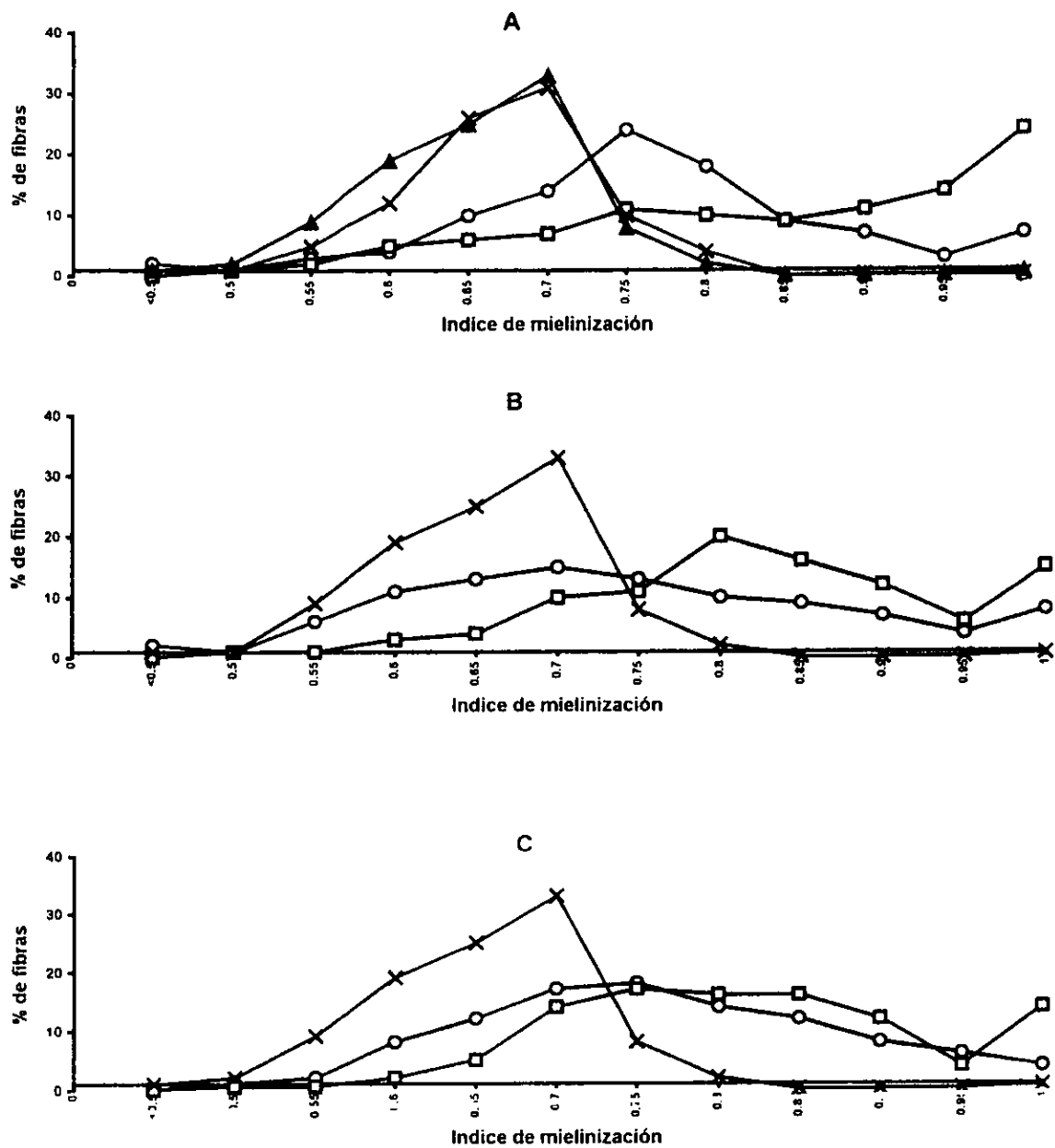


FIGURA 20. Distribución del IM a los 15 (A), 45 (B) y 90 (C) días en los grupos estudiados. Ratas con: LTME + CsA (círculos); LTME sin CsA (cuadros); laminectomía + CsA (cruces) y laminectomía sin CsA (triángulos).

En la figura 21A se observa que la distribución del diámetro axonal en los grupos testigo fue unimodal y sin presentar diferencias significativas entre ellos a los 15 días de iniciado el estudio. La mayor cantidad de fibras presentó un diámetro entre 0.5 y 1 μm (50%); el 35% se constituyó por fibras con diámetro entre 1 y 2 μm ; el 8% por fibras menores de 0.5 μm y el 7% por fibras entre 2 y 5 μm . También a los 15 días de iniciado el estudio, los grupos con LTME presentaron una gran cantidad de fibras con diámetro entre 0.5 y 1 μm (43% LTME + CsA y 41% LTME sin CsA), porcentaje que no fue estadísticamente diferente al de los grupos testigo ($p= 0.07$), sin embargo en los grupos con LTME el número de fibras con diámetro entre 1 y 2 μm (24% LTME + CsA y 19% LTME sin CsA) fue significativamente menor ($p< 0.05$) al de los grupos testigo. La cantidad de fibras con diámetro menor a 0.5 μm en los grupos con LTME (26% LTME + CsA y 20% LTME sin CsA) fue significativamente mayor ($p< 0.05$) al de los grupos con laminectomía. Cuarenta y cinco días después de iniciado el estudio (figura 21 B), el grupo con laminectomía + CsA no presentó cambios significativos con respecto a los valores observados a los 15 días, sin embargo en los grupos con LTME si se presentaron algunos cambios. Las fibras menores de 0.5 μm constituyeron el 38% de los axones en los animales con LTME + CsA, este porcentaje fue significativamente mayor ($p< 0.05$) al que presentaron los animales con LTME sin CsA (21%) donde dichas fibras se mantuvieron en forma similar al día 15. La proporción de fibras entre 0.5 y 1 μm de diámetro en los grupos con LTME (36% LTME + CsA y 46% LTME sin CsA) no presentaron cambios significativos. Las fibras de 1 a 2 μm en el grupo con LTME + CsA disminuyeron (14%) y en el grupo con LTME sin CsA aumentaron (27%) con respecto al día 15. A los 90 días (figura 21 C) los animales con laminectomía + CsA presentaron nuevamente un patrón de distribución similar al presentado a los 15 y 45 días sin cambios significativos en cuanto a la cantidad de fibras para los distintos diámetros analizados. En cuanto a los grupos con LTME, el porcentaje de fibras menores a 0.5 μm disminuyó en las ratas con LTME + CsA (29%) sin embargo, aún así siguió siendo significativamente mayor ($p< 0.05$) al de los animales con LTME sin CsA (19%). El porcentaje de las fibras con diámetro entre 0.5 y 1 μm se mantuvo sin cambios significativos en ambos grupos (42% LTME + CsA y 45% LTME sin CsA), mientras que el de las fibras entre 1 y 2 μm aumentó

en ambos grupos siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales sin CsA (59%) con respecto a que recibieron el fármaco (27%).

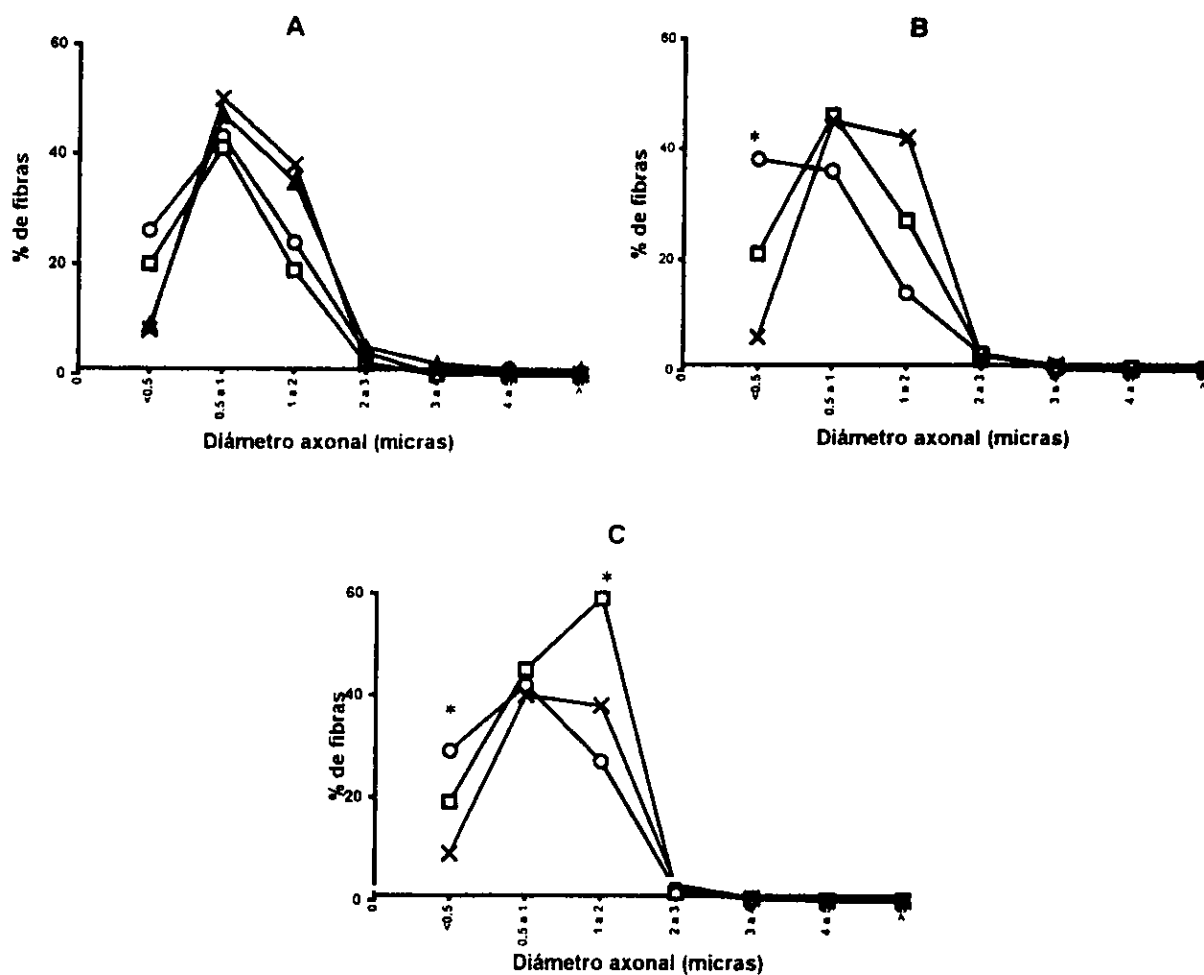


FIGURA 21. Distribución del diámetro axonal a los 15 (A), 45 (B) y 90 (C) días en los 4 grupos estudiados. Ratas con : LTME + CsA (círculos); LTME sin CsA (cuadros); laminectomía + CsA (cruces) y laminectomía sin CsA (triángulos). * Valor estadísticamente diferente al del resto de los grupos.

Evaluación clínica

Análisis de huellas podales

En la figura 22 se muestran los resultados a la prueba de longitud de zancada (LZ). Los animales con laminectomía + CsA presentaron durante todo el seguimiento un 100% de eficiencia. En los grupos con LTME, las ratas con CsA presentaron desde los 15 días posteriores a la lesión una recuperación (47%) significativamente mayor ($p= 0.05$) a la de los animales sin CsA (27% de eficiencia). Ambos grupos siguieron presentando recuperación a los 45 días, pero ésta fue significativamente mayor en el grupo con CsA ($p= 0.003$). A los 90 días, la recuperación siguió siendo mayor en los animales con LTME + CsA (82%) con respecto a los de LTME sin CsA (69% de eficiencia) ($p= 0.05$).

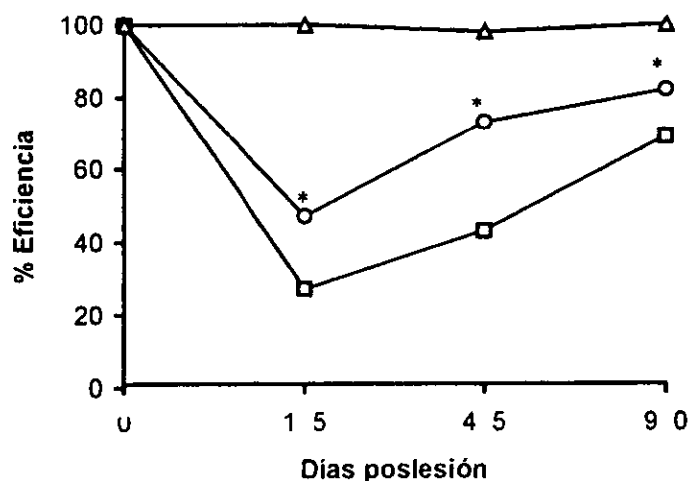


FIGURA 22. Análisis de las huellas podales (longitud de zancada) en los grupos estudiados. Ratas con: LTME + CsA (círculos), LTME sin CsA (cuadros) y laminectomía + CsA (triángulos). * Valor significativamente diferente al de las ratas con LTME sin CsA ($p < 0.05$).

En la figura 23 se muestran los resultados a la prueba de base de sustentación (BS). El grupo con laminectomía + CsA presentó un 100% de eficiencia durante todo el estudio. En lo que respecta a los grupos con LTME, las ratas tratadas con CsA presentaron una recuperación significativamente mayor ($p= 0.05$) a la de los animales sin CsA a partir de los 15 días, misma que continuó hasta los 90 días del seguimiento con un 75% de eficiencia para los animales con CsA y un 58% para los no tratados.

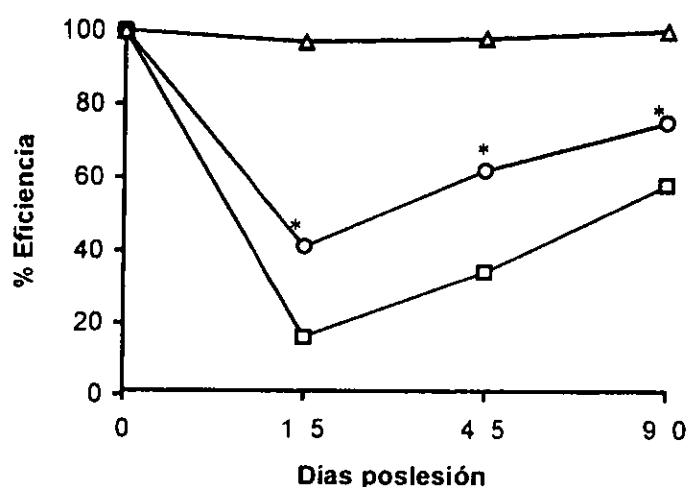


FIGURA 23 Análisis de las huellas podales (base de sustentación) en los grupos estudiados. Ratas con; LTME + CsA (círculos), LTME sin CsA (cuadros) y laminectomía + CsA. * Valor significativamente diferente al de las ratas con LTME sin CsA ($p= 0.05$).

Análisis prueba de la rejilla

En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de la rejilla. En este caso nuevamente los animales con laminectomía + CsA presentaron durante todo el estudio 100% de eficiencia. En lo referente a los grupos con LTME, las ratas con CsA presentaron a partir del día 45 una recuperación significativamente mayor ($p < 0.05$) a la de los animales sin el fármaco. A los

90 días se observó una disminución en el porcentaje de eficiencia en los grupos con LTME. Aún así, la diferencia significativa observada a los 45 días persistió hasta el día 90 del estudio ($p= 0.05$) donde los animales con CsA presentaron un 29% y los no tratados un 12% de eficiencia.

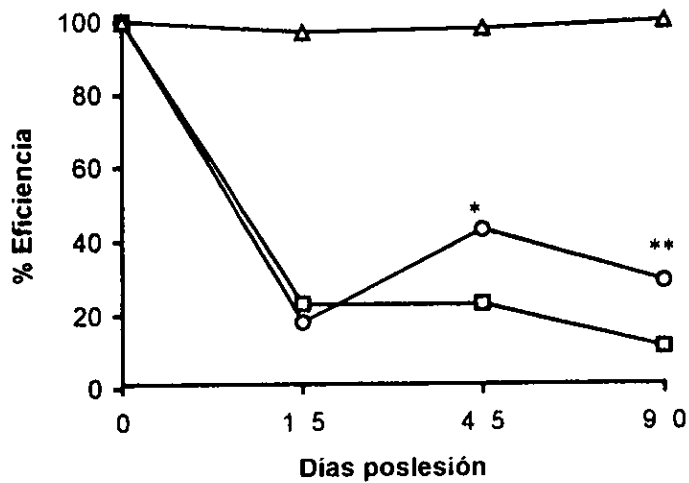


FIGURA 24. Evaluación de la prueba de la rejilla en los grupos estudiados. Ratas con: LTME + CsA (círculos), LTME sin CsA (cuadros), laminectomía + CsA (triángulos). * Valor significativamente diferente al del grupo con LTME sin CsA ($p < 0.05$); ** ($p = 0.05$).

DISCUSIÓN

La limitada capacidad de regeneración en la médula espinal, puede deberse a mecanismos de tipo autoinmune dirigidos contra constituyentes de la ME, mismos que se activan después de una lesión. Si recordamos que el SI desde la etapa embrionaria es “educado” para reconocer como propios a los constituyentes del organismo (Roitt y cols. 1996) es difícil pensar que el SI aún en condiciones fisiológicas, sea capaz de desarrollar una respuesta inmune en contra de constituyentes del propio organismo. Varios estudios han sugerido que después de una lesión en la ME, el SI puede ser capaz de desarrollar una respuesta autoinmune en contra de los antígenos neurales (Mizrachi y cols 1983, Teichner y cols. 1993), misma que puede estar funcionando como factor importante en la inhibición de una probable regeneración neural. Parecería muy interesante la aplicación de un tratamiento inmunosupresor en lesiones de ME, mismo que al inhibir la supuesta respuesta autoinmune, originase un microambiente propicio para la regeneración. Algunos estudios se han dirigido a demostrar lo antes dicho (Feringa y cols. 1975; Palladini y cols 1996). Estos trabajos sugieren que el SI puede estar involucrado como factor importante en la limitada regeneración de la ME lesionada. Son pocos los estudios que se han realizado al respecto, en algunos casos, no se logró demostrar la existencia de una respuesta inmune específica contra antígenos neurales después de una lesión en la ME (Willenborg y cols 1977), por lo que aún existe controversia con respecto a la participación del SI como uno de los factores que influyen en la regeneración limitada de la ME y debido a esto son necesarios estudios que, en primer lugar, demuestren la existencia de dicha respuesta autoinmune y que, en segundo lugar, demuestren también que al inhibir dicha respuesta por medio de mecanismos inmunosupresores, se origina un microambiente favorable para la regeneración y que además dicha regeneración logre traducirse en recuperación funcional.

El primer objetivo de este trabajo fue identificar una respuesta celular específica contra antígenos neurales en modelos con LTME. Los resultados demuestran que al menos en el modelo utilizado, existe una respuesta celular dirigida contra alguno de los componentes del extracto crudo de la ME. Dicha respuesta, se presentó entre los 15 a los 45 días poslesión, estando ausente para el día 90.

Lo anterior indica una respuesta inmune temporal dirigida contra los antígenos neurales, misma que después de un tiempo desaparece. Determinar el tiempo exacto en el que dicha respuesta desaparece, es un tópico de interés que se podría retomar en trabajos posteriores, por el momento, lo importante es tratar de explicar porque desaparece una vez que se desarrolló. Se sabe que al activarse la respuesta celular, parte de los linfocitos CD4+ participan en la fase efectora secretando una serie de sustancias activadoras denominadas linfocinas, la vida media de estas células es solo de algunas semanas. Otra parte de los linfocitos CD4+ queda como células de memoria, mismas que no entran en la fase efectora, pero que su función principal es continuar protegiendo al organismo contra un nuevo ataque del agente agresor o antígeno, originando una respuesta mucho más rápida y más eficiente cuando tienen contacto nuevamente con éste (Roitt y cols.1996). Se sabe que estos linfocitos pueden sobrevivir incluso por años a diferencia de los linfocitos no estimulados. Tomando como referencia estos datos y regresando a los resultados, una vez que se ha desarrollado la respuesta celular contra los antígenos neurales, se esperaría encontrar esta respuesta, incluso más intensa a los 90 días del seguimiento; sin embargo, los resultados no mostraron esto. En un estudio realizado por David Gray (1991) se demostró que las células de memoria requieren tener contacto renovado con el antígeno para seguir vivas es decir la memoria, al igual que la tolerancia, es dependiente de antígeno, de tal forma que en ausencia del antígeno, las células de memoria podrían tener una vida media corta. Después de la lesión en la ME, uno de los primeros eventos es la reparación de la BHE y la formación de una cicatriz fibrogliosa, proceso que culmina aproximadamente 10 a 15 días después de la lesión (Grijalva 1992; Guizar-Sahagún 1994), aislando nuevamente al SNC del resto del organismo. Una de las posibles explicaciones de porque ya no se identificó una respuesta celular a los 90 días es que al repararse la BHE el SI ya no continua en contacto estrecho con los antígenos neurales y por consiguiente la vida media de las células de memoria disminuye a tal grado que para el día 90 ya no es posible detectar dicha respuesta. Por otra parte, también un fenómeno de tolerancia a los antígenos neurales puede ser el responsable de la falta de respuesta a los 90 días. La tolerancia por agotamiento clonal es el resultado de una respuesta inmune enérgica. Una confrontación antigénica repetida puede estimular

a todas las células que responden al antígeno, mismas que se diferencian en células efectoras de corta vida, sin que queden células de memoria para responder a una confrontación ulterior con el antígeno (Roitt y cols. 1996). Después de la lesión, al perderse la BHE, el SI se pone en estrecho contacto con grandes cantidades de antígenos neurales, hecho que bien pudo haber originado que todas las células inmunes se diferenciaron en células efectoras de corta vida sin que quedaran células de memoria que respondieran al estímulo antigénico de los 90 días. Finalmente, vale la pena mencionar que aunque se logró identificar una respuesta celular contra antígenos neurales en los animales lesionados, ésta no fue una respuesta de gran intensidad. Lo anterior podría estar originado por la inmunosupresión que se presenta después de una LTME, sobre todo en las fases aguda y subaguda (Cruse y cols. 1993; Cruse y cols. 1996). En pacientes con LTME, se ha descrito una inmunosupresión caracterizada por una disminución en la función de la inmunidad natural (células NK) y de la inmunidad adquirida (linfocitos T). La LTME podría afectar la respuesta inmunológica por: 1) Interrupción del flujo de señales del sistema nervioso simpático hacia los órganos linfoides; 2) Inmunosupresión mediada por corticosteroides, catecolaminas y endorfinas que se producen como respuesta al estrés que sufren estos pacientes; 3) Interrupción de señales de la periferia al SNC, lo que origina una disminución de la actividad inmunoreguladora neuronal (Cruse y cols 1996). Todos o alguno de dichos mecanismos podrían ser los responsables de la inmunosupresión observada en pacientes 2 semanas después de la LTME. En el presente trabajo se comprobó con los estudios de respuesta humoral a eritrocitos de carnero una disminución significativa de la respuesta inmunológica en los animales lesionados con respecto a los no lesionados, fenómeno que indica una inmunosupresión provocada por la LTME. Este fenómeno no había sido reportado en modelos experimentales con LTME, por tanto éste es también un hallazgo importante ya que abre el panorama a una nueva línea de investigación que se dirija a conocer en detalle los mecanismos causantes de la inmunosupresión poslesión, misma que también podría ser la causante de que la respuesta celular desaparezca a los 90 días. En este caso, la disminución en la función inmunológica puede estar impidiendo el desarrollo de una respuesta duradera y de buena intensidad. Independientemente de cual sea el mecanismo responsable de la ausencia de respuesta a

los 90 días, el hecho de que la respuesta solo se haya identificado a los 15 y 45 días, apunta a un fenómeno inmunológico temporal, es decir una reacción que probablemente no tenga mayor participación como factor destructivo en los estadios crónicos de la lesión. Sin embargo el fenómeno existe y como tal puede ser capaz de promover una mayor destrucción del tejido neural y además inhibir la regeneración por lo menos hasta el día 45 poslesión.

Por otra parte, en ninguno de los tiempos analizados (15, 45 y 90 días) se logró identificar una respuesta inmunológica celular contra antígenos neurales en los animales tratados con CsA, lo que demuestra que dicho fármaco fue capaz de inhibirla. Es evidente que el esquema inmunosupresor utilizado en este trabajo logró mantener inmunosuprimidos durante todo el experimento a los animales tratados con CsA. Por una parte, los niveles de CsA se mantuvieron siempre por arriba de la concentración mínima efectiva ($0.125\mu\text{g}/\text{mL}$) y nunca rebasaron los niveles considerados como tóxicos ($2000\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, la prueba de hemaglutinación (respuesta inmune a un antígeno timo dependiente) lo confirmó ya que los animales inmunosuprimidos presentaron títulos de anticuerpos anti-eritrocitos muy bajos durante todo el experimento con respecto a los altos títulos observados en animales no inmunosuprimidos. lo que asegura que la respuesta inmunológica de los animales tratados con CsA se encontraba suprimida. La CsA es un inmunosupresor que actúa selectivamente sobre los linfocitos T CD4+. Este fármaco actúa impidiendo la transcripción de la IL-2 y la del receptor para la IL-2, inhibe la función inmunológica del linfocito (Kahan 1989). Desde este punto de vista, se puede decir que la CsA provoca una inmunosupresión funcional. fenómeno observado en las pruebas de hemaglutinación en los grupos inmunosuprimidos, ya que dichos animales no presentaron una respuesta humoral eficiente al estímulo antigénico. Si la inmunosupresión originada por la CsA fue meramente funcional, realmente no deberían haberse observado cambios en la proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+, resultado que fue observado en los estudios citofluorométricos de este trabajo.

Al conseguir mantener inmunosuprimido al grupo experimental (LTME+CsA), se logró inhibir la respuesta inmune contra los antígenos de la médula espinal, dato confirmado no sólo con las pruebas de proliferación linfocitaria, sino también con los estudios de microscopía donde se

corroboró una escasa cantidad de células inmunológicas en las ratas con LTME + CsA con respecto a LTME sin CsA. Así pues, la inmunosupresión lograda en los animales tratados con CsA, se asoció a una mejor preservación del tejido de la ME observada en el estudio morfométrico con microscopía de luz en los animales con LTME + CsA con respecto a los no tratados. Aunque dicha diferencia no fue significativa, sí se observó una tendencia a la mejor preservación del tejido en los animales con LTME + CsA. La falta de significancia estadística en este caso, se debe seguramente al tamaño de la muestra. Por otra parte en lo que respecta al estudio morfométrico con microscopía electrónica, se lograron observar tres fenómenos importantes en los animales con LTME + CsA: menor desmielinización, mayor remielinización y mayor proporción de colaterales axónicas. Se observó una menor destrucción y desmielinización del tejido medular con respecto a las ratas con LTME sin CsA. Estas últimas, presentaron un número muy reducido de axones, mismos que por lo general se encontraban desmielinizados, dato que fue corroborado en el estudio morfométrico al evaluar el IM, donde se observó que los animales con LTME + CsA presentaron una menor desmielinización con respecto a los de LTME sin CsA durante todo el estudio. Estos resultados sugieren un efecto neuroprotector secundario a la inmunosupresión, ya que disminuyó la desmielinización en los animales con LTME + CsA. Dicha disminución en la desmielinización, observada en los animales tratados sobre todo a los 15 días poslesión, pudo deberse a la inhibición de la respuesta inflamatoria (Kahan 1989), fenómeno que por lo general se desarrolla de las 24h a los 7 días después de una LTME y que es el responsable de una mayor desmielinización en el sitio de la lesión (Blight 1985). En los estadios de lesión crónica (45 días poslesión), la inhibición de la respuesta celular específica contra los antígenos de la ME pudo haber sido la responsable de la menor desmielinización en los animales con LTME + CsA.

Otro fenómeno observado durante el estudio, fue la tendencia desde los 45 días a una mayor mielinización de los axones en los animales con LTME + CsA. La distribución del IM con respecto al diámetro axonal en los animales lesionados fue acercándose durante el seguimiento a la distribución presentada por los animales sin lesión, sin embargo, los animales con LTME + CsA, aunque no llegaron a igualar el patrón presentado por los grupos testigo, se acercaron más a la

distribución normal. Lo anterior sugiere un proceso de remielinización en los axones de los animales con LTME + CsA. También en este caso la inmunosupresión probablemente originó un microambiente más favorable para una mejor remielinización de los axones residuales.

El último fenómeno morfológico observado fue la mayor cantidad de axones con diámetro menor a 0.5 μm en los animales lesionados con respecto a los no lesionados. Este tipo de axones constituyó sólo el 8% de las fibras en los grupos sin LTME mientras que en los grupos con LTME representó prácticamente el doble desde los 15 días (20 al 26%), cifra que se incrementó en los días posteriores. Se sabe que después de una LTME, los axones no dañados pueden emitir prolongaciones colaterales 2 semanas después de una lesión (Liu y Chambers 1958), dichas colaterales pueden incluso reinervar regiones denervadas (Ganchrow D y cols. 1981; Goldberger y Murray 1982). Por el tamaño y el incremento significativo que presentaron, los axones antes mencionados pueden formar parte de este fenómeno de crecimiento neural colateral. Este dato es de gran importancia ya que apoya un fenómeno de plasticidad neural que en los animales con LTME + CsA se presentó en mayor grado. Además de disminuir la desmielinización y promover la remielinización axonal, la inmunosupresión puede estar promoviendo también la formación de colaterales axónicas. La formación de dichas colaterales aunada a la menor desmielinización y a la mayor remielinización observada en los animales con LTME + CsA, pudo ser la responsable de la mayor recuperación clínica presentada por éstos ya que en las dos pruebas de evaluación clínica aplicadas, los animales tratados presentaron una recuperación significativamente mayor a la del grupo con LTME sin CsA. Este dato da relevancia a los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se obtuvieron ventajas no solo a nivel inmunológico y morfológico sino que además dichas ventajas lograron traducirse en una recuperación funcional. A la fecha existen varios estudios en los que se han obtenido resultados alentadores a través de diversos tratamientos pero que finalmente no han logrado restablecer en su totalidad las funciones perdidas después de una LTME (Tessler 1991; Aguayo y cols. 1990; Stokes y Reier 1992; Demierre y cols. 1990). Sin embargo cada uno de ellos aporta un nuevo conocimiento para continuar con el estudio de la LTME y su posible curación.

En este trabajo se ofrece una opción que también puede ser de utilidad para los estudios de la LTME ya que, en primer lugar, se demuestra la existencia de una respuesta de tipo autoinmune dirigida contra los antígenos neurales después de una LTME. Se demuestra así mismo, que el tratamiento inmunosupresor inhibe dicha respuesta y que además disminuye la desmielinización y propicia un incremento en la remielinización y formación de colaterales axónicas, fenómenos que se llegan a traducir en una mayor recuperación clínica de los animales con LTME + CsA.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos por otros autores (Feringa y cols. 1975; Palladini y cols. 1996), quienes sugirieron regeneración neural e incluso recuperación de la función en animales sometidos a un tratamiento inmunosupresor. Uno de estos trabajos (Palladini y col. 1996) sugirió regeneración axonal y recuperación funcional en animales con sección de la médula espinal, tratados con CsA. Sin embargo, ese trabajo tuvo varios inconvenientes ya que muchos resultados se manejaron en forma cualitativa y con estudios en microscopía de luz, además demostraron una disminución de la respuesta humoral pero no la analizaron en diferentes tiempos y, en algunos casos, no mostraron los resultados obtenidos en los animales no tratados. En el presente trabajo, se demuestra en forma cuantitativa y con estudios más detallados (microscopía electrónica) el efecto que la CsA tuvo no solo sobre los fenómenos de plasticidad neural sino también sobre la disminución de la destrucción del tejido y sobre la remielinización axonal en las zonas de lesión. Se analizó a través del tiempo la respuesta inmunológica celular específica contra antígenos neurales y, a diferencia del estudio realizado por Palladini y colaboradores, se utilizó un esquema inmunosupresor previamente establecido para modelos de LTME (Ibarra y cols. 1996b) y se comprobó que los animales tratados estaban debidamente inmunosuprimidos, estudios que no fueron tomados en consideración por Palladini y colaboradores. Por lo antes mencionado, este trabajo no solo confirma en cierta manera los resultados de otros autores, sino que además ofrece conocimientos nuevos más precisos y mejor controlados, mismos que apoyan la hipótesis propuesta para este trabajo. Los resultados obtenidos, tanto en este trabajo como en el realizado por Palladini, se deben muy probablemente a la inmunosupresión originada por la CsA en los animales tratados, sin embargo, dichos resultados pueden deberse también a un efecto directo de la CsA sobre algunos

mecanismos que no tienen nada que ver con el efecto inmunosupresor de este fármaco. La CsA puede funcionar como agente neuroprotector (Dawson y Snyder 1994; Shiga y cols. 1992), o incluso por su mecanismo de acción, como un agente promotor del crecimiento axonal (Gold B y cols. 1995). El mecanismo por el cual la CsA induce inmunosupresión está bien estudiado, actúa inhibiendo la actividad de la calcineurina (Figura 25), misma que, además de intervenir en el proceso de transducción para la transcripción de la IL-2 y su receptor, también actúa sobre otros sustratos provocando su defosforilación. Entre dichos sustratos podemos mencionar a la óxido nítrico sintasa (ONS) (Dawson y Snyder 1994) y a la proteína estimuladora del crecimiento axonal (GAP-43) (Gold y cols. 1995). De la ONS existen dos diferentes tipos: la ONS constitutiva y la ONS inducible. La calcineurina induce la actividad de la ONS y con ello la producción de óxido nítrico (ON), mismo que, cuando es producido por la ONS inducible puede ser altamente neurotóxico (Dawson y Snyder 1994; Hamada y cols. 1996). Por otra parte, al actuar la calcineurina sobre la GAP-43, inactiva a dicha molécula impidiendo su acción regeneradora. Después de una LTME se ha descrito la presencia en grandes cantidades tanto de la ONS como de la GAP-43 en la zona de lesión (Nacimiento y cols. 1995; Hamada y cols. 1996), de tal forma que con la acción libre de la calcineurina, después de una LTME, la ONS puede provocar un mayor daño al producir grandes cantidades de ON y por otro lado la GAP-43 no realizaría su acción de plasticidad neural. La CsA al inhibir la acción de la calcineurina, evita la producción de ON y por lo tanto actúa como neuroprotector y por otra parte permite la actividad de la GAP-43 y con esto la promoción del crecimiento axonal lo que ofrece una explicación alternativa a los datos obtenidos en este trabajo.

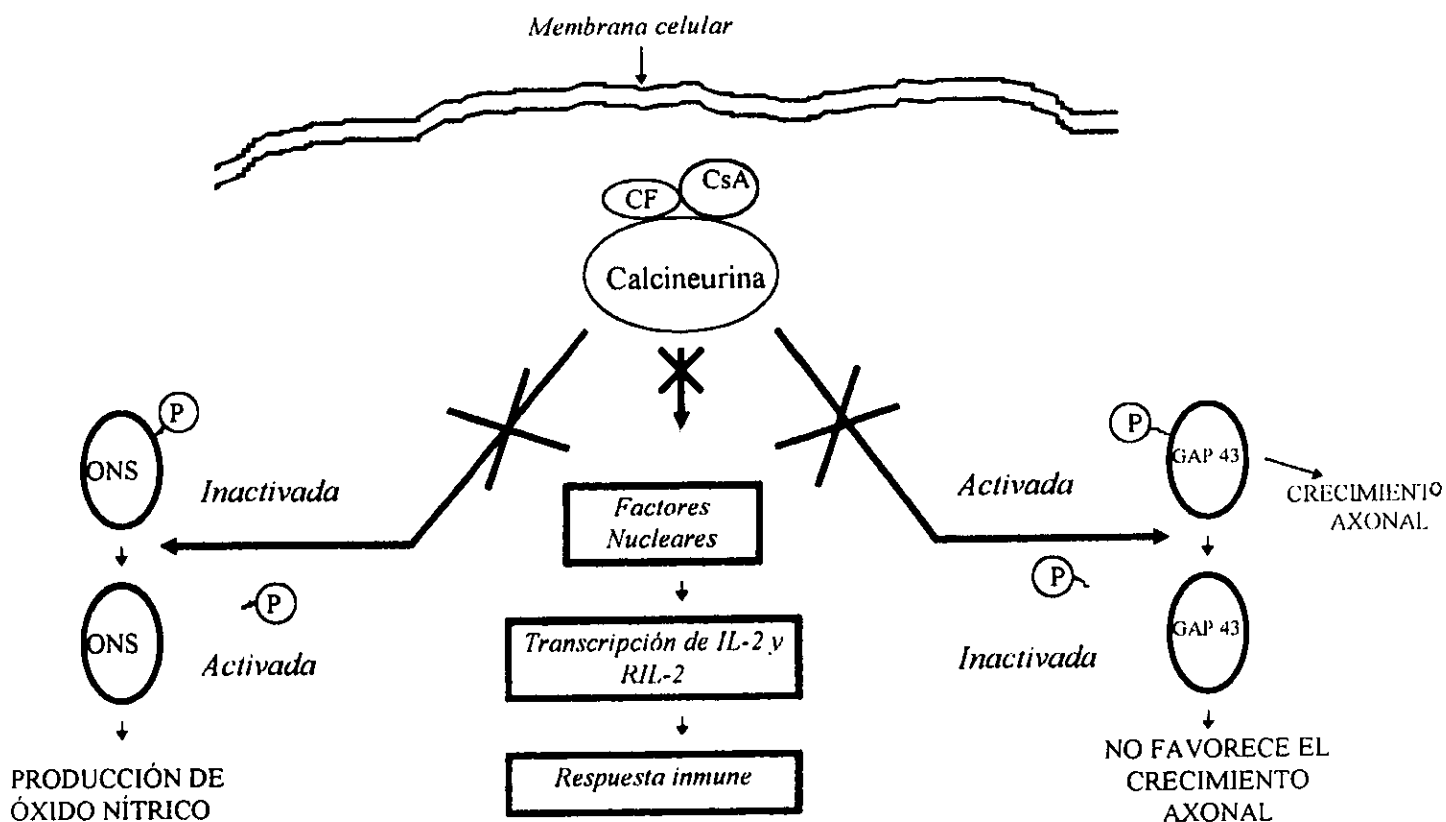


FIGURA 25. Mecanismos de acción de la ciclosporina-A. CsA= ciclosporina-A; CF= ciclofilina; ONS= óxido nítrico sintasa; P= fósforo; IL-2= interleucina-2; RIL-2= receptor para IL-2; GAP-3 = proteína de crecimiento axonal.

De una o de otra forma la aplicación de la CsA en un modelo de LTME, demostró ventajas importantes, sin embargo en estudios posteriores sería importante esclarecer si dichas ventajas fueron originadas únicamente por el efecto inmunosupresor o bien por el efecto de la CsA sobre los mecanismos ya antes mencionados.

En el futuro será importante discernir claramente si es el efecto inmunosupresor o bien el neuroprotector y promotor de la plasticidad neural de la CsA o ambos los responsables de los resultados obtenidos en este trabajo. Por lo pronto, se sabe que existe un efecto benéfico y que puede tomarse en consideración para estudios posteriores, mismos que deben encaminarse en primer lugar a saber si los resultados obtenidos en este trabajo son reproducibles cuando el tratamiento se inicie después de la LTME, sobre todo para poder pensar en una aplicación clínica.

CONCLUSIONES

1. La lesión traumática de la médula espinal origina por si sola inmunosupresión en modelos experimentales.
2. Después de una lesión en la médula espinal se desarrolla una respuesta inmune celular contra los antígenos neurales, misma que es temporal y que además puede ser inhibida al administrar un tratamiento con ciclosporina-A.
3. La inmunosupresión con ciclosporina-A en animales con lesión traumática de la médula espinal, disminuye la desmielinización y origina un microambiente favorable para una mejor remielinización y formación de colaterales axónicas.
4. La menor desmielinización y la mejor remielinización y formación de colaterales axónicas observadas en los animales con lesión traumática de la médula espinal tratados con ciclosporina-A se asoció a una mayor recuperación de la actividad motora.

PERSPECTIVAS A FUTURO

1. Evaluar si los resultados obtenidos en este trabajo son reproducibles cuando el tratamiento se inicie después de la lesión traumática de la médula espinal.
2. Discernir claramente si es el efecto inmunosupresor o bien el efecto neuroprotector y promovedor de la plasticidad neural de la ciclosporina-A o ambos son los responsables de los resultados obtenidos en este trabajo.
3. Conocer más a fondo el tipo de respuesta inmune celular (Th1 ó Th2) contra antígenos neurales, que predomina después de una lesión en la médula espinal.
4. Conocer con mayor exactitud el momento en que dicha respuesta desaparece.

CONCLUSIONES

1. La lesión traumática de la médula espinal origina por si sola inmunosupresión en modelos experimentales.
2. Después de una lesión en la médula espinal se desarrolla una respuesta inmune celular contra los antígenos neurales, misma que es temporal y que además puede ser inhibida al administrar un tratamiento con ciclosporina-A.
3. La inmunosupresión con ciclosporina-A en animales con lesión traumática de la médula espinal, disminuye la desmielinización y origina un microambiente favorable para una mejor remielinización y formación de colaterales axónicas.
4. La menor desmielinización y la mejor remielinización y formación de colaterales axónicas observadas en los animales con lesión traumática de la médula espinal tratados con ciclosporina-A se asoció a una mayor recuperación de la actividad motora.

PERSPECTIVAS A FUTURO

1. Evaluar si los resultados obtenidos en este trabajo son reproducibles cuando el tratamiento se inicie después de la lesión traumática de la médula espinal.
2. Discernir claramente si es el efecto inmunosupresor o bien el efecto neuroprotector y promovedor de la plasticidad neural de la ciclosporina-A o ambos son los responsables de los resultados obtenidos en este trabajo.
3. Conocer más a fondo el tipo de respuesta inmune celular (Th1 ó Th2) contra antígenos neurales, que predomina después de una lesión en la médula espinal.
4. Conocer con mayor exactitud el momento en que dicha respuesta desaparece.

BIBLIOGRAFÍA

Aguayo AJ, Bray GM, Rasminsky M, Zwimpfer T, Carter D, Vidal-Sanz M. Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J Exp Biol* 1990; 153: 199-224.

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.

Banik NL, Hogan EL, Powers JM, Smith K. Proteolytic enzymes in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986; 73: 245-256.

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

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

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

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

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

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

- Blight AR. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985; 2: 299-315.
- Blight AR y Young W. Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by Schwann cells. *J Neurol Sci* 1989; 91: 15-34.
- Bradbury MW, Westrop RJ. Factors influencing exit of substances from cerebrospinal fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *J Physiol* 1983; 519-534.
- Bradbury MW. Overview of passage routes of interstitial fluid to the lymphatics: history and current concepts. En: Johansson BB, Owman C, Widner H (eds) *Pathophysiology of the blood-brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain. Fernstrom Foundation Series 14*, Amsterdam, Elsevier, 1990, pp 403-412.
- Brundin P, Nilsson OG, Gage FH and Bjorklund A. Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res* 1985; 60: 204-208.
- Calne RY. The rejection of renal homografts, inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet* 1960; 1: 417-418.
- Cotman CW. *The neuroimmune-endocrine connection*, Raven Press, New York 1st ed 1987
- Council on Scientific Affairs: Introduction to the management of immunosuppression. *J Am Med Ass* 1987; 257: 1781-1785.
- Cross AH, Cannella B, Brosnan CF, Raine CS. Homing to cerebral nervous system vasculature by antigen specific lymphocytes. I. Localization of ¹⁴C-labeled cells during acute, chronic and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 1990; 63: 162-170.

Cruse JM, Lewis RE Jr, Bishop GR, Kliesch WF, Gaitan E, Britt R. Decreased immune reactivity and neuroendocrine alterations related to chronic stress in spinal cord injury and stroke patients. *Pathobiology* 1993; 61 (3-4): 183-192.

Cruse JM, Keith JC, Bryant ML Jr, Lewis RE Jr. Immune system-neuroendocrine dysregulation in spinal cord injury. *Immunol Res* 1996; 15 (4): 306-314.

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

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.

Dawson TM and Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1995; 14: 5147-5159.

Demmierre B, Martinous JC, Kato AC. Embryonic motoneurons grafted into the adult CNS can differentiate and migrate. *Brain Res* 1990; 510: 355-359.

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

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

Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch Neurol* 1972; 27: 468-473.

- Erlich SS, McComb JG, Hyman S. Ultrastructural morphology of the olfactory pathway for cerebrospinal fluid drainage in the rabbit. *J Neurosurg* 1986; 64: 466-473.
- Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effect of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175.
- Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988; 23 : 623-626.
- Fabry Z, Raine CS and Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of immune response in the CNS. *Immunol Today* 1994; 15: 220-224
- Feringa ER, Johnson RD and Wendt JS. Spinal cord regeneration in rats after immunosuppressive treatment . *Arch Neurol* 1975; 32: 676-683.
- Feringa ER, Vahlsing HL. Retrograde transport in cortico-spinal neurons after spinal cord transection. *Neurology* 1983; 33: 478-482.
- Feringa ER, McBride RL, Pruitt II JN. Loss of neurons in the red nucleus after spinal cord transection. *Exp Neurol* 1988; 100: 112-120.
- Finsen B, Poulsen PH and Zimmer J. Xenograft of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. *Exp Brain Res* 1988; 70: 117-133.
- Fontana A, Fierz W and Wekerle H. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 1984; 307: 273-276.
- Fontana A, Frei K, Bodmer S. Immune-mediated encephalitis: on the role of antigen presenting cells in brain tissue. *Immunological Rev* 1987; 100: 185-201.

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

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

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.

Gray D, Matzinger P. T cell memory is short-lived in absence of antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 969-974.

Gledhill RF, Harrison BM, McDonald WI. Demyelination and remyelination after acute spinal cord compression. *Exp Neurol* 1973; 38: 472-487.

Goldberger ME, Murray M. Lack of sprouting and its presence after lesions of the cat spinal cord. *Brain Res* 1982; 242: 227-239.

Gold B, Kato K and Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1995; 15: 7509-7516.

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

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

Guy J, Ellis EA, Kelley K, Hope GM. Spectra of G ratio, myelin sheath thickness and axon and fiber diameter in the guinea pig optic nerve. *J Comp Neurol* 1989; 287: 446-454.

Grijalva I, Guizar-Sahagún G, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Franco-Bourland R, Espitia L, Madrazo I. Improvement of host-graft adhesion by enzymatic manipulation of the subacute spinal cord contusion area in the rat. *Transplantation Proceedings* 1996; 28: 3340-3342.

Guy J, Ellis EA, Kelley K and Hope GM. Spectra of G ratio, myelin sheet thickness, and axon and fiber diameter in the guinea pig optic nerve. *J Comp Neurol* 1989; 287: 446-454.

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

Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsumishita Y and Fukusawa K. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 1-9.

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

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.

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

Ibarra A, Guizar-Sahagún G, Correa D, Kretschmer R, Grijalva I, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernandez G, Odor A, López RM, Franco-Bourland R, Espitia AL, Salgado-Ceballos H and Madrazo I. Alteration of cyclosporin-A pharmacokinetics after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1996a; 13: 267-272.

Ibarra A, Reyes J, Martinez S, Correa D, Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta FJ, Franco-Bourland R and Madrazo I. Use of cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: Design of a dosing strategy to maintain therapeutic levels. *J Neurotrauma* 1996b; 13: 569-572.

Iumashev GS, Petrova NV, Eliseev AT, Aleshkin VA, Rozina MN. Immune complexes in blood and liquor in patients with spinal cord injuries. *Klin Med Mosk* 1991; 69: 56-58.

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

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

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.

Karnes J, Robb R, O'Brien PC, Lambert EH and Dyck PJ. Computerized image recognition for morphometry of nerve attribute of shape of sampled transverse sections of myelinated fibers which best estimates their average diameter. *J Neurol Sci* 1977; 34: 43-51.

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

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

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

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

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

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

Little G J, Heath J W. Morphometric analysis of axons myelinated during adult life in the mouse cervical ganglion. *J Anatomy* 1994; 184: 387-398.

Liu D and Chambers WW. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch Neurol Psychiat* 1958; 79: 46-61.

Luna LG. Manual of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology Mc Graw-Hill, New York, 1960.

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

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

Mattews MA. An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat Rec* 1968; 161: 337-352.

Mattews MA y Duncan D. A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1972; 142: 1-22.

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

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

Mizrachi Y, Ohry A, Avial A, Rozin R, Brooks E and Schwartz M. Systemic humoral factors participating in the course of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 22: 287-293.

Nacimiento W, Sappok T, Brook GA, Toth L Oestreicher AB, Gispén WH, Noth J, Kreutzberg G. B-50 (GAP-43) in the rat spinal cord caudal to hemisection: lack of intraspinal sprouting by dorsal root axons. *Neuroscience letter* 1995; 194: 13-16.

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

Nicholas MK, Arnason BGW. Immunologic considerations in transplantation to the central nervous system. En: Alan R (ed) *Neural Regeneration and Transplantation*. Liss. Inc. 1989, pp 239-284.

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

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

Palladini G, Caronti B, Pozzessere G, Teichner A, Buttarelli FR, Morselli E, Valle E, Venturini G, Fortuna A and Pontieri E. Treatment with cyclosporine A promotes axonal regeneration in rats submitted to transverse section of the spinal cord- II- Recovery of function. *J Brain Res* 1996; 37: 145-153.

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

Popovich PG, Stokes BT and Whitacre CC. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 1996, 45: 349-363.

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

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

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

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

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

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

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

Roitt I, Brostoff J and Male D. *Immunology. Development of the immune system.* 4 th edition, Mosby ed.; New York 1996; pp 10.4 - 10.9.

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

Schwab ME y Schnell L. Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *J Neurocytol* 1989; 18: 161-169.

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

Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K. Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res* 1992; 595: 145-148.

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

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

- Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm AG and Kauffman RS. RS-61443-A phase I clinical trial and pilot rescue study. *Transplantation* 1992; 53: 428- 432.
- Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, et al. The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124: 301-318.
- Starzl TE. The development of clinical renal transplantation. *Am J Kid Dis* 1990; 16: 548-556.
- Steimann JL. Lymphocyte homing to the central nervous system. En : Johansson BB, Owman C, Widner H (eds) *Pathophysiology of the blood brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain. Fernstrom Foundation Series 14, Elsevier Amsterdam, 1990, pp 453-466.*
- Steinmuller D. Skin-specific histocompatibility antigens. En: Ninneman JL (ed): *Traumatic injury, infection and other immunologic sequelae . University Park Press, Baltimore; 1983 pp 181-196.*
- Stoffel W. The myelin membrane of the central nervous system, essential macromolecular structure and function . *Angew Chem Int De Engl* 1990; 29: 958-976.
- Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1992; 116: 1-12.
- Streit WJ, Graeber MB. Functional plasticity of microglia: A review. *Glia* 1988; 1: 301-307.
- Sung CL, Yasmineh JL and Brudzinsky AM. Specific measurements of cyclosporin A in transplant patient specimens by RIA with a monoclonal antibody and ¹²⁵I-tracer. *Clin Chem* 1988; 34: 1260 abstract No. 525.

Taranova NP, Makarov Alu, Amelina OA, Luchakova OS, Loboda EB, Leikin IB. The production of autoantibodies to nerve tissue glycolipid antigens in patients with traumatic spinal cord injuries. *Zh-Vopr-Neirokhir-Im-N-N-Burdenko* 1992; 4-5: 21-4.

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

Teichner A, Morselli E, Buttarelli FR, Caronti B, Pontieri FE, Venturini G, Palladini G. Treatment with cyclosporin A promotes axonal regeneration in rats submitted to transverse section of the spinal cord 1993; 34: 343-349.

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

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

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

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

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

Waxman SG y Sims TJ. Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res* 1984; 292: 179-185.