

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

15
2ej.

EFFECTO DEL IMPLANTE DE NERVIO PERIFERICO PREDEGENERADO Y LA
ADMINISTRACION DE METILPREDNISOLONA SOBRE LA MIELINIZACION DE
AXONES CENTRALES DESPUES DE CONTUSION SEVERA DE LA MEDULA
ESPINAL DE RATAS ADULTAS

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Presenta

HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

TUTOR: DR. ALFREDO FERIA VELASCO

263007 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

COMITÉ TUTORAL.

Dr. Alfredo Feria Velasco

División de Patología y Biotecnología Ambiental. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Dr. Ignacio Madrazo Navarro

Centro de Investigación del Proyecto Camina A.C., México D.F.

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Centro de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro.

Dra. Margarita González del Pliego

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Rogelio Hernández Pando

Departamento de Patología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Alfredo Feria Velasco

División de Patología y Biotecnología Ambiental. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Dr. Raúl Mena López

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Dr. Lino Díaz de León

Secretaría Técnica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Centro de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, UAQ, Juriquilla, Querétaro.

Dr. Arturo Hernández Cruz

Departamento de Biofísica. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

***Observar sin pensar
es tan peligroso
como pensar sin observar***

Santiago Ramón y Cajal

***No existe
ningún problema
que no te aporte simultáneamente
un don.
Buscas los problemas
porque necesitas
sus dones***

Richard Bach

Dedico esta Tesis

A Mario, con todo mi amor y como un pequeño tributo por todo lo que representa para mi.

A mis dos grandes tesoros, Ricardo y Arturo, con mucho cariño.

A mis padres, Guillermo y Hermelinda con respeto y admiración.

A mis hermanos

Moises

Alejandro

Daniel

Noemí

Martha

Cristina

y

Guillermo

y a sus familias, con gran afecto.

A mis inseparables amigas, Norma Leticia, Verónica, Susana, Martha Eunice, Lourdes y Sandra.

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

RECONOCIMIENTOS.

Agradezco profunda y respetuosamente a mi tutor, Dr. Alfredo Feria Velasco, por su ejemplo y dedicación, por su apoyo incondicional, su valiosa orientación y guía, su interés, entusiasmo y afecto.

Al Dr. Israel Grijalva por su valiosa participación en los procedimientos quirúrgicos, su asesoría y juicio crítico en los aspectos teóricos y técnicos del proyecto.

Al Dr. Gabriel Guízar Sahagún por su invaluable apoyo tanto académico como científico.

A Columba Velasco SanJuan, Angelina Martínez y Ana Laura Espitia por su participación en los procedimientos quirúrgicos, en los cuidados de los animales, en la evaluación y seguimiento de los mismos y por las enriquecedoras experiencias compartidas durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Adrian Rondan, el Biólogo Armando Zepeda, la Dra. Silvia Antuna y el Sr. Gerardo Torres por el excelente trabajo realizado en la preparación, procesamiento y asesoría en los estudio con microscopia electrónica de transmisión y al Sr. Tomás Cruz por el magnifico trabajo fotográfico.

Al Dr. Armando Pérez, la Bióloga Martha Ustarroz, la Bióloga Diana Millán y la técnica Ma. Luisa Rodríguez-Méndez por su valiosa colaboración técnica y científica.

Al Sr. Fidel López por su dedicación al cuidado de los animales del bioterio.

Al Sr. Guillermo González y a toda su familia por su valiosa ayuda, apoyo incondicional y franca amistad.

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

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo del proyecto.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Camina A.C. y por el Instituto Mexicano del Seguro Social a través de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas.

Para la realización del presente proyecto y para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biomédicas, recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro

ÍNDICE GENERAL.

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción	
Antecedentes.....	5
Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal.....	6
Desmielinización.....	9
Remielinización.....	10
El nervio periférico como tejido de implante.....	11
Índice de mielinización.....	13
Manejo farmacológico de la lesión traumática de la médula espinal con metilprednisolona	15
Tratamiento actual de la lesión traumática de la médula espinal.....	18
Modelos experimentales.....	19
Justificación.....	20
Planteamiento del problema.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Material y Métodos	
Población de estudio.....	24
Grupos de estudio.....	24
Tiempos de corte del estudio.....	24
Consideraciones éticas.....	24
Variables.....	25
Criterios de selección.....	25
Método de anestesia.....	25
Método de contusión de la médula espinal.....	26
Administración de la metilprednisolona.....	28
Cuidado postoperatorio de los animales.....	28

Preparación del sitio de lesión para trasplante.....	29
Obtención del nervio periférico fresco.....	30
Obtención del nervio periférico predegenerado.....	31
Evaluación funcional.....	33
Sacrificio y preparación para estudio morfológico.....	35
Estudio morfométrico.....	37
Análisis estadístico.....	38
Resultados	
Cuantificación de macrófagos, células de Schwann y fibroblastos después de lesión del nervio ciático.....	40
Contusión de la médula espinal.....	43
Hallazgos transoperatorios.....	46
Mortalidad.....	48
Evaluación morfológica.....	49
Axones y colaterales axónicas en el epicentro de la lesión.....	50
Fibras mielínicas y amielínicas.....	55
Índice de mielinización.....	55
Desmielinización y remielinización.....	58
Evaluación funcional.....	67
Discusión	
Cuantificación de macrófagos, células de Schwann y fibroblastos después de lesión del nervio ciático.....	69
Administración de metilprednisolona e implante de nervio periférico predegenerado.....	70
A. Contusión de la médula espinal.....	71
B. Mortalidad.....	71
C. Efecto de la metilprednisolona.....	71
D. Comparación del efecto del trasplante de nervio periférico fresco contra el predegenerado.....	74
E. Tratamiento combinado con MP e implante de NP fresco o NPP.....	77

F. Evaluación funcional.....	79
Conclusiones.....	83
Perspectivas a futuro.....	84
Bibliografía.....	85

ABREVIATURAS.

BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
CNTF	factor neurotrófico ciliar
Cont	únicamente contusión, grupo control
CS	células de Schwann
GGF	factor de crecimiento glial
IDM	índice de mielinización
IL-1	interleucina 1
IL-12	interleucina 12
LP	lipoperoxidación
LTME	lesión traumática de médula espinal
Lts	leucotrienos
ME	médula espinal
MP	metilprednisolona
NPMP	nervio periférico fresco más metilprednisolona
NPPMP	nervio periférico predegenerado más metilprednisolona
N-CAM	molécula de adhesión celular neural
NGF	factor de crecimiento nervioso
NP	nervio periférico fresco
NPP	nervio periférico predegenerado
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGs	prostaglandinas
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TXA ₂	tromboxano A ₂
UI	unidades internacionales

RESUMEN.

La lesión traumática de la médula espinal es un problema de salud pública que pone en riesgo la vida de los pacientes y produce una serie de secuelas incapacitantes con repercusiones personales, sociales y económicas. La parálisis observada en esta patología se debe, en gran parte, a la destrucción de los axones y a la interferencia en la conducción de los impulsos nerviosos generada por la desmielinización de las fibras que sobreviven a la lesión. La recuperación en este proceso podría depender en gran parte de la remielinización que se genere después del traumatismo, sin embargo, la remielinización espontánea que tiene lugar en la médula espinal (ME) lesionada no involucra a todas las fibras que sobreviven, ni a todas las resultantes de los fenómenos plásticos inherentes a la misma, y los tratamientos existentes hasta la fecha no son capaces de evitar o revertir el daño en forma significativa. El objetivo del presente estudio fue, en primer lugar, tratar de evitar la desmielinización al utilizar un fármaco neuroprotector como la metilprednisolona (MP) y en segundo lugar, favorecer la remielinización con un implante de nervio periférico predegenerado (NPP). Con este fin se estudiaron 83 ratas Long-Evans, hembras, adultas, sometidas a lesión por contusión severa de la ME a nivel torácico bajo, posteriormente, las ratas se dividieron por sorteo en 6 grupos: Grupo 1: control, Grupo 2: administración de MP, Grupo 3: trasplante de nervio periférico fresco (NP), Grupo 4: NP más MP (NPMP), Grupo 5: trasplante de NPP (NPP) y Grupo 6: NPP más MP (NPPMP). Las ratas de los grupos 1 y 2 se estudiaron a las 21 hrs, 7 días, 2 y 4 meses después de la contusión. Las ratas de los grupos 3,4,5, y 6 recibieron el implante de NP fresco o NPP un mes después de la contusión y se estudiaron 1 y 3 meses después del implante. La ME de cada animal se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión y morfometría computarizada y en el epicentro de la lesión se evaluó: número de axones, número de colaterales axónicas, número de fibras mielínicas, número de fibras amielínicas y espesor relativo de la vaina de mielina. Las evaluaciones clínicas se realizaron con base en la escala de Tarlov. Los resultados indican que la MP protege las vainas de mielina del daño producido por una contusión severa de la ME ($p < 0.05$), pero inhibe la formación de colaterales axónicas. El implante de NPP permite una remielinización más extensa que la observada en forma

espontánea e incluso que la generada con implantes de NP fresco. La combinación de MP con el implante de NP fresco o con NPP produce un efecto sinérgico que se refleja de manera positiva en todos los parámetros morfométricos evaluados, a excepción de la emisión de colaterales axónicas. La máxima recuperación funcional se observó en el grupo NPPMP y fue del 56%, lo cual difirió con respecto al control en alrededor de un 10%. Sin embargo, se deberá evaluar el empleo de otras medidas terapéuticas que en combinación con MP y/o NPP permitan lograr un mejor grado de funcionalidad.

ABSTRACT

Traumatic spinal cord injury (TSCI) is a public health problem and results in a series of debilitating sequelae with personal, social and economic repercussions. Paralysis seen in this entity is due to axon destruction and to interference with nerve impulse conduction as a result from demyelination of fibers surviving the insult. Spontaneous remyelination occurring in the injured spinal cord does not involve all surviving fibers or those resulting from plastic phenomena inherent to it. The purpose of this study was to search for a possible synergistic effect between methylprednisolone (MP) and a predegenerated peripheral nerve (PPN) implant. On one hand using MP to avoid as much as possible the demyelination and on the other hand using an implant rich with Schwann's cells and trophic factors, in order to remyelinate axons where demyelination was unavoidable. Thus, 83 adult female Long-Evans rats, subject to severe TSCI at the low thoracic level (T-9), were studied. The rats were divided into 6 groups. Group 1: Control; Group 2: MP; Group 3: fresh peripheral nerve implant (FPN); Group 4: FPN implant plus MP (FPNMP); Group 5: PPN implant; Group 6: PPN implant plus MP (PPNMP). Rats in groups 1 and 2 were studied 21 hr, 7 days, 2 and 4 months after the lesion. Rats in groups 3, 4, 5 and 6 were given the FPN or PPN implant one month after the injury and were studied at 1 and 3 months after the transplantation. The spinal cord of each animal was analyzed by scanning electron microscopy and computerized morphometry. The epicenter of the injury was assessed for the myelination index (MI), number of axons, axon collaterals and myelinic fibers. Clinical evaluations were conducted based on Tarlov's scale. Results indicate that MP protects the myelin sheaths from damage after a severe TSCI ($p < 0.05$). However, it does block the creation of axon collaterals. PPN transplantation allows for a remyelination broader than that spontaneously seen and even greater than that resulting from FPN implants (MI = 0.83, 0.88 and 0.86, respectively). Combining MP with PPN transplantation results in a synergistic effect positively reflected on all morphometric parameters studied except for the creation of axon collaterals. Maximum functional recovery was seen

in the PPNMP group. This group achieved recovery of 54% and this was different from the control group in about 10%. These data indicated that PPN plus MP have a positive synergistic effect on number of axons, number of myelinated fibers, MI and degree of functionality, but the use of other therapeutic actions are necessary to allow for a higher degree of functionality.

INTRODUCCION.

Antecedentes.

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un problema de salud pública que pone en riesgo la vida de los pacientes en estado agudo y produce una serie de secuelas incapacitantes con devastadoras repercusiones personales, sociales y económicas (Ditunno y Formal, 1994; Krause et al., 1997; Levi et al., 1996; Whiteneck et al., 1992).

Alrededor del 40% de este tipo de lesiones producen una sección completa de la médula espinal (ME), lo cual ocasiona pérdida total de la función motora y sensitiva por debajo del sitio dañado, que se traduce en paraplejía si solo afecta miembros inferiores o en tetraplejía si afecta miembros inferiores y superiores. El resto de las lesiones producen secciones incompletas y se caracterizan por presentar cierto grado de funcionalidad por debajo del sitio afectado (Burns et al., 1997; Tator y Fehling, 1991).

A nivel mundial se ha comunicado una incidencia anual para la LTME que oscila entre 13 y 40 casos por millón (Ditunno y Formal, 1994; Dixon et al., 1993; Tator, 1995; Whiteneck et al., 1992). Específicamente en nuestro país se refiere para la zona metropolitana del Distrito Federal una incidencia de 12 por millón (Ibarra, 1990). Entre las principales causas de esta patología se mencionan los accidentes de tránsito en vehículos motorizados, los accidentes en la práctica deportiva, los accidentes en el trabajo y en actividades de recreación, las caídas y la violencia (Cooper, 1996; Tator, 1995).

Por otra parte, se ha descrito que aproximadamente 80% de los individuos con LTME son del sexo masculino (Bracken et al., 1992) y al momento de la lesión, alrededor del 75% se encuentra entre los 15 y 35 años de edad (Eisenberg y Tierney, 1985; Tator y Fehling, 1991).

A pesar de los avances en los cuidados médicos, la mortalidad, aún en los centros de atención especializados, se encuentra entre 6 y 17% (Burney et al., 1993; De Vivo et al., 1989, 1990 y 1993) y la frecuencia del suicidio entre los pacientes parapléjicos es 10 veces superior a la de poblaciones similares pero sin esta patología (Rish et al., 1997).

Las repercusiones económicas se reflejan en los costos elevados para los cuidados de estos pacientes, ya que tan sólo en los Estados Unidos de Norteamérica se estima un costo anual que asciende a los 4 billones de dólares (Stripling, 1990) y específicamente se calcula que por cada individuo con LTME completa, se genera un gasto aproximado de 52 millones de dólares anuales, tanto por los cuidados médicos que se requieren de por vida, como por las pérdidas por ingresos y productividad (Fehlings, 1994).

Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal.

El principal problema en esta patología radica en su complejidad (Fig. 1), ya que su fisiopatología involucra, tanto al daño mecánico primario, como a los mecanismos secundarios de lesión, que pueden durar horas o días y que culminan con la pérdida en la conducción de impulsos nerviosos a través del sitio afectado (Stokes et al., 1983; Tator, 1995; Young et al., 1982).

Los mecanismos que median la autodestrucción secundaria del tejido nervioso y conllevan al deterioro progresivo del paciente con LTME, incluyen desregulación iónica, isquemia, hemorragia, alteraciones en el metabolismo energético, disminución en la actividad de la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$, alteraciones en la excitabilidad neuronal, activación de proteasas, lipasas y endonucleasas, pérdida de la homeostasis del calcio intracelular, neuronofagia, elevación de aminoácidos excitatorios como el glutamato, formación de prostaglandinas (PGs), tromboxano A_2 (TXA_2) y leucotrienos (Lts), liberación de ácido araquidónico, activación de fosfolipasa A_2 (PLA_2), liberación de radicales de oxígeno y daño a las membranas celulares causado por lipoperoxidación (LP) e hidrólisis de fosfolípidos (Anderson et al., 1980 y 1985; Braughler, 1985; Clendenon et al., 1978; Demediuk et al., 1985 a y b; Demediuk et al., 1987; Demediuk and Faden, 1988; Hall y Braughler, 1982 y 1993; Hsu et al., 1985; Jonsson y Daniell, 1976; McIntosh, 1994;

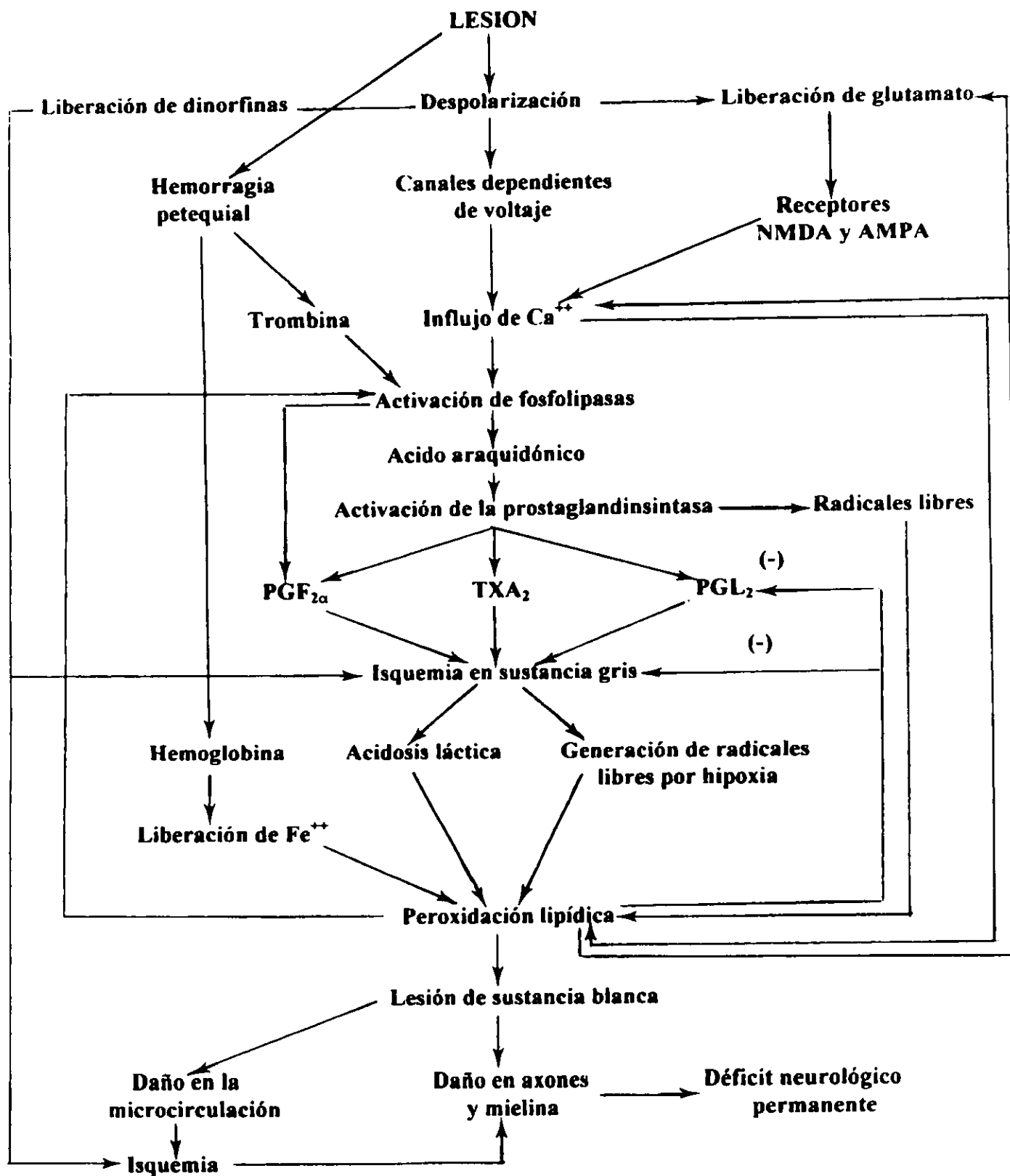


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra las características fisiopatológicas producidas después de una lesión aguda de la médula espinal en mamíferos. Tomado de Hall y colaboradores, 1995.

Mean y Anderson, 1983; Regan y Choi, 1994; Saunders et al., 1987; Siesjö, 1988; Young, 1985; Young y Flamm, 1982; Yue y Feuerstein, 1994).

De los mecanismos mencionados anteriormente, se considera a la LP como la base molecular de la degeneración neuronal postraumática (Demopoulos et al., 1980; Saunders, et al., 1987), debido a que si la LP es suficientemente severa, lisa las membranas a través de la formación de radicales libres de oxígeno en los fosfolípidos estructurales de la mielina, en los de las membranas de las células gliales y en los de las neuronas, lo cual genera la disolución del tejido nervioso (Baron Van-Evercooren et al., 1993; Hall y Braughler, 1981, 1982 y 1993; Hall, 1992; Hall y Wolf, 1986).

Las reacciones peroxidativas se inician 1 min después de la LTME y se caracterizan por la pérdida de colesterol secundaria a que el alfa tocoferol endógeno se consume con el atrapamiento de radicales libres de oxígeno en el tejido lesionado, por lo que se observa sólo el 4% de su valor normal 10 min después de la lesión y se depleta en su totalidad a los 30 min (Demediuk et al., 1985b; Saunders et al., 1987). Asimismo, los productos de la LP, como el malonaldehído, se incrementan significativamente a partir de los 15 min, alcanzan el máximo a la hr y disminuyen posteriormente (Barut et al., 1993).

La susceptibilidad del sistema nervioso central (SNC) al daño inducido por este tipo de radicales, se debe a que los lípidos de membrana en este sistema son especialmente ricos en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, especialmente las vainas de mielina cuya composición lipídica es aproximadamente del 80% (Anderson et al., 1985; Stoffel, 1990). Además, este sistema es pobre en actividad de catalasa y de glutatión peroxidasa y tiene una cantidad moderada de superóxido dismutasa. Por el contrario, el SNC es rico en hierro, que es el principal inductor de la producción de radicales libres en condiciones de lesión. Más aún, en el SNC se encuentran altas concentraciones de ácido ascórbico, el cual cuando se presenta solo y en altas concentraciones cumple una función antioxidante, mientras que en presencia del hierro y del cobre liberados por la extravasación de sangre después del trauma, se convierte en un potente oxidante y

produce grandes cantidades de radicales libres, los cuales dañan el tejido nervioso en forma irreversible (Anderson y Means, 1985).

Desmielinización.

Tanto en seres humanos como en animales de experimentación se ha demostrado que después de una LTME severa, en la mayoría de los casos no existe sección completa, aún cuando la pérdida axonal resultante de todo el proceso sea extensa y comprenda entre 87 y 99% de las fibras mielinizadas (Blight y Young, 1989).

Más aún, después de una LTME gran parte de las fibras que permanecen con continuidad anatómica se desmielinizan a través de los mecanismos secundarios de lesión (Blight, 1985). Lo anterior es particularmente importante, ya que al utilizar modelos de simulación computarizada sobre conducción de impulsos nerviosos en fibras desmielinizadas, se ha establecido que dicha conducción se mantiene aún cuando el espesor de la vaina de mielina represente tan solo 5 a 6% de su espesor normal (Koles y Rasminsky, 1972; McDonald y Sears, 1970).

El daño a la mielina se presenta durante las primeras 4 hrs después de una lesión por contusión de la ME y 21 hrs después se puede observar desmielinización, misma que se incrementa entre el segundo y el séptimo día, debido a la fagocitosis de las vainas dañadas y a la lesión de los oligodendrocitos (OD), que en el SNC son las células responsables de la mielinización (Blight, 1985; Dohrman, 1972; Gledhill et al., 1973; Tator, 1995).

Estos cambios patológicos producidos en las vainas de mielina de los axones centrales no sólo son responsables de la alteración estructural, sino también de la alteración funcional del axón (Dusart et al., 1992), porque al disminuir el diámetro axonal en las fibras desmielinizadas, se puede incrementar la resistencia axoplásmica a lo largo de éstas e incrementar el tiempo de conducción internodal y, en caso extremo, bloquear la conducción nerviosa en su totalidad (Koles y Rasminsky, 1972). Lo anterior se explica con base en que la vaina de mielina que rodea al axón, permite una mayor rapidez en la

conducción de impulsos nerviosos (Schwab y Schnell, 1989), ya que tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el SNC la velocidad de conducción de los potenciales de acción en sus fibras es proporcional al diámetro del axón y se incrementa notablemente con la mielinización, a tal grado que en una fibra mielinizada, la transmisión ocurre 100 veces más rápido que en ausencia de mielina (Stoffel, 1990).

Es decir, que la parálisis observada en esta patología se debe, en gran parte, a la destrucción de los axones a través de los cuales pasan las señales que conectan al cerebro con el resto del organismo (Young, 1989) y a la interferencia en la conducción de los impulsos nerviosos generada por la desmielinización de las fibras que sobreviven a la lesión (Blight, 1985; Dusart et al., 1992).

Remielinización.

Aún cuando la recuperación funcional después de una LTME pudiera depender en gran parte de la remielinización que se genere después de la lesión (Blight y Young, 1989), lo cierto es que la remielinización espontánea que tiene lugar en la ME lesionada no abarca todas las fibras que sobreviven a la lesión ni aquellas resultantes de los fenómenos plásticos inherentes a la misma (Gledhill et al., 1973; Salgado-Ceballos et al., 1998).

Esta incapacidad del SNC para remielinizar axones ante un gran número de circunstancias contrasta con la rápida y eficiente remielinización observada en el SNP (Ludwin, 1988 y 1989). Además, se ha demostrado que las células de Schwann (CS) del SNP no están limitadas en cuanto a su capacidad para formar mielina, ya que también pueden mielinizar axones del SNC (Blakemore, 1975, 1976 y 1977; Blackemore y Crang, 1985) y bajo ciertas condiciones de lesión son capaces de migrar procedentes de los ganglios de las raíces dorsales, los nervios de la piamadre o los pequeños nervios de la *nerva vasorum* y remielinizar en forma espontánea axones desmielinizados en la ME (Harrison, 1987)

Por otra parte, se ha demostrado que después de una lesión del SNC en los vertebrados superiores, tanto la mielina como la membrana de los OD, contienen 2 proteínas, la NI-35 y la NI-250, con un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento neural (Chiquet, 1989; Schwab, 1990; Schwab et al., 1993).

Con base en lo anterior, teóricamente la remielinización producida por las CS después de una lesión del SNC puede resultar una terapia efectiva en patologías desmielinizantes de este sistema, incluyendo a la LTME (Felts y Smith, 1992).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado una remielinización espontánea completa después de una LTME (Salgado-Ceballos et al., 1998), ni con implantes de tejido del SNP o del SNC (Aguayo et al., 1981; Anderson et al., 1991; Blakemore, 1977; Duncan et al., 1988 y 1995; Richardson et al., 1982; Xu et al., 1997), o de células mielinizantes cultivadas de los mismos e implantadas en el sitio de lesión, solos o en combinación con factores tróficos, han sido capaces de condicionar una remielinización completa (Duncan et al., 1981 y 1988; Wrathall et al., 1982; Baron Van-Evercooren et al., 1992 y 1996; McMorris y McKinron, 1996;), lo cual ha limitado su utilización en la clínica.

El nervio periférico como tejido de implante.

En la década de los 80, en estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se demostró que los implantes de nervio periférico (NP) colocados dentro de la ME lesionada inducen regeneración axonal (Ard et al., 1987; Bixby et al., 1988; Richardson et al., 1980; Sceats et al., 1986) y que bajo estas condiciones, las CS son capaces de envainar y mielinizar axones centrales (Richardson et al., 1982).

En fechas más recientes, se observó que si el NP se lesiona antes de ser implantado (nervio periférico predegenerado o NPP), se logra una mejor reparación del tejido dañado, tanto en el SNP como en el SNC, al compararlo con el implante de NP fresco (Bähr et al., 1992; Danielsen et al., 1994 y 1995; Kerns et al., 1993; Oudega et al., 1994; Zhao et al., 1994;).

Lo anterior se debe a que después de una lesión por sección completa de un NP, los macrófagos, las CS y los fibroblastos reclutados, activados o proliferantes presentan modificaciones, tanto en la expresión génica, como en el metabolismo celular (Fawcett y Keynes, 1990).

Las CS activadas en el NPP durante la degeneración Walleriana influyen en la restauración del tejido receptor y contribuyen a la sobrevivencia de las neuronas y al crecimiento axonal (Bähr y Bunge, 1989; Bähr et al., 1992), al proveer un sustrato favorable caracterizado por la presencia de una mayor cantidad de moléculas promotoras de procesos regenerativos entre las que se encuentran el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento glial (GGF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), moléculas de adhesión como la N-cadherina y la molécula de adhesión celular neural (N-CAM), moléculas de la membrana basal, como la fibronectina y la laminina y proteínas integrales de membrana tipo integrinas (Acherson et al., 1991; Bandtlow et al., 1987; Danilof et al., 1986; Martini y Schachner, 1988). Aunado a lo anterior, durante la degeneración Walleriana, la actividad fagocítica de las CS reactivas permite la eliminación de los restos de mielina dañada y axones degenerados, y proporcionan así una vía sin obstrucciones para cualquier axón central en regeneración (Nathaniel y Pease, 1963; Smith y Stevenson, 1988; Stoll et al., 1989).

Los macrófagos son los principales encargados de limpiar la zona de lesión de los restos axonales y mielínicos que pueden interferir con el crecimiento axonal (Griffin et al., 1993; Perry et al., 1987; Stoll et al., 1989), producen factores mitogénicos para CS (Baichwal et al., 1988), liberan factores de crecimiento neural (Perry y Brown, 1992; Perry et al., 1987), producen interleucina-1 (IL-1), la cual promueve la expresión del NGF después de una lesión del nervio (Bogdan et al., 1992; Lindholm et al., 1987 y 1988), la interleucina-12 (IL-12) que puede influir en la naturaleza de la respuesta inmune y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el cual realiza importantes funciones autócrinas. Además, los macrófagos producen proteínas asociadas a la regeneración como la proteína E, que permite que las CS tomen y reciclen el colesterol liberado por la

degradación de la mielina, el cual se requiere para la remielinización de las ramificaciones nerviosas durante la regeneración (Boyles et al., 1989).

Con base en lo anterior, se podría entonces considerar que un tejido de trasplante ideal sería un NP con el mayor número de CS y macrófagos con todos estos cambios en su expresión génica y en su metabolismo celular. Sin embargo, actualmente existe una marcada controversia entre diferentes autores (Tabla 1) sobre el momento en el que estas células alcanzan su pico máximo de proliferación o reclutamiento, después de una lesión del NP (Avellino et al., 1995; Clemence et al., 1989; Komiyama et al., 1992; Miyamoto et al., 1986; Perry et al., 1987; Salonen et al., 1988; Siironen et al., 1994;).

Más aún, algunos autores han demostrado que el NPP es capaz de incrementar el número de axones mielinizados 3 meses después del implante y mejorar de manera significativa, tanto la sobrevivencia de las células ganglionares de la retina, como la regeneración axonal cuando se colocan justo después del corte de nervio óptico en mamíferos adultos (Bähr et al., 1992). No obstante lo anterior, para otros autores, estos resultados son controversiales, ya que no han encontrado diferencias entre el implante de NP fresco y el de NPP, o sólo se ha podido demostrar que el NPP tiene efectos benéficos sobre la regeneración neuronal *in vitro* pero no *in vivo* (Hasan et al., 1996).

Índice de mielinización.

Debido a que en nervios de mamíferos adultos se ha observado una correlación directa entre el espesor de la vaina de mielina y el diámetro axonal (Williams y Wendell-Smith, 1971), se ha empleado el índice de mielinización (IDM) o radio "g" (Blight y Young, 1989) para establecer el espesor relativo de dicha vaina, de tal forma que mientras más pequeño sea el IDM existirá una cubierta de mielina proporcionalmente más gruesa; es decir, un axón mielinizado presentará índices inferiores a la unidad y uno amielínico tendrá un IDM igual a 1 (Guy et al., 1989).

Se sabe que el IDM óptimo para que exista una adecuada propagación de los impulsos nerviosos en las fibras mielínicas oscila entre 0.60 y 0.80, con variaciones específicas

Tabla 1. Tiempos reportados por diferentes autores en los cuales las células de Schwann, los fibroblastos y los macrófagos alcanzan su máxima población después de sección de nervio ciático.

Autor	Tiempo en el que cada tipo celular alcanza su máxima proliferación		
	Schwann	Fibroblastos	Macrófagos
Miyamoto et al., 1986 NC de rata Wistar, macho Duración del estudio: 1-12 meses	1m	6m	1m
Perry et al., 1987 NC de rata Long-Evans y ratón cepa CBA/J y BALB/c Duración del estudio: 0.5-21 días			3-5d
Salonen et al., 1988 NC de rata Wistar, hembra Duración del estudio: 1-30 semanas	10s	6s	6s
Clemence et al., 1989 NC de rata Sprague-Dawley Duración del estudio: 1-8 días	3d		3d
Komiyama y Suzuki, 1992 NC de ratón cepa C3HeB/SeJ Duración del estudio: 1-7 días	3d		
Siironen et al., 1994 NC de rata Wistar, macho Duración del estudio: 3-56 días	14d		
Avelino et al., 1995 NC de rata Lewis, macho Duración del estudio: 4 hrs-35 días			21d

NC= nervio ciático, d = día, s = semana, m = mes.

Nota: en todos los casos la lesión del nervio fue realizada por sección, excepto en el estudio de Perry, 1987, en el que la lesión fue por compresión.

entre las diferentes especies y entre las distintas estructuras nerviosas de la misma especie (Williams y Chalupa, 1983).

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

Manejo farmacológico de la lesión traumática de la médula espinal con metilprednisolona.

Como los glucocorticoides han mostrado su efectividad en el tratamiento de una amplia variedad de lesiones traumáticas del SNC, se seleccionaron de entre los demás fármacos para su estudio y a la metilprednisolona (MP) de entre éstos para emplearla en la LTME, debido a que su radical succinato le permite atravesar las membranas celulares más efectiva y rápidamente que otros radicales (Wilson, 1974).

Con el empleo de la MP en modelos experimentales con LTME se ha demostrado su efecto neuroprotector, al inhibir a la PLA₂ (Haynes y Murad, 1990; Hirata et al., 1980), atenuar el incremento de la PGE₂ (Hall et al., 1995), inhibir los radicales de oxígeno y con ello la LP (Anderson et al., 1985; Anderson y Means, 1985; Braughler y Hall, 1982; Demopoulos et al., 1982; Hall y Baughler, 1981 y 1982; Saunders et al., 1987). La MP también protege las membranas celulares (Braughler, 1985) y previene la isquemia postraumática en la ME al mantener el flujo sanguíneo tisular (Hall et al., 1984; Young y Flamm, 1982), mejora y mantiene el metabolismo energético aerobio (Anderson et al., 1982; Braughler y Hall, 1983a y 1984), previene o revierte la acumulación intracelular del calcio (Young y Flamm, 1982) y evita la destrucción del citoesqueleto mediada por enzimas activadas por este ión (Rosenberg-Schaffer y Lucas, 1993), inhibe la hidrólisis lipídica (liberación de ácido araquidónico) y la formación de ecosanoides (Anderson et al., 1985; Hirata et al., 1980), disminuye la acidosis láctica (Hall, 1991), reduce la degradación de neurofilamentos (Braughler y Hall, 1984), evita la pérdida de colesterol,

facilita la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Hall, 1982), permite la recuperación de los potenciales evocados somatosensoriales (Young y Flamm, 1982), disminuye, tanto las alteraciones funcionales de la ME, como la extensión del tejido dañado (Means et al., 1981; Braugher et al., 1987), facilita la conducción de impulsos nerviosos y promueve la recuperación funcional (Braugher y Hall, 1982 y 1984; Demopoulos et al., 1982; Green et al., 1980; Hall, 1991; Hall et al., 1984; Means et al., 1981; Young y Flamm, 1982).

Para que la MP ejerza su efecto neuroprotector se deben tomar en consideración los siguientes puntos:

1. La curva dosis/respuesta de la MP es bifásica y presenta una estrecha ventana terapéutica. La MP posee efecto como antioxidante si se administra a dosis de 30 mg/kg de peso corporal, pierde dicho efecto a 60 mg/kg y promueve la LP a 90 mg/kg (Braugher y Hall., 1982; Hall, 1991; Hall y Braugher, 1981 y 1982). La explicación más lógica es que la farmacología para megadosis de MP está mediada por un efecto directo sobre las membranas y no sobre los receptores a esteroides (Hall, 1992).
2. La presentación de efectos colaterales como inmunosupresión, úlcera péptica, alteraciones en la glucosa y en el nitrógeno ureico, ocurren sólo después de la administración prolongada (más de 10 días) de grandes dosis estándar de MP pero no durante periodos cortos de administración, incluso con 30 mg/kg, ya que aparentemente los efectos colaterales están más con relación al tiempo que dura el tratamiento que con las dosis empleadas (Bracken et al., 1984; Gerndt et al., 1997; Novak et al., 1970).
3. La vida media plasmática de la MP oscila de 2 a 3 hrs en la ME no lesionada (Antal et al., 1983; Braugher y Hall, 1982, 1983a y 1984; McGinley, et al., 1982), mientras que después de una LTME la eliminación de la MP puede ser más lenta, lo que llega a conferirle una vida media aproximada de 6 hrs (Braugher y Hall 1983 a y b).

4. Mientras que algunos autores han comunicado que una sola dosis de MP puede permitir una recuperación motora significativa después de una LTME (Demopoulos et al., 1982; Holtz et al., 1990; Young y Flamm, 1982), otros investigadores afirman que con base en sus características farmacocinéticas, la MP debe administrarse bajo un régimen de 24 a 48 hrs para tener efecto sobre los eventos fisiopatológicos tempranos en este tipo de afecciones (Bracken et al., 1997; Braugher y Hall, 1983a y 1984; Hall et al., 1984; Hall y Braugher, 1982; Young y Flamm, 1982).

5. El tratamiento debe iniciarse, de preferencia, dentro de los 30 min posteriores a la lesión, ya que la pérdida tisular postraumática y la disminución progresiva del flujo sanguíneo en el sitio afectado reducen rápidamente la capacidad de la MP para llegar a la ME (Braugler y Hall, 1983b; Hall et al., 1984; Iizuka et al., 1986).

A partir de 1979 el NASCIS I (National Acute Spinal Cord Injury Study) realizó un estudio de patrones de recuperación neurológica en pacientes con LTME tratados durante 10 días con dosis relativamente altas de MP (0.1g a 1g), sin encontrar resultados satisfactorios (Bracken et al., 1984 y 1985). No obstante lo anterior, después del estudio clínico realizado por el NASCIS II, se estableció que la administración de megadosis de MP constituía el tratamiento de elección en la fase aguda de una LTME. En este estudio se observó una mejoría funcional discreta en humanos con LTME cuando la MP se administró dentro de las primeras 8 hrs a razón de 30 mg/kg de peso corporal, seguida de una infusión de 5.4 mg/kg por h durante 23 hrs después de la lesión, con la obtención de mejores resultados mientras menos severo fue el daño (Bracken et al., 1990 y 1992; Constantini y Young, 1994).

Recientemente el NASCIS III estableció que los pacientes con LTME que reciben tratamiento con MP dentro de las primeras 3 hrs después de la lesión deben continuar el fármaco durante 24 hrs y si inician entre las 3 y 8 hrs posteriores al trauma, el régimen se debe mantener durante 48 hrs. Más aún, al comparar los efectos de la MP con los producidos por un neuroprotector nuevo denominado tirilizado, se obtuvieron resultados muy similares (Bracken et al., 1997).

En teoría, la MP puede tener algún efecto protector sobre las vainas de mielina por su capacidad para inhibir la LP. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado este fenómeno, es decir, que aún cuando la MP se considere como el estándar de comparación para desarrollar agentes más efectivos (Rhoney et al., 1996), en la actualidad sigue en estudio y debate la explicación de los mecanismos a través de los cuales las megadosis de este fármaco protegen a la ME después de una LTME (Bracken et al., 1997; Hall, 1991; Hall, et al., 1995; Hsu y Dimitrijevic, 1990). El esclarecimiento de estos mecanismos es importante para establecer directrices terapéuticas racionales aplicables a esta patología, ya que la MP solo reduce el déficit neurológico y la pérdida de tejido de manera parcial y no protege al SNC de todos los efectos deletéreos producidos por la lesión (Braughler et al., 1987).

Tratamiento actual de la lesión traumática de la médula espinal.

Actualmente el manejo inicial de los pacientes con LTME incluye la inmovilización de la columna lesionada, mantener una vía aérea, oxigenación y tratamiento del choque neurogénico. Además, todos estos pacientes deben recibir un bolo IV de MP 30 mg/kg de peso dentro de las primeras 8 hrs posteriores al trauma, seguida de una infusión de 5.4 mg/kg por hr durante 23 hrs (Fehlings and Low, 1996), con el descarte de la realización de una laminectomía de primera intención, ya que los pacientes sometidos a cirugía no muestran diferencias en la recuperación neurológica un año después de la lesión, al compararlos con los pacientes tratados con MP (Duh et al., 1994).

Sin embargo, aún cuando los avances en los cuidados médicos han incrementado la supervivencia y la longevidad de los pacientes con LTME, todavía no existe ningún tratamiento que permita una recuperación neurológica efectiva, por lo que se siguen ensayando diversas estrategias terapéuticas, tanto en el área de transplante de tejidos y el uso de factores neurotróficos, como en el área farmacológica (Bracken et al., 1992; Constantini y Young, 1994; Duncan et al., 1988; Faden, 1996; Paino y Bartlett, 1991; Pitts et al., 1995; Young, 1992).

Modelos experimentales.

Los diferentes modelos experimentales que se han empleado en el laboratorio proporcionan un amplio espectro de lesiones de origen diverso, calidad y severidad (Anderson et al., 1983; Braughler et al., 1987; Braughler y Hall, 1983 y 1984; Demopoulos et al., 1982; Green et al., 1980; Hall, 1985; Hall y Braughler, 1982; Hall et al., 1984; Iizuka et al., 1986; Means et al., 1981). No obstante lo anterior, en la actualidad, la lesión experimental tipo contusión-compresión es el modelo que en muchos aspectos semeja lo que ocurre en humanos con LTME (Das, 1989; Kakulas, 1987; Wrathall, 1989), por lo que en el presente trabajo se empleó la contusión como modelo de lesión.

JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad existe una gran variedad de estudios sobre LTME enfocados al análisis de la regeneración de los axones afectados, sin embargo, no se ha puesto igual atención a los procesos de desmielinización y remielinización que tienen lugar en esta patología.

Lo anterior es trascendente, ya que después de una LTME en la que la ME no es seccionada completamente, la desmielinización produce bloqueo en la conducción de impulsos nerviosos en los axones sobrevivientes, lo cual contribuye de manera importante en la producción del déficit funcional. Asimismo, se ha descrito que la recuperación en esta patología depende, en gran parte, de la proporción de remielinización que pueda generarse.

En la LTME los beneficios obtenidos con los tratamientos existentes hasta la fecha son limitados, ya que todas las estrategias ensayadas para evitar o limitar el daño no han mostrado beneficios significativos. La solución podría radicar en combinar diferentes tratamientos con mecanismos de acción distintos, como la MP y el implante de NPP.

Hasta la fecha no se ha documentado el efecto que, sobre las vainas de mielina, pudiera tener la administración de megadosis de MP y tampoco se ha estudiado de manera específica y objetiva el efecto que sobre la remielinización de los axones centrales, pudieran tener los implantes de NPP después de una LTME severa en ratas adultas. Por lo que en el presente trabajo se intenta demostrar si esta combinación podría representar una alternativa terapéutica en este tipo de lesiones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1. ¿Será la MP capaz de evitar la desmielinización secundaria de los axones que sobreviven después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas y de mantener, por ende, el IDM cerca de los parámetros de normalidad?
2. ¿Se logrará una mejor remielinización de los axones centrales y se mantendrá el IDM más cerca de los parámetros de normalidad después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas si se realizan implantes de NPP al compararla con la remielinización espontánea y la inducida por implantes de NP fresco?
3. ¿Será la combinación de MP e implante de NPP capaz de mantener el IDM más cerca de los parámetros de normalidad al compararlos con su efecto por separado?

HIPÓTESIS.

1. La administración de MP después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas evitará la desmielinización de los axones que sobreviven después de la lesión y por ende mantendrá el IDM cerca de los parámetros de normalidad.
2. Después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas, el implante de NPP permitirá una mejor remielinización de los axones y mantendrá el IDM más cerca de los parámetros de normalidad que la remielinización espontánea y la obtenida con implantes de NP fresco.
3. La combinación de MP e implante de NPP permitirá mantener el IDM más cerca de los parámetros de normalidad al compararlos con su efecto por separado

OBJETIVOS.

I. Determinar el IDM de los axones centrales después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas.

II. Evaluar el posible efecto que sobre el IDM y/o el número de fibras mielinizadas, después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas, pudieran tener:

1. La administración de MP
2. El implante de NP fresco
3. El implante de NPP
4. La combinación de MP y el implante de NP fresco
5. La combinación de MP y el implante de NPP

III. Evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos para determinar si la combinación de MP y el implante de NPP ejerce un efecto sinérgico que permita mantener y/o mejorar el IDM y el número de fibras mielinizadas después de una lesión por contusión severa de la ME de ratas adultas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Población de estudio.

Se utilizaron 83 ratas Long-Evans, hembras, adultas (de 12 a 14 semanas de edad), con peso corporal entre 210 y 250g, aparentemente sanas y sin ningún procedimiento experimental previo. Todas las ratas fueron sometidas a lesión por contusión de la ME a nivel torácico 9 (T9) y se dividieron para su estudio en 6 grupos. La asignación de los animales para cada grupo se hizo mediante sorteo.

Grupos de estudio.

Grupo 1. ratas con contusión de la ME (Control).

Grupo 2. ratas con contusión de la ME tratadas con MP (MP).

Grupo 3. ratas con contusión de la ME tratadas con implante de NP fresco (NP).

Grupo 4. ratas con contusión de la ME tratadas con implante de NP fresco y MP (NPMP).

Grupo 5. ratas con contusión de la ME tratadas con implante de NPP (NPP).

Grupo 6. ratas con contusión de la ME tratadas con implante de NPP más MP (NPPMP).

Tiempos de corte del estudio.

Las ratas de los grupo 1 y 2 se estudiaron a las 21 hrs, 7 días, 2 y 4 meses después de la contusión. Las ratas de los grupos 3, 4, 5 y 6 recibieron el tejido de implante (NP fresco o NPP) un mes después de la lesión por contusión severa de la ME y se estudiaron a los 2 y 4 meses después de la lesión, es decir, 1 y 3 meses después del implante.

Consideraciones éticas.

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron con apego a las normas de la Ley General de Salud de la República Mexicana.

Variables.

Variables independientes: tratamiento con MP, NP y NPP después de lesión por contusión severa de la ME.

Variables dependientes: índice de mielinización, porcentaje de funcionalidad, número total de axones, colaterales axónicas, fibras mielinizadas y fibras amielínicas.

Criterios de selección.

Criterios de inclusión: en el grupo de animales que se estudió a las 21 hrs posteriores a la lesión, se incluyeron todas aquellas ratas en quienes después de la contusión se corroboró bajo visión estereoscópica la presencia de un hematoma en el segmento medular correspondiente a T9. Y para los otros grupos se incluyeron los animales que además de cumplir con el criterio anterior presentaron paraplejía desde el momento en el que se recuperaron de la anestesia.

Criterios de no inclusión: no se incluyeron las ratas que presentaron después de la contusión un hematoma lateralizado de tal forma que no comprendiera la zona central de la ME, y las que al recuperarse de la anestesia no presentaron paraplejía o esta fue lateralizada. Tampoco se incluyeron los animales que el día del implante no presentaron una cavidad quística en el sitio de lesión medular, porque ello no permite la colocación del tejido de implante.

Criterios de exclusión: se excluyeron todas las ratas que presentaron complicaciones como autofagia, infección severa de las vías urinarias y neumonía, entre otras causas, que no les permitieron llegar al tiempo asignado de estudio.

Método de anestesia.

Antes de cada procedimiento quirúrgico y del sacrificio, los animales fueron anestesiados, vía intramuscular, en la cara externa del muslo derecho, con una mezcla de clorhidrato de ketamina (75 mg/Kg) e hidrocloreuro de xilacina (12.5 mg/Kg).

Método de contusión de la médula espinal.

Bajo el efecto de la anestesia y mediante técnica estéril se realizó una incisión media sagital en la piel de la región torácica baja de las ratas y se disecaron los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas. Posteriormente se separó el periostio de las láminas vertebrales con una hoja de bisturí del número 20 y se extirparon las apófisis espinosas de los niveles torácicos 8 y 9 mediante gubia tipo Beyer, para visualizar los procesos laminares de T9. A continuación se extrajo la lámina para exponer las meninges y la porción dorsal de la ME sin lesionarlas. Una vez concluida la laminectomía los animales se colocaron en un equipo de cirugía estereotáxica (Fig. 2). La contusión de la ME se realizó con la técnica de Allen (1911) modificada (Guizar et al., 1994) para lo cual se dejó caer un cilindro de acero inoxidable (con peso de 15 g, con una punta roma de 2 mm de diámetro y 1 cm de largo) de una altura de 10 cm (lesión severa de 150 g/cm), a través de un tubo guía sobre la ME expuesta. Casi de inmediato se observó el sitio del impacto a través del microscopio quirúrgico, para comprobar la formación de un hematoma en la zona mediasagital de la ME y para corroborar la integridad de la duramadre. Los hematomas se evaluaron y se clasificaron de acuerdo a los siguientes parámetros:

1. Según su tamaño en:
 - a) chico: se observa en menos de la mitad de la laminectomía
 - b) mediano: se extiende en la mitad de la laminectomía
 - c) grande: abarca toda la laminectomía
2. Según su localización en relación al eje longitudinal de la ME en:
 - a) medial: si se localiza en la porción media de la ME en relación a la lámina
 - b) caudal: si se encuentra más distal
 - c) cefálico: si se localiza más proximal
3. Según su localización con respecto al eje transversal de la ME en:
 - a) central: si se localiza sobre la línea media
 - b) lateralizado: si se encuentra desplazado hacia la izquierda o la derecha

Al término, la fascia muscular y la piel en la incisión quirúrgica se suturaron por planos con puntos simples con dermalón 5 ceros.



Figura 2. La fotografía ilustra el aparato estereotáxico en el cual se lesionó a los animales. Las ratas se colocaron, bajo los efectos de la anestesia y previa laminectomía a nivel T9, sobre una plancha (P) y se les sujetó la cabeza con los tornillos de fijación (F). Después, se dejó caer el impactador (cilindro de acero inoxidable con 2 mm de diámetro en su punta y 15 g de peso) por un tubo guía (T) a una distancia de 10 cm, sobre la médula espinal expuesta. El procedimiento se realizó utilizando un microscopio quirúrgico (Q).

Administración de la metilprednisolona.

La MP en forma de succinato de sodio (Solu-Medrol, Upjohn, Kalamazoo, Mich. USA) se administró 5 min después de la lesión de la ME, a razón de 30 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal como dosis inicial; 2 y 4 hrs después de la primera aplicación se repitió la dosis. Después de 8 y 24 hrs de la primera aplicación, la MP se administró a razón de 60 mg/kg de peso corporal, vía intramuscular en la cara externa del muslo izquierdo.

Cuidado posoperatorio de los animales.

Al finalizar cada procedimiento quirúrgico, a cada rata se le administró vía intramuscular, en la cara externa del muslo derecho, 200 000 UI de penicilina benzatínica. Los animales se colocaron en jaulas individuales y se alimentaron a libre demanda. El intestino y la vejiga neurogénicos se manejaron con expresión manual según se requirió en cada caso.

Las ratas que llegaron a presentar infección leve a moderada a nivel de las úlceras de decúbito o por autofagia leve de las extremidades posteriores, recibieron curaciones con isodine espuma y solución salina isotónica, seguida de aplicación tópica de furaxona (Topazone).

Preparación del sitio de lesión para trasplante.

Los implantes en las ratas de los grupos 3, 4, 5 y 6 se realizaron un mes después de la lesión por contusión de la ME. Las ratas de los grupos 4 y 6 recibieron tratamiento con metilprednisolona tal y como se describió previamente, excepto porque la primera dosis se administró 5 minutos antes de iniciar el procedimiento quirúrgico para implante del tejido correspondiente (NP fresco o NPP). Posteriormente, los animales se colocaron en decúbito ventral, bajo los efectos de la anestesia y previa tricotomía y asepsia de la región dorsal, se procedió a realizar una incisión sobre la cicatriz quirúrgica previa. Empleando un microscopio quirúrgico se disecó el tejido cicatrizal en todo el trayecto del abordaje previo. Una vez identificado el sitio de lesión sobre la duramadre de la ME, se incidió caudalmente sobre esta mediante el bisel de una aguja del número 25. La

apertura de la duramadre se completó de manera longitudinal sobre la línea media con tijeras para microcirugía, en un trayecto que abarcó toda la zona de lesión, más 1 mm proximal y otro distal. Todo el procedimiento se realizó teniendo cuidado de manipular lo menos posible los extremos de la ME preservada, así como la zona misma de lesión.

Una vez completada la apertura de la duramadre, se realizó una mielotomía sagital con el bisel de una aguja del número 25, la cual se completó con tijeras rectas de microcirugía abarcando toda la longitud de la apertura dural. Al identificar la cavidad quística intramedular se procedió a prepararla como receptáculo del tejido de implante, por lo cual se introdujo en su interior un fragmento de Gelfoam compactado para permitir la colocación de 2 puntos de referencia (nylon 11 ceros) en la duramadre que al final de la maniobra permitió suturarla herméticamente. Posteriormente se extrajo el Gelfoam y se instiló una mezcla de colagenasa (tipo IA de Sigma) al 0.25% más hialuronidasa (tipo III, de Sigma) al 0.1%, a razón de 20 ml de cada una, en un lapso de 3 min por aplicación, seguido de aspiración de las mismas. Esta maniobra se realizó en 5 ocasiones, seguida de irrigación con 4 ml de solución Hartman aplicada directamente sobre el área de lesión con una jeringa. Posteriormente se aspiró la zona de lesión durante 30 segundos a una intensidad de 2 cm de Hg., con un aspirador Cenco Hyvac 14 (Cenco Inst Corp, Chicago, USA) a través de un punzocat del número 19 desprovisto de su aguja y se procedió a instilar sobre el área de lesión, solución Hartman para facilitar la eficiencia de la aspiración del tejido cicatrizal y de las células inflamatorias (Grijalva et al., 1996). Durante el procedimiento quirúrgico se evaluó el tamaño de la cavidad quística y la cantidad de fibrosis formada en el sitio de lesión.

Los quistes se clasificaron según su tamaño en:

- a) chico: aquéllos que midieron menos de 2 mm de longitud
- b) mediano: los que midieron entre 2 y 4 mm de longitud
- c) grande: los que tenían más de 4 mm de longitud

El grado de fibrosis se clasificó en:

- a) escasa: permite distinguir la coloración blanco-nacarada de la ME y los vasos capilares en su superficie.
- b) moderada: se observa una capa de tejido fibroconectivo color gris-rojizo, pero en algunas porciones se aprecia la coloración blanco-nacarada de la ME. Al manipular esta fibrosis con colagenasa más hialuronidasa se elimina casi en su totalidad.
- c) abundante: se observa una capa gruesa de tejido fibroconectivo que no permite visualizar la ME y al manipularla con las enzimas se elimina de manera parcial.

Al término de la maniobra se implantaron aproximadamente 4 mm de NP fresco o de NPP según correspondió en cada caso, depositando el tejido en el interior de la cavidad formada, para permitir el contacto con las porciones rostral y caudal de la ME preservada. Finalmente se suturó la duramadre con puntos separados con nylon 11 ceros. Los demás planos quirúrgicos se suturaron con dermalón 5 ceros. Todos los animales recibieron los cuidados posquirúrgicos descritos previamente.

Obtención del nervio periférico fresco.

El NP utilizado para implante en los animales de los grupos 3 y 4 se obtuvo de la rama peroneal del nervio ciático de la extremidad posterior derecha de cada una de las ratas de este grupo (implante autólogo, heterotópico). Para ello las ratas se colocaron bajo los efectos de la anestesia en decúbito ventral. Previa tricotomía de la región glútea y del muslo, en condiciones asépticas, se realizó una incisión cutánea longitudinal de 2.5 cm aproximadamente, luego se disecaron los músculos hasta identificar y disecar el nervio ciático. A partir 1.5 cm de la región más proximal se resecó un fragmento de 1 cm de longitud. El nervio se colocó en solución balanceada de Hank a 37°C. Con técnica microquirúrgica se eliminó el epineuro en su totalidad utilizando unas pinzas de punta fina, un gancho romo y una espátula para microcirugía. Se obtuvieron 4 mm del nervio y este se seccionó en 4 fragmentos con tijeras de microcirugía. El procedimiento se realizó el mismo día del implante, es decir, que el tejido se colocó en el sitio de lesión un mes después de la contusión y previa preparación de la cavidad quística, según se refirió anteriormente.

Obtención del nervio periférico predegenerado.

Debido a la controversia que existe en la literatura sobre el momento en el que los macrófagos y las CS alcanzan su pico máximo de proliferación o reclutamiento después de lesión del NP, se elaboró un protocolo en paralelo para identificar dicho momento en nuestro modelo experimental.

El estudio se realizó en la rama peroneal del nervio ciático de 24 ratas Long-Evans, hembras, entre 12 y 14 semanas de edad, con peso corporal de 230 a 250g y sin procedimientos quirúrgicos previos. Las ratas se dividieron en un grupo control al que no se le realizó ningún procedimiento quirúrgico, un grupo maniobra con el procedimiento quirúrgico pero sin lesión y un grupo experimental en el que el nervio peroneal fue lesionado mediante sección transversal completa. Antes de cada procedimiento quirúrgico los animales se anestesiaron según se describió con anterioridad. Posteriormente, bajo condiciones de asepsia y antisepsia se disecó la rama peroneal del nervio ciático y a través del epineuro se colocó una sutura 6 ceros a 4 mm de la bifurcación y otra a 8 mm de la primera, se realizó un corte transversal completo entre las 2 suturas, se dobló completamente el extremo proximal del nervio y se fijó sobre su propio epineuro, mientras que el extremo distal se dobló en un ángulo mayor de 90° y se fijó a la aponeurosis del músculo adyacente para evitar que se llevara a cabo una regeneración espontánea. Este procedimiento se realizó en ambas extremidades posteriores en los animales del grupo experimental, mientras que en el grupo maniobra sólo se disecó el nervio , pero no se suturó ni seccionó.

Una vez cumplido el tiempo de estudio para cada grupo, los animales fueron sometidos a una segunda cirugía 3, 7, 30 y 60 días después de la lesión. Los nervios de los animales del grupo control y maniobra se estudiaron a los mismos tiempos que el grupo experimental.

Se tomaron 10 mm del muñón distal de cada nervio a partir del sitio de sección y regiones correspondientes en los nervios control para ser fijados en formol amortiguado

al 10% y procesarlos para hacer cortes en parafina de 8 μm de grosor, iniciando a 2 μm del sitio de lesión. Los cortes fueron teñidos por inmunohistoquímica con la técnica ABP (Coggi et al., 1986; Bancroft, 1990), utilizando el anticuerpo policlonal anti-S100 (Sigma Immunochemicals) a una dilución de 1:100 para la identificación de CS. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario durante 24 hrs a 4°C, se agregó el anticuerpo secundario biotinilado durante 10 min a temperatura ambiente y luego se incubó en el complejo estreptoavidina-peroxidasa durante 10 min; se reveló con amino-etil-carbazol y se contrastó con hematoxilina de Harris. Para la identificación de fibroblastos y macrófagos, se utilizaron cortes por congelación de 6 μm de grosor, los cuales fueron adheridos a portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 0.1% (Sigma) y fijados en acetona absoluta a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se procesaron mediante inmunohistoquímica como se describió previamente utilizando el anticuerpo HIS43 (Serotec) a una dilución de 1:500 para la identificación de fibroblastos, mientras que los macrófagos fueron identificados mediante histoquímica enzimática para esterasa inespecífica, para lo cual los tejidos se incubaron durante un máximo de 20 minutos, monitorizándose con el microscopio, en un medio que contenía 5 mg de α -naftil acetato (Sigma) en 0.2 ml de acetona, 1.2 ml de pararosanilina hexazotizada y 20 ml de amortiguador de fosfatos, 0.1M, pH 7.0, posteriormente, se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Bancroft, 1990). Todos los cortes fueron montados con medio acuoso en polivinil-alcohol (Zymed).

La cuantificación celular se llevó a cabo en un microscopio óptico Zeiss, con el objetivo de 40x, dicha cuantificación se realizó sobre el área total del corte transversal del nervio basándose en el método modificado del Disector (Sterio, 1984), para lo cual se consideraron como parámetros de selección a la reacción inmunopositiva o enzimático positiva y la presencia del núcleo y el citoplasma celular. Se evaluó el número total de núcleos por corte y el número de núcleos asociados a la reacción inmunopositiva o enzimático-positiva y se obtuvo el porcentaje correspondiente para cada tipo celular.

Se observó que los macrófagos alcanzan su población máxima a los 7 días y ésta desciende en forma importante a los 30, mientras que la población de CS presenta un

incremento considerable a los 7 días pero alcanza su máximo a los 30 días, y aún cuando los fibroblastos alcanzan su mayor número a los 60 días, ya desde los 30 el incremento es importante.

Con base en los resultados obtenidos en el estudio referido, la rama peroneal del nervio ciático de la extremidad posterior de cada una de las ratas de los grupos 5 y 6 se lesionó 7 días antes del implante, es decir, 3 semanas después de la lesión por contusión de la ME. Para realizar el implante se utilizó la porción distal del nervio predegenerado en cada una de las ratas (implante autólogo, heterotópico) y se procedió a prepararlo de la misma forma que el implante de NP fresco.

Evaluación funcional.

La evaluación funcional se realizó empleando la prueba de locomoción libre sobre el piso, (Tarlov et al., 1953), la cual nos permite conocer de manera gruesa las características generales de la locomoción (Fig. 3). Las evaluaciones se realizaron 24 hrs. después de la contusión y posteriormente cada semana en cada una de las extremidades posteriores de acuerdo a una escala de 5 puntos:

Grado 0 (0%) parálisis flácida, no se observa ningún movimiento.

Grado 1 (25%) movimientos incoordinados e inconstantes.

Grado 2 (50%) movimientos coordinados con la marcha, pero con incapacidad para sostener el tren posterior.

Grado 3 (75%) movimientos coordinados con la marcha y capacidad para sostener el tren posterior

Grado 4 (100%) marcha de aspecto normal.

El investigador que realizó las evaluaciones ignoraba que procedimiento se le había realizado al animal en estudio, a fin de evitar el sesgo de los resultados.

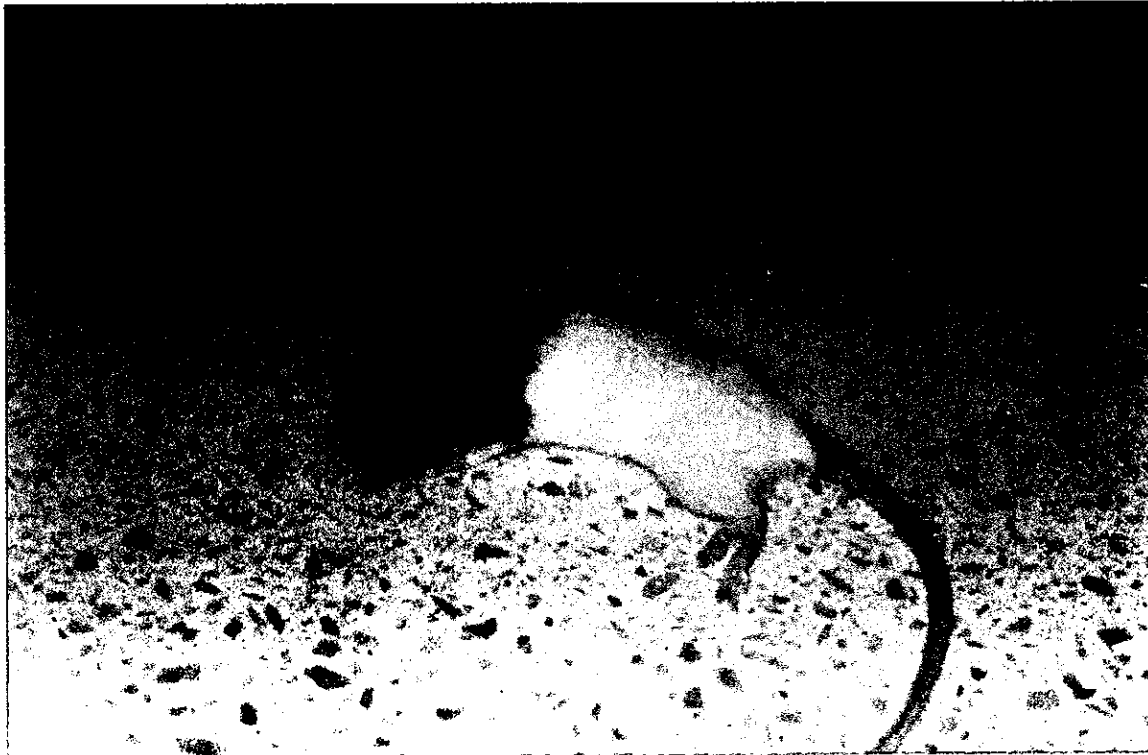


Figura 3. En la fotografía se muestra una rata del grupo control un mes después de la contusión, en la cual se evaluó la marcha libre sobre el piso. Según la escala de Tarlov modificada tiene un Grado 0, es decir, parálisis flácida sin ningún tipo de movimiento. Nótese la posición de las patas traseras del animal, lo cual refleja su incapacidad para sostener el tren posterior.

Sacrificio y preparación para estudio morfológico.

Cuando las ratas completaron el tiempo de estudio, según cada caso y previa anestesia, estas fueron sometidas a toracotomía amplia para canular la aorta ascendente y perfundir vía intracardiaca con una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer Inst. Co. Chicago Il.) 100 ml de amortiguador de cacodilatos 0.15M, pH 7.4, más 1000 UI de heparina a temperatura ambiente, seguida de 500 ml de glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al 2.5%, CaCl_2 al 0.05% y sacarosa 0.025M, en amortiguador de cacodilatos 0.1M y pH de 7.4 a 4°C. Las soluciones se perfundieron a una velocidad de 30ml/min.

Al término de la perfusión se extrajo la ME desde el nivel toracico 6 hasta el 12 (Fig. 4), se identificó macroscópicamente el sitio de lesión y a partir de ese punto se seccionó la ME a 2 cm en dirección rostral y 2 cm en dirección caudal y se colocó libre de meninges en glutaraldehído al 2.5%, CaCl_2 al 0.05% y sacarosa 0.025M en amortiguador de cacodilatos 0.15M, pH 7.4 por un lapso de 2 hrs, al término de las cuales se cortó la ME en el epicentro de la lesión.

Los fragmentos obtenidos se lavaron en amortiguador de cacodilatos y se posfijaron en una solución de tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilatos durante 1 hr, posteriormente se deshidrataron en alcohol en concentraciones ascendentes (50, 70, 80, 96 y 100%) y se incluyeron en resina EPOXICA 812.

Con un microtomo se realizaron cortes semifinos de 1 mm de espesor, tanto en la cara proximal como en la cara distal del punto considerado como el epicentro de la lesión con el microscopio quirúrgico, mismos que se tiñeron con azul de toluidina al 1% para observación en un microscopio de luz Nikon tipo 115, a fin de seleccionar el área para cortes finos, las cuales se cortaron en un ultramicrotomo y se montaron en rejillas de cobre de 400 espacios.

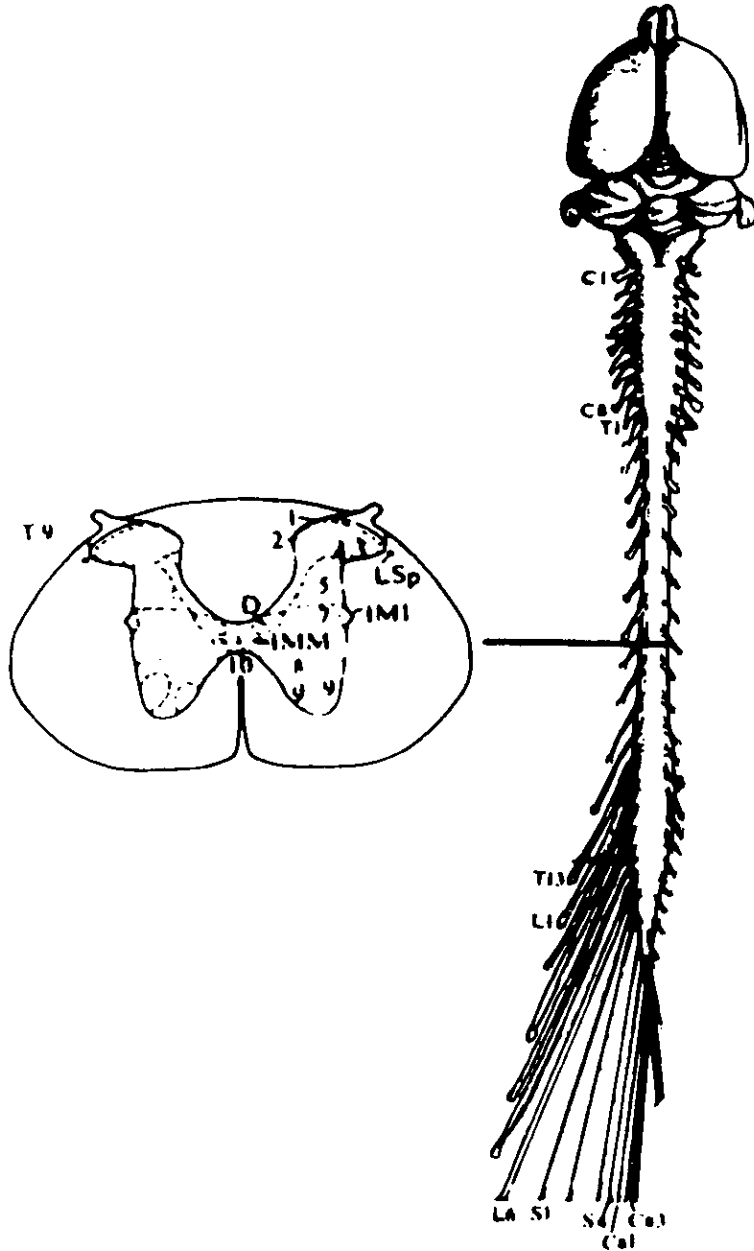


Figura 4. Dibujo de un corte longitudinal de la médula espinal y de sus raíces nerviosas, en donde se muestra la anatomía de dicha estructura en las ratas. En un corte transversal de la misma se ilustra el nivel torácico bajo (T9) en donde se realizó la lesión por contusión en todos los animales del presente estudio. D = núcleo dorsal de Clarke, IMM = columna celular intermediomedial, IML = columna celular intermediolateral, Lsp = núcleo espinal lateral, números del 1 al 10 = láminas de Rexed.

Posteriormente, se realizó otro corte tanto en dirección distal como en dirección proximal, a 100 μm de los cortes previos. El tejido así obtenido, se procesó según se refiere en el párrafo anterior y se comparó con los obtenidos previamente. Se continuó con los cortes cada 100 μm hasta identificar el epicentro de la lesión, el cual se caracterizó por ser la región con la mayor destrucción de tejido. Una vez identificado el epicentro se tomaron 2 cortes adicionales a 300 μm tanto en dirección distal como proximal a este punto, dichos cortes se montaron en rejillas de cobre de 400 espacios y después se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Con base en lo anterior, los parámetros morfométricos estudiados corresponden al promedio de los datos obtenidos a nivel del epicentro y a los datos en los cortes a 300 μm tanto en dirección proximal como distal.

Los cortes así preparados, se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10 a 3 150 y 6 300X, en formato de 35 mm. Los axones y sus correspondientes vainas de mielina en los cordones posteriores y parte de los cordones laterales, contenidos en las fotomicrografías obtenidas por cada rata, se analizaron mediante técnica morfométrica.

A cada una de las ratas incluidas en el estudio se les asignó un número de identificación en una hoja de cálculo del programa de computación 1-2-3 de Lotus, en donde se vaciaron los datos obtenidos.

Estudio morfométrico

Para obtener el IDM, se proyectaron los negativos sobre un digitalizador Hewlett Packard 9874A, conectado a una computadora Hewlett Packard 9825B, donde se midió el diámetro del axón y el diámetro del mismo más la mielina, utilizando un programa de integración matemática que permite medir formas irregulares y las transforma en diámetros regulares. Posteriormente se dividió el primer resultado entre el segundo y se

obtuvo el índice para cada fibra. Se promediaron los índices de cada grupo y se obtuvo el IDM para cada uno.

El investigador que realizó las mediciones ignoraba a que procedimiento había sido sometido cada animal evaluado, con la finalidad de evitar el sesgo en los resultados.

Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaStat for Windows, Versión 1.0, Copyright 1992-1994 Jandel Co.

El análisis de los datos obtenidos sobre las diferentes poblaciones celulares después de lesión de la rama peroneal del nervio ciático se realizó mediante la prueba de análisis de varianza por rangos o Kuskal-Wallis y el procedimiento de comparación múltiple de Dunn. Las poblaciones celulares en cada grupo estudiado se expresan en porcentajes y se presentan en una gráfica de barras.

Las características del hematoma, el quiste intramedular y la fibrosis en la zona de lesión se presentan en tablas, con los datos expresados en números naturales y porcentajes.

Para el análisis de los datos sobre funcionalidad se utilizó estadística descriptiva. Para comparar los 2 grupos a 7 días después de la lesión se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar los 6 grupos a 2 y 4 meses después de la lesión se empleó la prueba de análisis de varianza por rangos Kruskal-Wallis. Los resultados se presentan en una gráfica expresados como porcentaje de funcionalidad, donde el 100% corresponde al parámetro de normalidad.

El número total de axones y el número total de colaterales axónicas se analizaron en conjunto y por separado mediante estadística descriptiva. Para comparar los 6 grupos a 2 y 4 meses después de la contusión, se utilizó la prueba paramétrica de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el método de comparación múltiple Student-Newman-

Keuls. Para comparar los 2 grupos a 21 hrs y 7 días se empleó la prueba t no pareada. Los datos expresados en números naturales se presentan en una tabla y 2 gráficas; y los expresados en porcentajes en una gráfica.

Para el análisis de los datos sobre IDM se empleó estadística descriptiva. Para comparar los grupos a 21 hrs y a 7 días y a 2 y 4 meses después de la lesión, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney . Los resultados se presentan en una tabla y se expresan como índices.

Los datos sobre el número de fibras mielinizadas y amielínicas se analizaron mediante estadística descriptiva. Para comparar los grupos a 21 hrs., 7 días, 2 y 4 meses después de la contusión, se empleó la prueba t no pareada. Los datos expresados como números naturales se presentan en gráficas.

En todos los casos se consideró como significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Cuantificación de macrófagos, células de Schwann y fibroblastos después de lesión del nervio ciático.

En el protocolo en paralelo que se realizó para identificar el momento en el que las CS, los macrófagos y los fibroblastos alcanzan su pico de máxima proliferación o reclutamiento en nuestro modelo experimental, después de sección transversal completa de la rama peroneal del nervio ciático, con el fin de obtener un NPP en condiciones óptimas para el trasplante, se obtuvieron los siguientes resultados:

La mayor cantidad de macrófagos identificados como células positivas a la reacción de esterasa inespecífica (Fig. 5A y 5B) se observó 7 días después de la sección del nervio, lo cual conformó el $25\% \pm 3$ (porcentaje \pm error estándar) de la población celular total, mientras que en el grupo control sólo representaron el $2\% \pm 0.3$. Es decir, 7 días después de la lesión del nervio, la población de los macrófagos se incrementó 13.5 veces.

Para las CS, identificadas como células S-100 positivas (Fig. 5C y 5D), el pico máximo de proliferación se alcanzó 30 días después de la sección del nervio, representando el $55\% \pm 2$ de la población celular, mientras que en el grupo control constituyeron el $33\% \pm 4$, lo que significa que este tipo celular incrementó 1.7 veces su población a los 30 días, mientras que a los 7 días el incremento en este tipo celular representó el $49\% \pm 3$, es decir, 1.5 veces su población.

Para los fibroblastos, identificados como células HIS43 positivas (Fig. 5E y 5F), el pico máximo de proliferación se observó a los 60 días de estudio, representando el $48\% \pm 3.3$, lo cual contrasta con el $16\% \pm 1.5$ observado en el grupo control. Así, los fibroblastos incrementaron 3 veces su población 60 días después de la lesión.

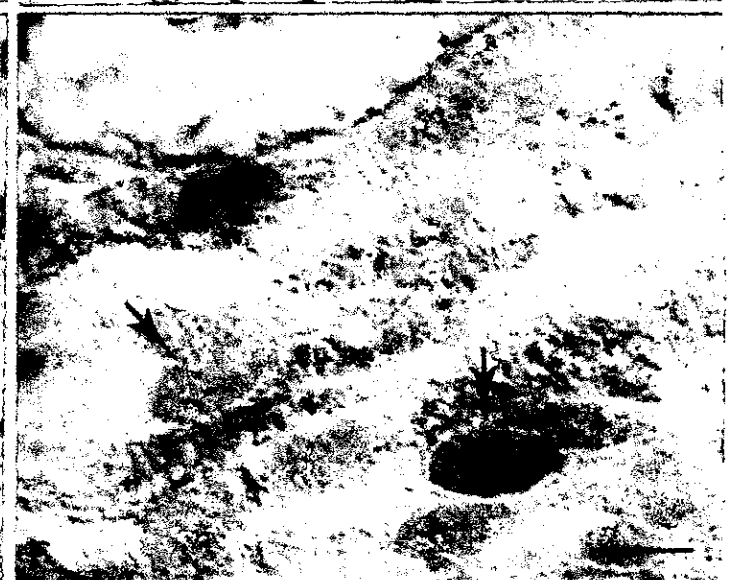
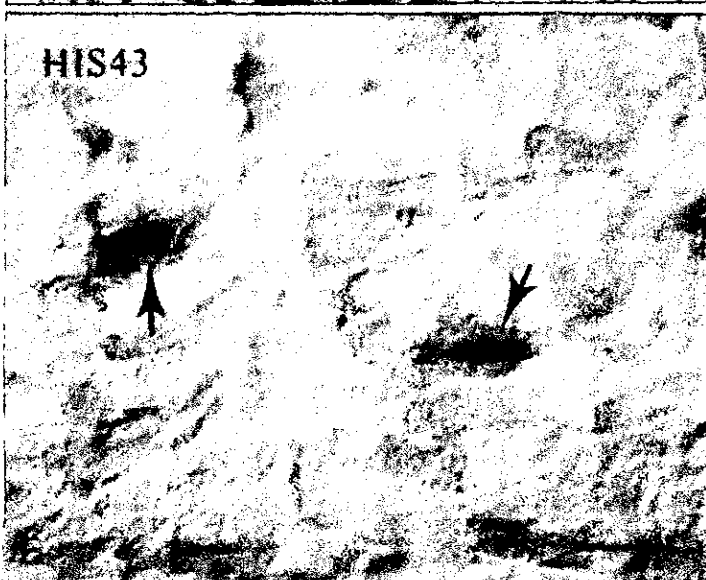
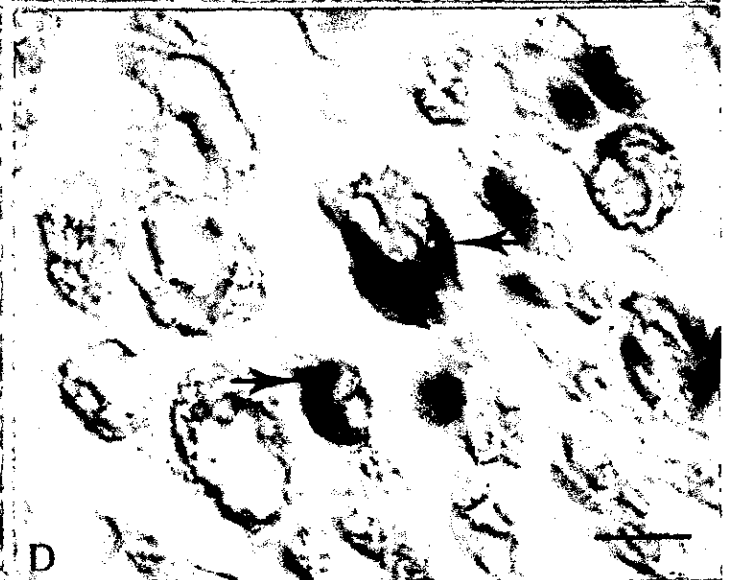
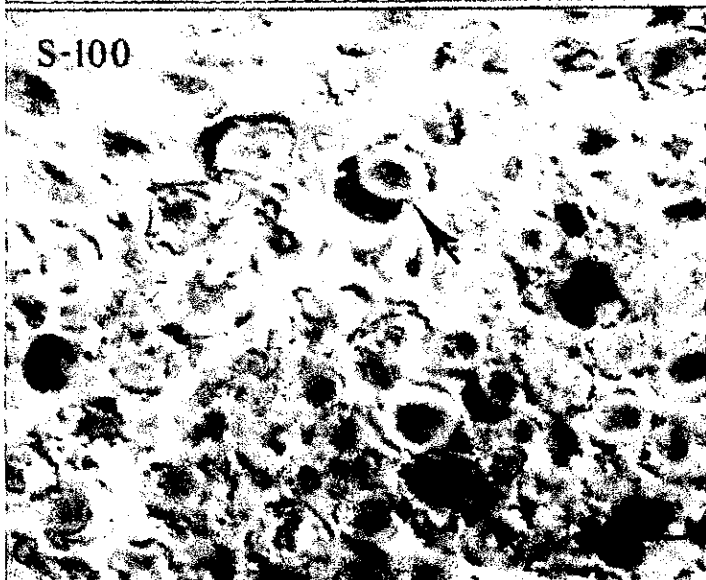
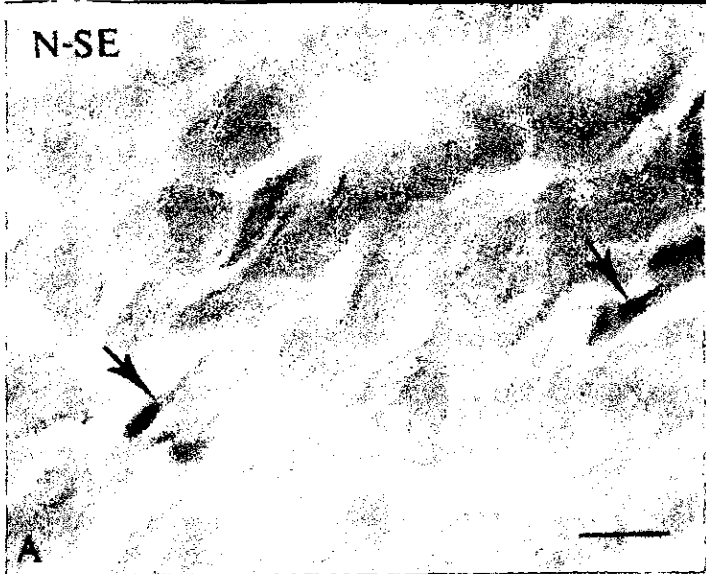


Figura 5. Corte transversal de la rama peroneal del nervio ciático de ratas adultas. Histoquímica enzimática para la identificación de células esterasa inespecífica positivas en un nervio sin lesión (A) y 7 días después de lesión por sección completa (B), en donde se aprecia el aumento en el número de células inmuno positivas después de la lesión. Inmunohistoquímica para la identificación de células S-100 positivas en nervio sin lesión (C) y 30 días después de lesión por sección completa (D). Inmunohistoquímica para la identificación de células HIS43 positivas en un nervio sin lesión (E) y 60 días después de la sección (F). Nótese que en todos los casos el tamaño de las células se incrementó después de la lesión del nervio, pero de manera especial en las células S-100 y HIS43 positivas. Contraste de interferencia diferencial de Nomarski. Barra = 10 μm .

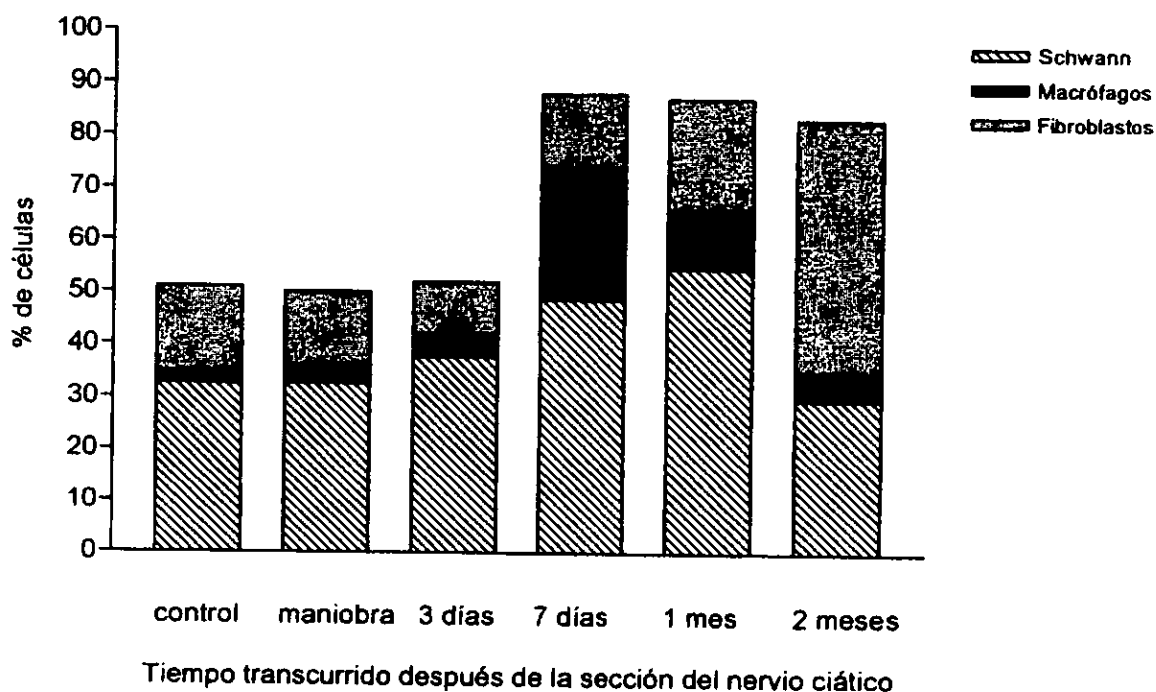
Al comparar los grupos controles correspondientes con los grupos experimentales al momento en el que cada tipo celular alcanzó su máxima población, se observó una diferencia con significancia estadística ($p < 0.05$) en todos los casos, no encontrándose ninguna diferencia al comparar los grupos control y maniobra en los 3 tipos celulares.

Para establecer el tiempo de predegeneración que debería tener el NP antes de ser utilizado como tejido de implante, se tomó en consideración lo siguiente: los macrófagos alcanzan su población máxima a los 7 días y ésta desciende en forma importante a los 30 días, mientras que la población de CS alcanza su máximo a los 30 días, sin embargo, presenta un incremento considerable a los 7, y aún cuando los fibroblastos alcanzan su mayor número a los 60 días, ya desde los 30 el incremento es importante (Gráfica 1). Con base en lo anterior se determinó que el NPP debería tener 7 días de predegeneración antes de ser implantado.

Contusión de la médula espinal.

Al utilizar el método de contusión de ME descrito en la sección de material y métodos, se observó que en los 83 animales incluidos en este trabajo, se produjeron hematomas con características que variaron de un animal a otro (Tabla 2). No obstante estas diferencias, todos los animales incluidos en el estudio presentaron parálisis de ambas extremidades posteriores, lo cual se evaluó, utilizando la escala de Tarlov modificada, en cuanto las ratas se recuperaron de la anestesia y después, una vez por semana hasta el momento del sacrificio.

El tipo de hematoma más frecuente fue el central, medial y mediano (Fig. 6) y no se encontró ninguna correlación entre las características del hematoma que se forma después de una contusión severa de la ME y el tamaño de la cavidad quística resultante de dicha lesión, ni con el grado de fibrosis o el porcentaje de funcionalidad observado en los animales lesionados.



Gráfica 1. Después de una sección completa de la rama peroneal del nervio ciático, se observó que los macrófagos alcanzan su máxima población 7 días después de la lesión, las células de Schwann a los 30 y los fibroblastos a los 60 días, en todos los casos se encontró significancia estadística con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticas al comparar el grupo control con el maniobra.



Figura 6. En esta imagen se ilustra la zona de lesión en la región central y medial de la médula espinal, en la cual se observa el hematoma formado inmediatamente después de la contusión (H), m = músculo.

Tabla 2. Características de los hematomas.

Por su localización en relación al eje transversal de la ME	%	Por su tamaño	%	Por su localización en relación al eje longitudinal ME	%
Central	62	Chico	26	Medial	70
Lateralizado a la izq.	30	Mediano	53	Caudal	17
Lateralizado a la der.	8	Grande	21	Cefálico	13

Con una N de 83 animales se encontró que el tipo de hematoma que se forma después de una lesión por contusión severa de la médula espinal, es por lo general central, mediano y medial.

Hallazgos transoperatorios.

En los 47 animales en los que se preparó la ME para recibir el implante de NP fresco o de NPP se evaluó de manera transquirúrgica el tamaño de la cavidad quística y la cantidad de fibrosis que se forma un mes después de la lesión por contusión de la ME (Fig. 7). Lo anterior es importante debido a que esta cavidad es la que se utilizó como receptáculo para colocar el tejido de trasplante.

Con base en la clasificación referida en la sección de material y métodos, se observó que casi el 50% de la población estudiada desarrolló quistes medianos después de la lesión y que alrededor del 11% de los animales no desarrollaron quiste (Tabla 3), sin embargo, reaccionaron ante la contusión con un adelgazamiento de la ME en la porción afectada.

En cuanto a la presencia de fibrosis en la zona de lesión a nivel intramedular, esta se evaluó en los mismos 47 animales según la clasificación referida en la sección de material y métodos. Con base en dicha clasificación, en nuestro modelo experimental, se observó que en el 66% de los casos se desarrolla fibrosis moderada (Tabla 4), la cual es factible de ser eliminada mediante manipulación enzimática (Grijalva et al., 1996).

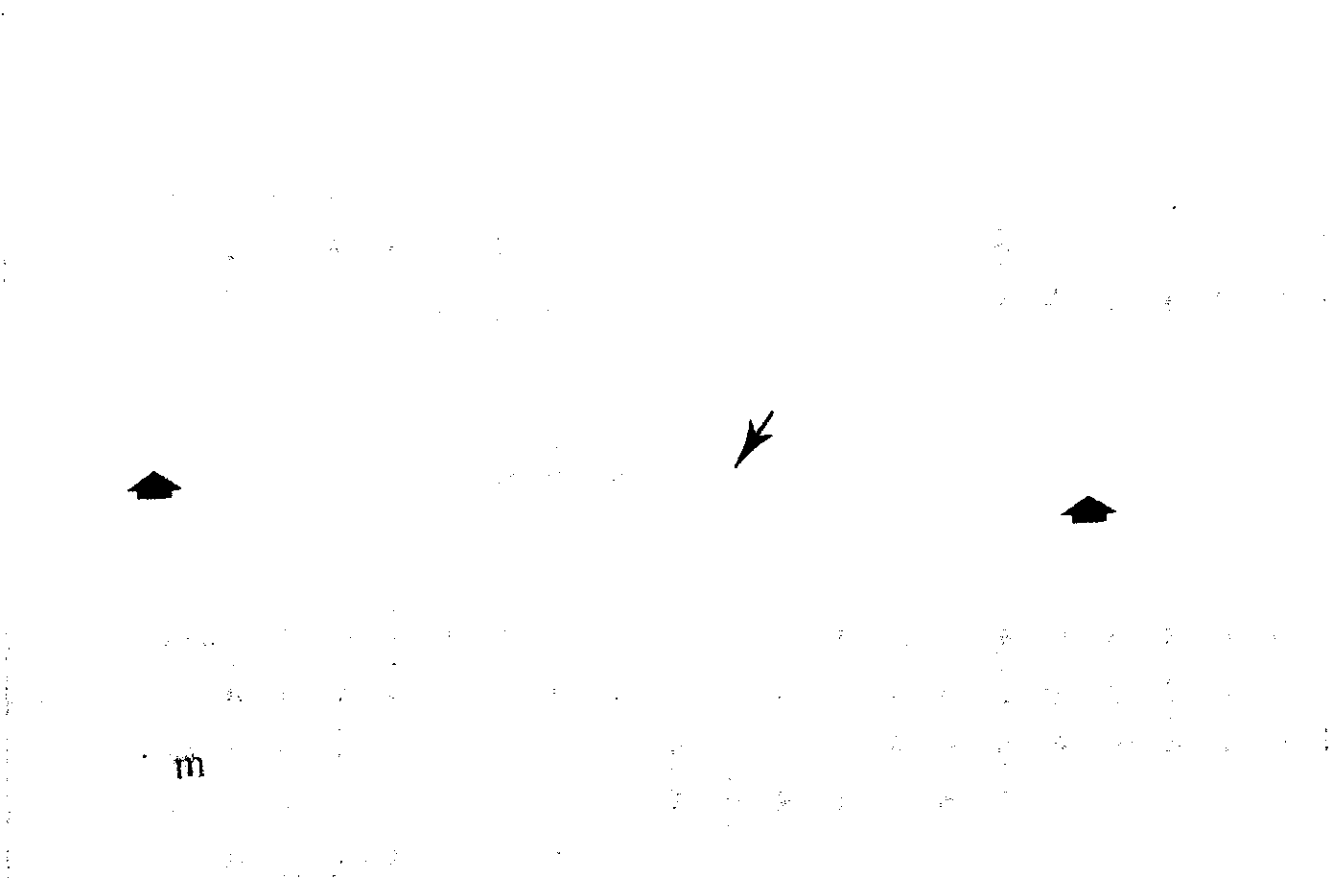


Figura 7. La fotografía ilustra la cavidad quística formada un mes después de la lesión por contusión severa de la médula espinal (flecha). La cavidad se preparó enzimáticamente con el fin de utilizarla como receptáculo para el tejido de implante. Nótese el adelgazamiento de los vasos sanguíneos hacia la región caudal y el engrosamiento hacia la región rostral (cabezas de flecha), así como las alteraciones en su trayecto, m = músculo.

Tabla 3. Tamaño de los quistes intramedulares.

Quiste	Número de casos	Porcentaje
Chico	12	25
Mediano	23	49
Grande	7	15
Sin quiste	5	11

Con una N de 47 animales, se encontró que en la mayoría de los casos el tamaño del quiste formado, después de la lesión por contusión severa de la médula espinal en ratas adultas, se encontraba entre los 2 y 4 mm (mediano) y que en un porcentaje bajo de los casos no se forma un quiste después de la lesión.

Tabla 4. Fibrosis intramedular.

Fibrosis	Número de casos	Porcentaje
Escasa	8	17
Moderada	31	66
Abundante	8	17

Con una N de 47 animales, se encontró que en la mayoría de los casos, se formó una fibrosis moderada después de la lesión por contusión severa de la médula espinal en ratas adultas.

Mortalidad.

Para la realización del presente estudio se operó un total de 116 ratas, sin embargo, 10 ratas (9%) fueron eliminadas del proyecto por fallas en la técnica de contusión y 23 murieron antes de llegar al término del estudio, es decir, que se observó una mortalidad global del 20%. Entre las principales causas de muerte destacan la neumonía, la infección de vías urinarias y la autofagia, mientras que en un pequeño porcentaje de los casos no se pudo determinar la causa del fallecimiento. Las muertes observadas en el

posoperatorio inmediato se debieron a sangrado intenso durante el transquirúrgico (Tabla 5).

Tabla 5. Causas de mortalidad.

Causa de la muerte	Número de ratas	Porcentaje
Muerte en el posoperatorio inmediato	2	9
Neumonía	6	26
Infección de vías urinarias	5	22
Autofagia	4	17
Sepsis	2	9
Tumor abdominal	1	4
Se ignora	3	13

Con una N de 23 animales se observó que entre las principales causas de mortalidad destacan la neumonía y la infección de vías urinarias.

Evaluación morfológica general.

Por la severidad de la contusión, en muchos casos la ME tendió a aplanarse o a contraerse en el epicentro de la lesión, en donde el tejido medular fue reemplazado por tejido glial cicatrizal o por un área de cavitación más o menos extensa. En la periferia y rodeando a la cavidad quística se localizó un anillo irregular de parénquima medular preservado, que en todos los casos sólo consistió de sustancia blanca. El área de mayor destrucción del parénquima medular, generalmente se localizó en los cordones posteriores, los cordones laterales y la porción central de la ME.

Axones y colaterales axónicas en el epicentro de la lesión.

Se evaluó el cuadrante dorsal derecho, el cual incluyó las columnas dorsales y algunos tractos dorsolaterales en 7 ratas normales, y se observó que dicho cuadrante contiene $128\,532 \pm 3\,409$ (media \pm error estándar) axones.

Desde las 21 hrs hasta los 4 meses de seguimiento, se observaron diferencias estadísticas en el número de axones que sobreviven a la lesión al comparar el grupo control y el tratado con MP. Al término de los 4 meses de estudio, el número de axones sobrevivientes en los animales del grupo control mostraron diferencias estadísticas al compararlos con el grupo tratado con MP y con los grupos transplantados tanto con NP fresco como con NPP (Gráfica 2 y Tabla 6).

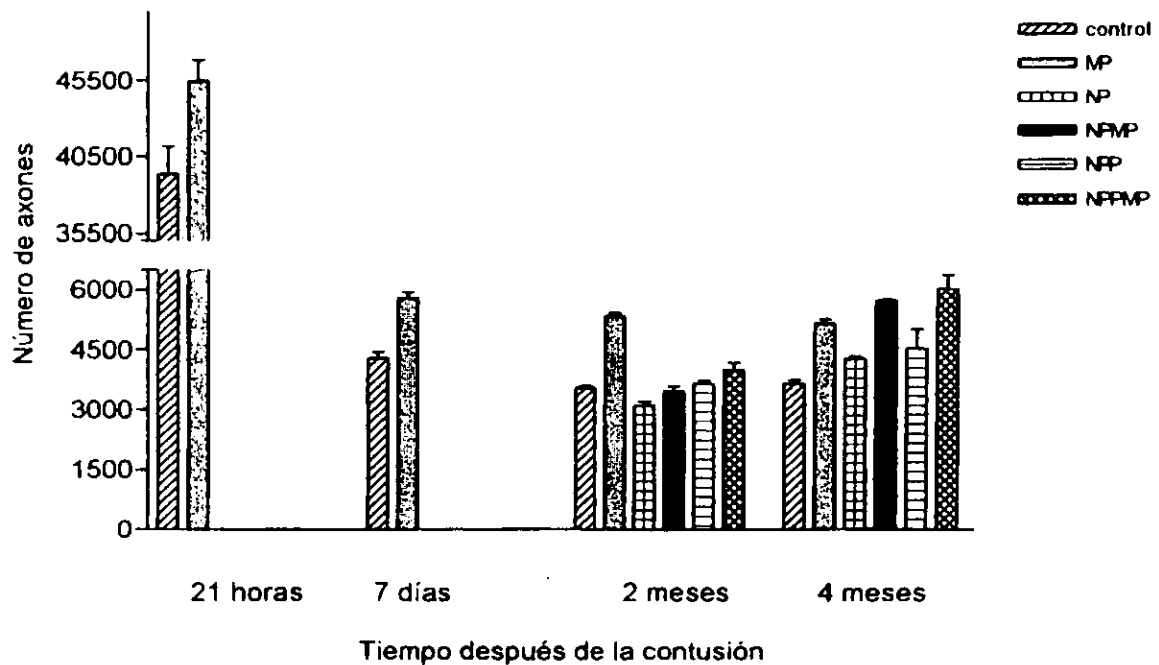
Tabla 6. Número total de axones y colaterales axónicas.

Tiempo transcurrido después de la contusión	Control	MP	NP	NPMP	NPP	NPPMP
21 hrs	39756 ± 1903	45800 ± 1325				
7 días	4376 ± 155	5864 ± 150				
2 meses	4312 ± 70	5876 ± 42	3740 ± 119	3882 ± 104	4247 ± 122	4351 ± 95
4 meses	4832 ± 91	5822 ± 127	6026 ± 90	6242 ± 42	6182 ± 83	6465 ± 111

MP = metilprednisolona, NP = nervio periférico, NPMP = nervio periférico y metilprednisolona, NPP = nervio periférico predegenerado, NPPMP = nervio periférico predegenerado y metilprednisolona. Número total de axones más número total de colaterales \pm error estándar.

Entre los grupos control y MP se encontraron diferencias estadísticas tanto a las 21 hrs ($p < 0.026$) como a los 7 días ($p < 0.0001$).

A los 4 meses se observó diferencia estadística entre el grupo control y los otros 5 grupos y entre el grupo de NPPMP con los de MP y NP ($p < 0.05$).



Gráfica 2. Se muestra que desde las 21 hrs. hasta los 4 meses posteriores a la contusión el número de axones en el grupo de animales tratados con MP fue mayor en relación con el grupo control, encontrándose diferencias con significancia estadística entre ambos grupos ($p < 0.02$ a las 21 hrs y $p < 0.0001$ a los 7 días, 2 y 4 meses). A los 4 meses se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo control y los de NP fresco ($p < 0.0006$), NPMP ($p < 0.0001$) y NPPMP ($p < 0.0001$). También se encontraron diferencias al comparar el grupo de NP con el de NPMP ($p < 0.0001$). Nótese que al término del estudio el grupo con la mayor población de axones fue el de NPPMP.

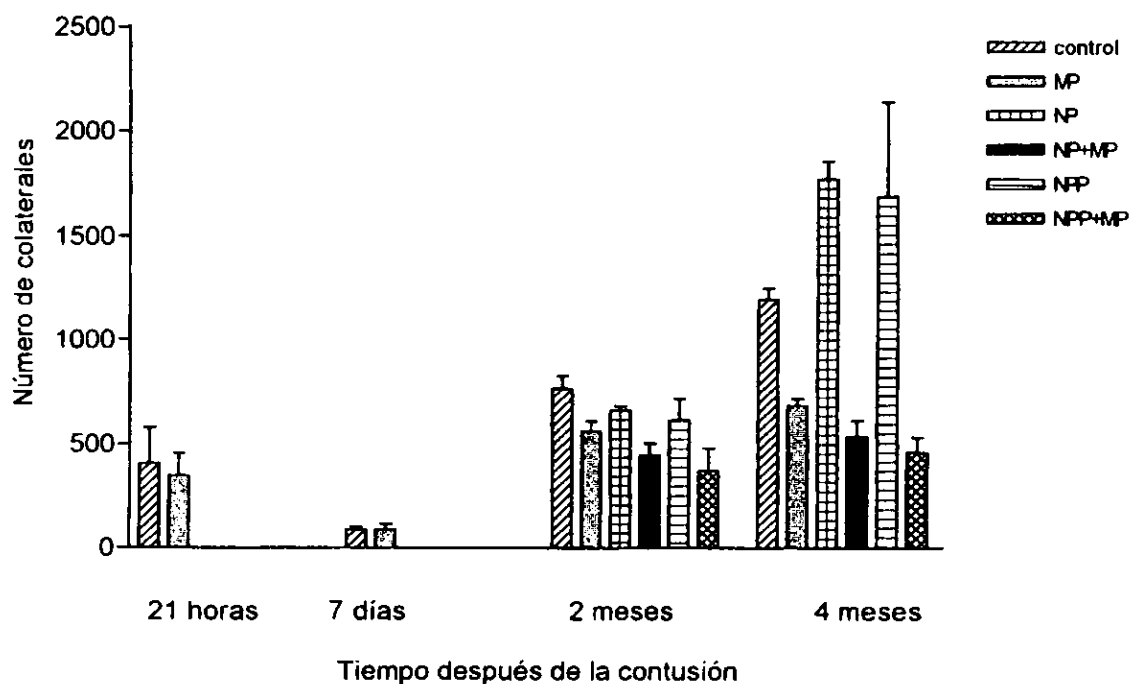
Por otro lado, el número de colaterales axónicas se incrementó de manera progresiva después de la lesión, tanto en el grupo control como en los grupos transplantados. No obstante lo anterior, el incremento fue mayor en los grupos que no recibieron tratamiento con MP (Gráfica 3). Dicho fenómeno fue más contrastante a los 4 meses, cuando el porcentaje más elevado de colaterales se presentó en el grupo de NP, seguido por el de NPP y después por el grupo control. En estos 3 grupos el número de colaterales axónicas fue mayor que en los grupos de MP, NPMP y NPPMP (Gráfica 4).

A las 21 hrs. después de la lesión se observó una pérdida axonal que representó el 69.1% de la población total en los animales del grupo control y del 64.4% en el grupo tratado con MP, es decir que la MP protege del daño a un 4.7% más de las fibras con respecto del control, No obstante lo anterior, a los 7 días la diferencia entre ambos grupos fue sólo del 1.1%. La pérdida axonal resultante de todo el proceso, incluyendo tanto a la lesión primaria como a la lesión secundaria que se generan después de la contusión de ME, fue del 96.3% en el grupo control y del 95.5% en el tratado con MP (Tabla 7).

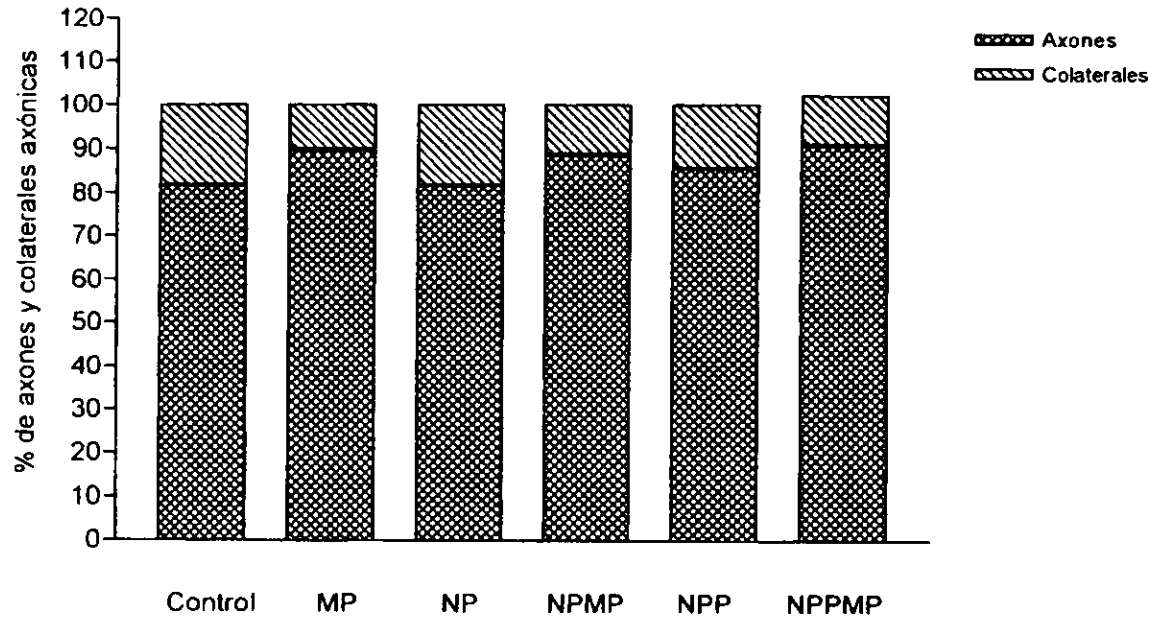
Tabla 7. Porcentaje de axones que sobreviven después de la lesión.

Tiempo transcurrido después de la contusión	Control	MP	NP	NPMP	NPP	NPPMP
21 hrs	30.9	35.6				
7 días	3.4	4.5				
2 meses	3.3	4.5	2.9	3.0	3.3	3.3
4 meses	3.7	4.5	4.6	4.8	4.8	5

MP = metilprednisolona, NP = nervio periférico, NPMP = nervio periférico y metilprednisolona, NPP = nervio periférico predegenerado, NPPMP = nervio periférico predegenerado y metilprednisolona. Los datos se encuentran expresados en porcentaje, tomando como 100% las 128 532 fibras cuantificadas en las ratas sin lesión, entre las que se incluyen tanto a los axones como a las colaterales axónicas.



Gráfica 3. Se muestra que 2 meses después de la lesión el incremento en el número de colaterales axónicas fue más marcado en los grupos con trasplante de NP y de NPP, seguidos por el grupo control. Se demostraron diferencias estadísticas al comparar el control con los de MP ($p < 0.02$) y NPPMP ($p < 0.0079$). También se encontraron diferencias al comparar el grupo de NP contra el de NPMP ($p < 0.004$), éstas diferencias se incrementaron en forma importante, entre los mismos grupos, a los 4 meses ($p < 0.0001$, $p < 0.0002$ y $p < 0.0001$), lo cual refleja el efecto inhibitorio de la MP sobre la emisión de colaterales axónicas.



Gráfica 4. Se presenta el porcentaje de axones y el de colaterales axónicas para cada grupo de estudio, a los 4 meses después de la contusión de ME. Nótese que en los grupos, en los que no se administró MP, incluyendo el grupo control, el porcentaje de colaterales axónicas fue mayor al compararlos con los grupos de MP, NPMP y NPPMP. En estos últimos 3 grupos, el porcentaje de axones fue superior al observado en los grupos a los que no se les administró la MP.

Fibras mielínicas y amielínicas.

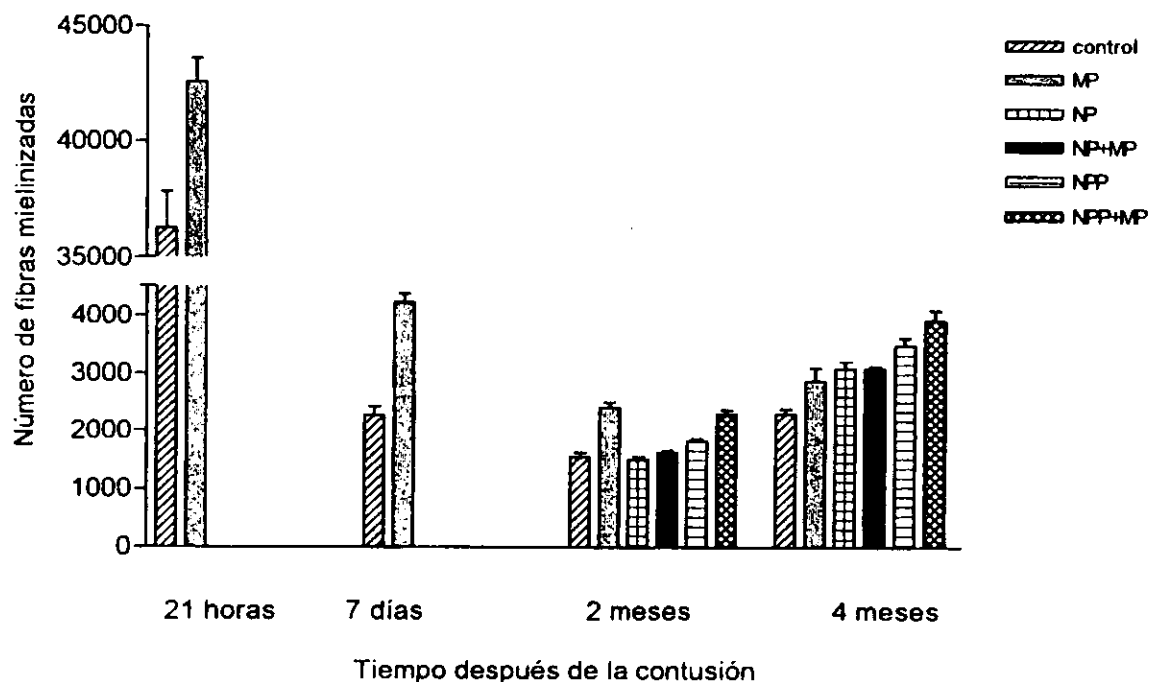
En cuanto al número de fibras mielinizadas, cuantificadas en la sustancia blanca de la ME en cada uno de los animales estudiados, se observó que la MP protege a estas fibras del daño producido por la contusión (Gráfica 5), ya que se obtiene significancia estadística al comparar el grupo control con el de MP en los 4 tiempos de corte utilizados en el presente estudio.

Al comparar el grupo control con los grupos de transplante, a los 4 meses, se encontraron diferencias con significancia estadística, debido a que los grupos con implante tanto de NP fresco como de NPP, presentaron un mayor número de fibras mielinizadas. El fenómeno anterior fue más significativo en el grupo de NPPMP que en los demás, incluso al compararlo con el de NPMP.

Índice de mielinización.

En la ME de la especie motivo de estudio en el presente trabajo, el IDM en animales sanos es de 0.72 ± 0.07 , dato que se consideró como parámetro de normalidad y estándar de comparación (Salgado-Ceballos et al., 1998). En la ME de estos animales las vainas de mielina no suelen ser gruesas (8 a 9 láminas) ni muy compactas y tanto el axón como su vainas se encuentran rodeados por procesos astrocíticos, característicos del SNC (Fig. 8).

Tanto a las 21 hrs., como a los 7 días, el IDM en los animales del grupo tratado con MP se encontraba cerca de los parámetros de normalidad, lo cual contrastó con lo observado en el grupo control, en el cual el IDM se alteró en forma más marcada, observándose diferencias estadísticas entre ambos grupos en todos los tiempos de corte (Tabla 8).



Gráfica 5. Se observa el número de fibras mielinizadas en cada uno de los grupos estudiados. Nótese que el número de fibras mielinizadas fue mayor en el grupo tratado con MP en comparación con el control, observándose diferencias estadísticas a las 21 hrs ($p < 0.006$), a los 7 días y 2 meses ($p < 0.0001$) y a los 4 meses ($p < 0.002$). De manera similar, a los 4 meses todos los grupos experimentales mostraron diferencias estadísticas en el número de fibras mielinizadas al compararlos con el control ($p < 0.002$). Más aún, se observaron diferencias estadísticas entre el grupo de NPMP y el de NPPMP ($p < 0.0096$).

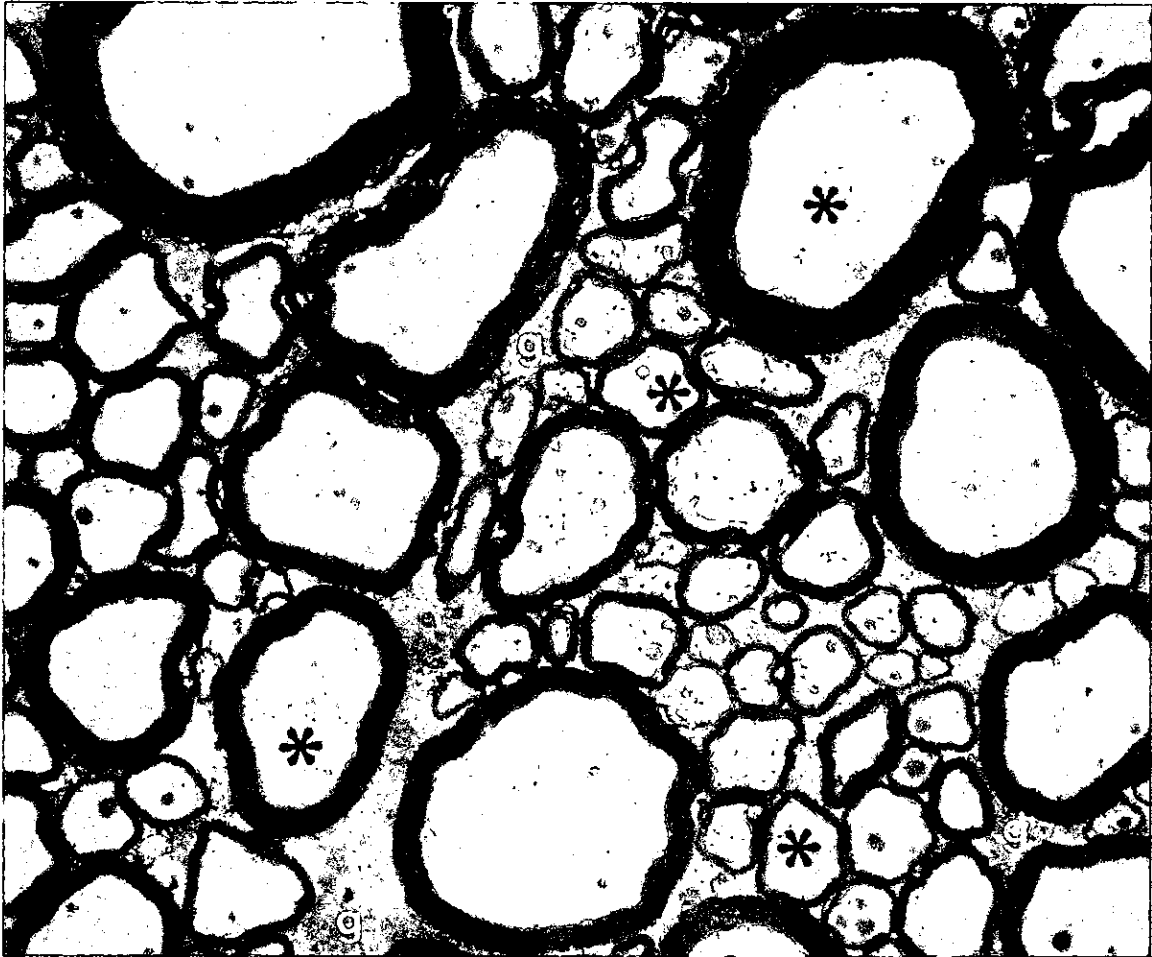


Figura 8. Corte transversal de la médula espinal, a nivel de toracico 9 en una rata sin lesión, en la cual se identifican numerosos axones de diferente calibre, con sus respectivas vainas de mielina (asterisco) y entre los cuales se pueden identificar algunos procesos gliales (g). Microscopia electrónica de transmisión, 6300X.

Tabla 8. Índice de mielinización.

Tiempo transcurrido después de la contusión	Control	MP	NP	NPMP	NPP	NPPMP
21 hrs	0.81 ± 0.02	0.76 ± 0.02				
7 días	0.84 ± 0.03	0.79 ± 0.03				
2 meses	0.91 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.88 ± 0.01	0.90 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.88 ± 0.03
4 meses	0.88 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.80 ± 0.03

MP = metilprednisolona, NP = nervio periférico, NPMP = nervio periférico y metilprednisolona, NPP = nervio periférico predegenerado, NPPMP = nervio periférico predegenerado y metilprednisolona. Los resultados se expresan como Índice de mielinización (IDM) ± desviación estándar. Se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo control y el de MP a las 21 hrs ($p < 0.00216$), a los 7 días ($p < 0.03$) y a los 2 y 4 meses ($p < 0.05$). A los 4 meses también se obtuvo diferencia estadística entre el grupo control y el de NPPMP, y entre éste último y el de NP ($p < 0.05$).

A los 2 meses se observó la máxima desmielinización en los grupos de estudio, mientras que a los 4 meses, la tendencia fue hacia la recuperación, incluso en el grupo control, pero de forma más marcada en el grupo de NPPMP, encontrándose diferencias con significancia estadística al comparar el grupo control con el de MP y con el de NPPMP al final del seguimiento.

Desmielinización y Remielinización.

Con el modelo de lesión empleado en el presente estudio, 21 hrs. posteriores a la contusión fue posible identificar el daño generado en forma secundaria a las vainas de mielina en el epicentro de la lesión. Sin embargo, el proceso de desmielinización fue más evidente a los 7 días y se caracterizó por una vacuolización generalizada de la vaina y deshilachamiento de la misma hasta que se desprendió completamente del axón

(Fig. 9). Una vez desprendida la mielina, ésta se enrolló sobre sí misma hasta formar un cuerpo mielínico, el cual se depositó en el espacio extracelular, para posteriormente ser

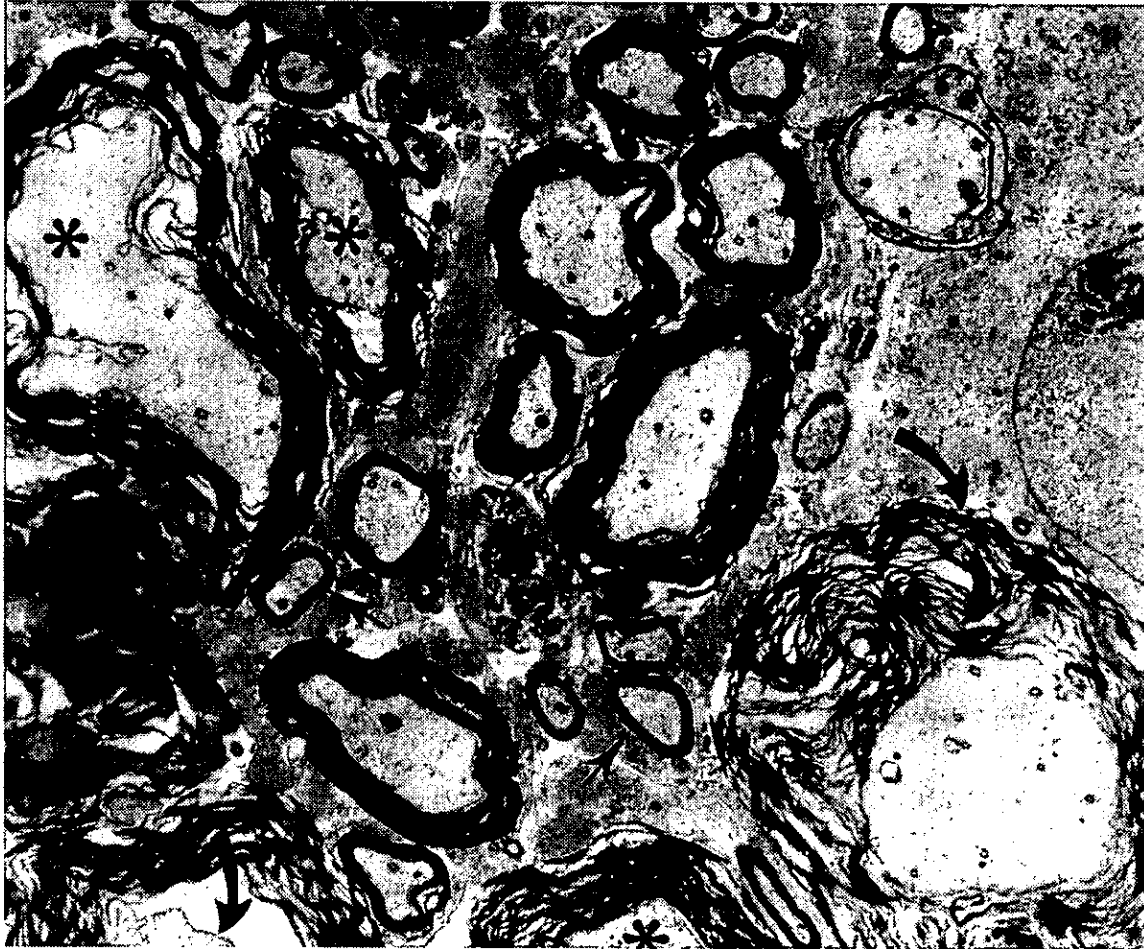


Figura 9. Corte transversal del epicentro de la lesión, en la médula espinal, 7 días después de la contusión, en donde se observa la separación de las láminas de mielina en algunos axones (asterisco), el desprendimiento de la vaina (flechas curvas) y un cuerpo mielínico formado por restos de mielina totalmente desprendida de su axón (estrella), inmersos en el microambiente glial, característico del sistema nervioso central. También se identifican algunos axones, principalmente pequeños, que parecen no haber sido afectados por la lesión (flechas). Microscopía electrónica de transmisión 3150X.

identificado y fagocitado por los macrófagos (Fig. 10). Como resultado de todo este proceso se observaron numerosos axones de diferente diámetro desprovistos de sus vainas (Fig. 11), los cuales en algunas ocasiones se encontraban rodeados por procesos citoplásmicos de CS y en otras por procesos astrocíticos.

Aún cuando los oligodendrocitos (OD) son las células responsables de la mielinización en el SNC, después de una lesión su capacidad de remielinización es muy limitada, de tal forma que en el presente estudio, en el 78% de las veces se observaron vainas de mielina cuyas características corresponden a las formadas por las CS provenientes del SNP, sólo en el 7% de los casos las vainas parecieron ser generadas por los OD (Fig. 12) y en el 15% se llegó a observar una remielinización aparentemente mixta. Por otra parte, en los grupos con implante tanto de NP fresco como de NPP, la remielinización estuvo, casi por completo, a cargo de las CS.

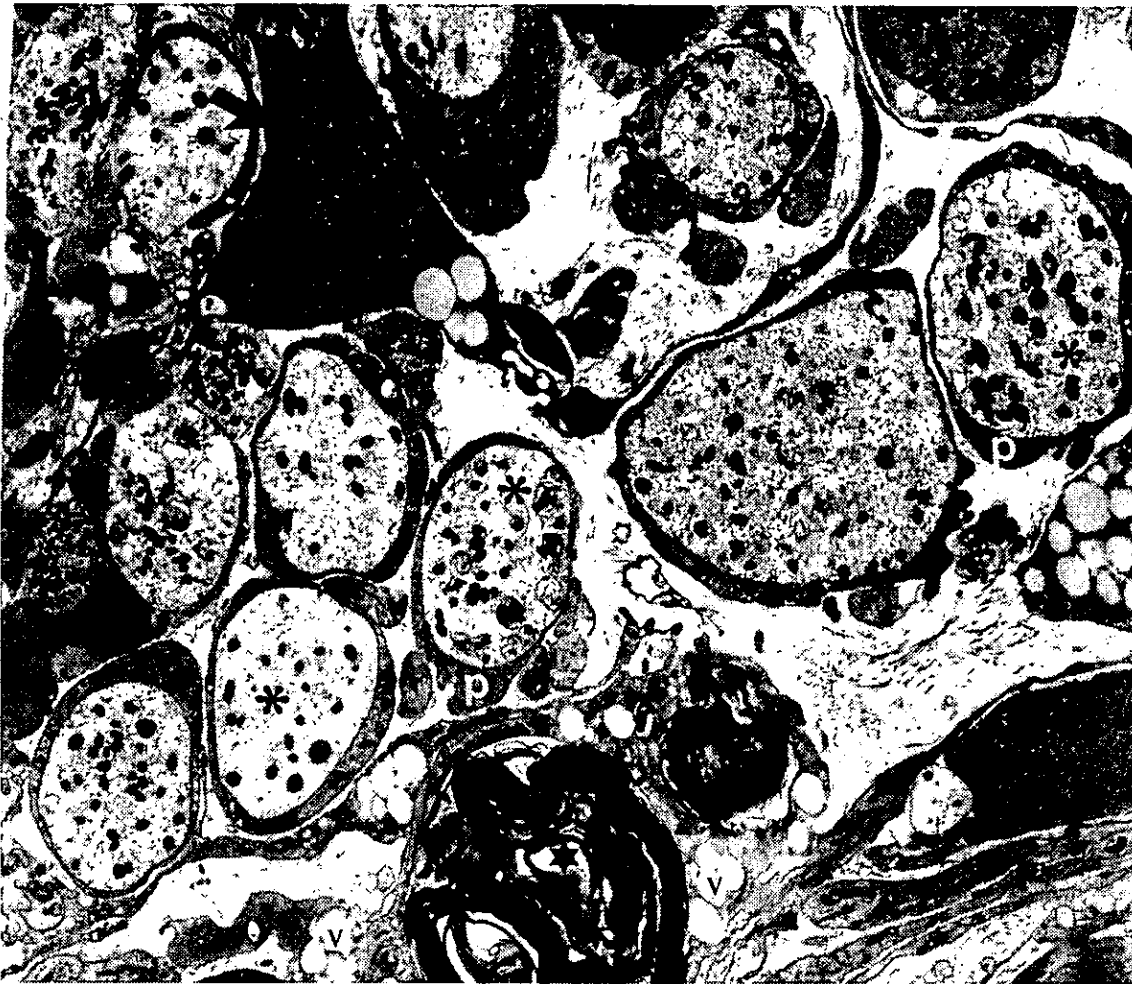
El tipo celular responsable de la remielinización se determinó en base a que las vainas formadas por las CS son más gruesas (11 a 12 láminas) y compactas que las formadas por los OD (8 a 9 láminas), las fibras mielinizadas por CS presentan un delgado anillo de citoplasma alrededor del perímetro del axón envainado, además del núcleo y el citoplasma de la célula en la vaina que rodea al axón y las fibras mielinizadas por las CS en el SNC por lo regular están rodeadas por un claro espacio extracelular, mientras que las mielinizadas por OD generalmente se encuentran embebidas en un campo más o menos denso de astrocitos.

Aún cuando el IDM resultante de los procesos de remielinización espontánea generado por CS en el grupo control, tendió a acercarse a los parámetros de normalidad, esto no fue suficiente para lograr una remielinización completa (Fig. 13). En contraste, la remielinización en el grupo con trasplante de NP fresco superó a la generada en forma espontánea (Fig. 14), lo que a su vez fue superado por la observada en el grupo de trasplante con NPP (Fig. 15). No obstante lo anterior, hasta los 4 meses que duró el estudio, no habían sido remielinizadas todas las fibras en ninguno de los grupos.



Figura 10. Corte transversal del epicentro de la lesión, 2 meses después de la contusión, en una rata del grupo control, en la que se observan axones amielínicos agrupados en número variable (flechas largas) y axones con vainas de mielina gruesas y compactas (asterisco) formadas por células de Schwann (estrella). En el centro de la imagen se observa un macrófago (M) fagocitando restos de mielina (m) y con abundantes restos tisulares en su interior. En la parte superior de la imagen, se identifica un vaso sanguíneo (V). Microscopía electrónica de transmisión, 6300X.

Figura 11. Corte transversal del epicentro de la lesión, 2 meses después de la contusión, en una rata del grupo control. Nótese la presencia de axones con integridad anatómica, pero desprovistos de sus respectivas vainas de mielina (asterisco), envueltos en procesos astrocíticos (p).



En la parte inferior de la imagen se observa un macrófago esponjoso con restos de mielina en su interior (estrella), y sus vesículas grasas (v) características. En las proximidades del mismo, se localiza un astrocito fibroso (A) con un anillo de cromatina condensada en la periferia de la envoltura nuclear, algunas partículas de glucógeno en sus procesos citoplásmicos, cisternas de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y paquetes de filamentos en su citoplasma. En la parte superior izquierda se identifica un oligodendrocito (flecha), con grumos de cromatina densa en su núcleo, cuerpos densos y cisternas de retículo endoplásmico rugoso en su citoplasma. Microscopía electrónica de transmisión, 6300X.

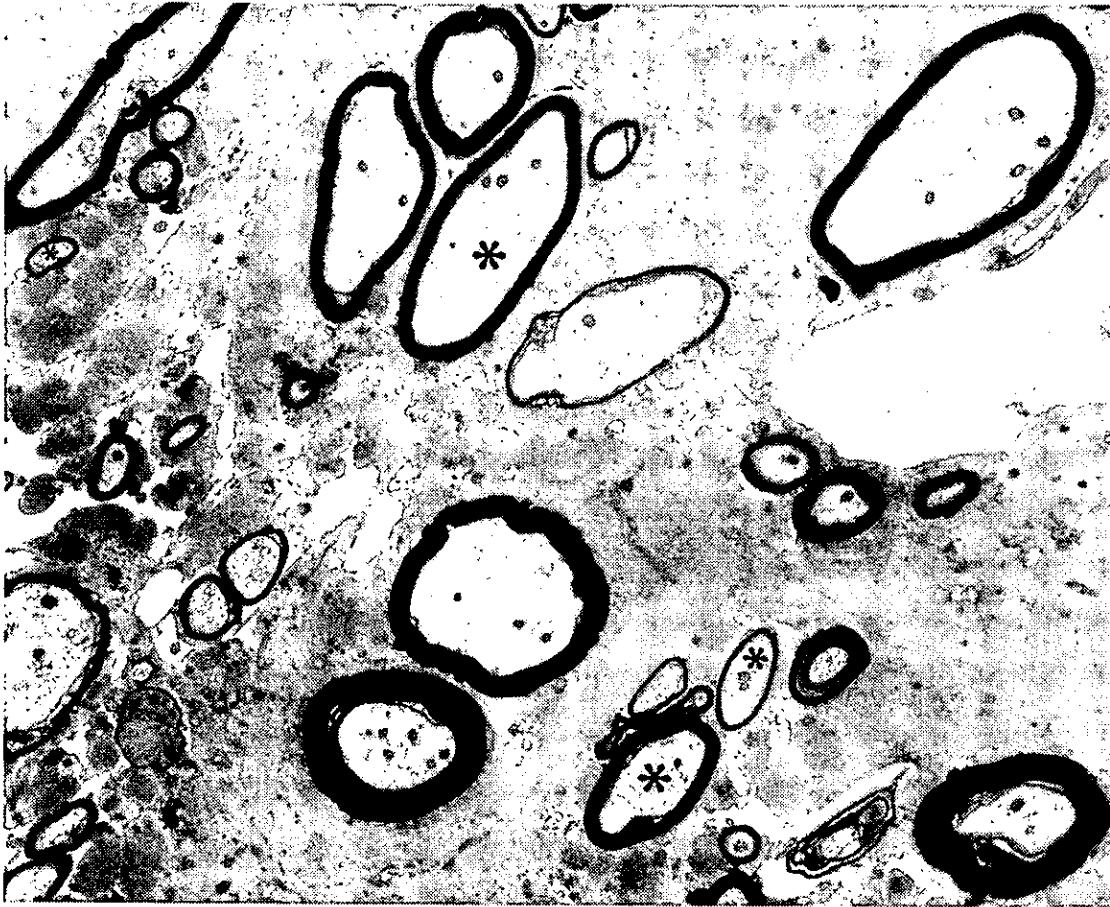
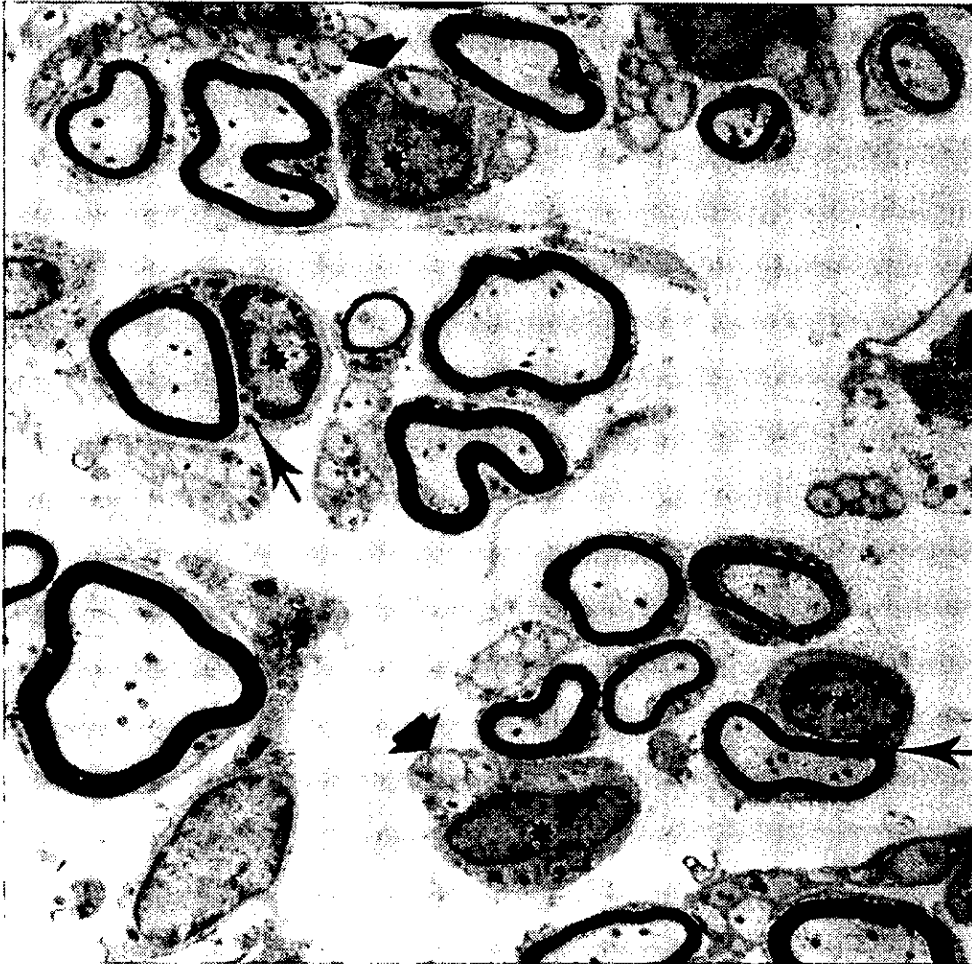


Figura 12. Corte transversal del epicentro de la lesión, 4 meses después de la contusión, en una rata del grupo control, en donde se observan axones de diferente tamaño y en distintos estadios de mielinización (asterisco). Por las características de las vainas de mielina, es probable que éstas hayan sido formadas principalmente por oligodendrocitos. Nótese el grosor de dichas vainas y el hecho de que el microambiente glial del sistema nervioso central formado por procesos de astrocitos (p), se encuentra preservado. Microscopia electrónica de transmisión, 6300X.



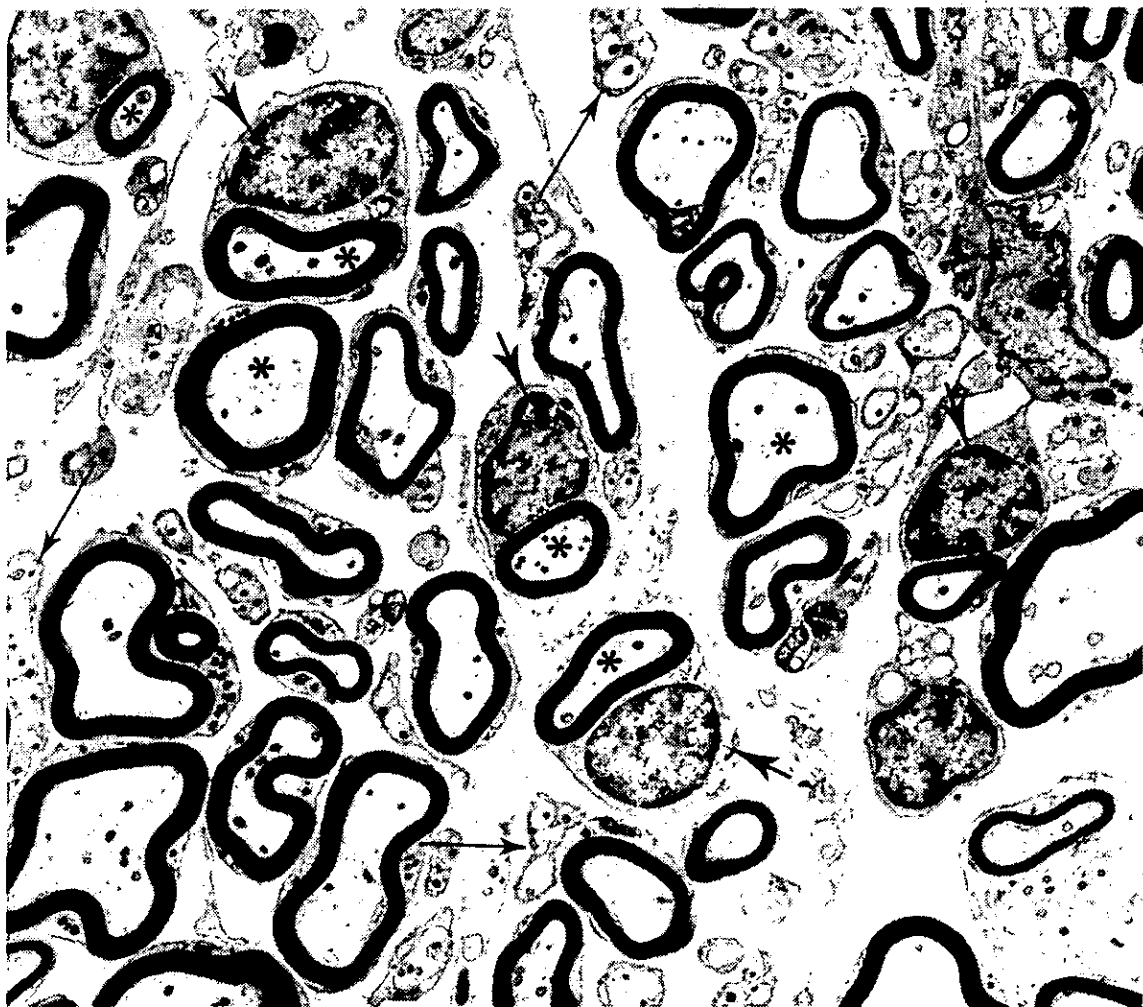
Figura 13. Corte transversal del epicentro de la lesión, 4 meses después de la contusión, en una rata del grupo control, en donde se puede apreciar la remielinización que en forma espontánea realizaron las células de Schwann (estrella). Nótese el grosor de las vainas de mielina y lo compacto de las mismas, así como la relación 1:1 que guardan las células de Schwann con el axón que mielinizan y la presencia de fibras de colágena en el espacio extracelular (flechas). Microscopia electrónica de transmisión 6300X.

Figura 14. Corte transversal de la médula espinal, en el sitio de lesión, 3 meses después del implante con nervio periférico fresco (NP), en el cual se observan varios axones mielinizados por células de Schwann y algunos otros envainados por ellas (estrellas).



Nótese que una célula de Schwann es capaz de envainar un número variable de axones, pero que cuando esto ocurre no forman vainas de mielina (cabeza de flecha), sino sólo cuando éstas guardan una relación 1:1 con el axón que mielinizan (flecha). Microscopía electrónica de transmisión, 3150X.

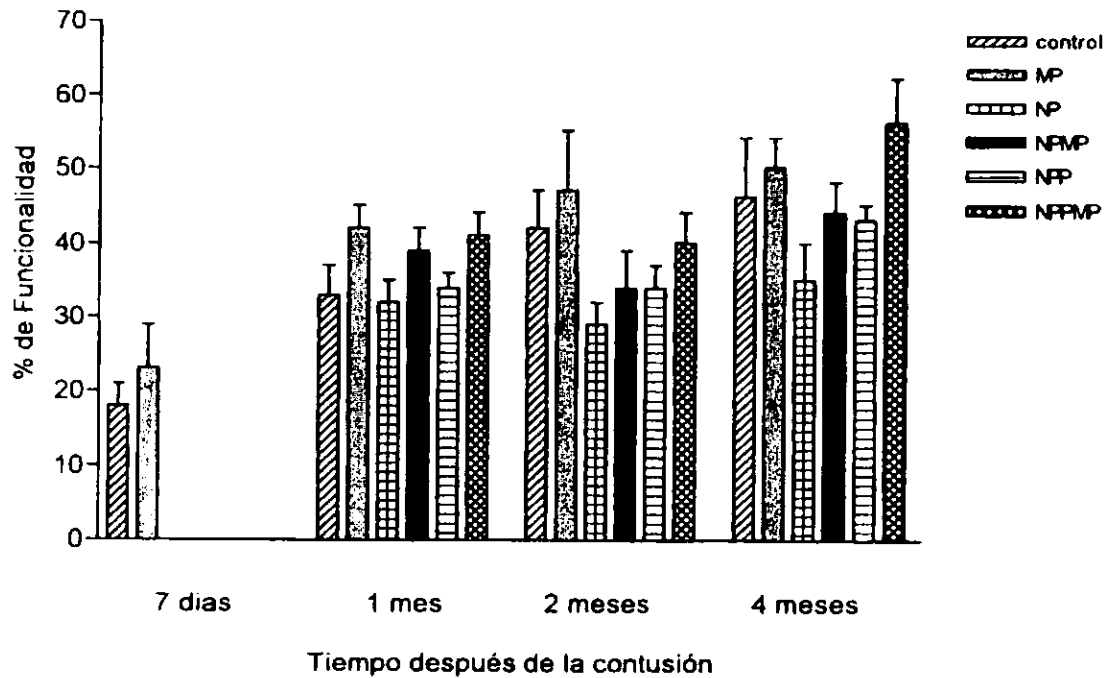
Figura 15. Corte transversal de la médula espinal, en el sitio de lesión, 3 meses después del implante con nervio periférico predegenerado (NPP), en el cual se observan numerosos axones mielinizados por células de Schwann (asterisco) pudiéndose identificar el núcleo de dichas células en varios casos (flechas cortas).



También se observan axones desprovistos de sus vainas de mielina agrupados en número variable (flechas largas) y el desplazamiento del microambiente glial característico del sistema nervioso central. Microscopía electrónica de transmisión 3150X.

Evaluación funcional.

Al término del estudio el mayor porcentaje de recuperación funcional alcanzado en forma espontánea por el grupo control fue del 46% en promedio, mientras que en el grupo con MP se alcanzó el 50% y en el de NPPMP de hasta el 56%, cifra que no permite demostrar *per se* diferencias estadísticas. La diferencia entre el grupo control y el de NPPMP fue de alrededor del 10% (Gráfica 6).



Gráfica 6. Se presenta el porcentaje de recuperación funcional en los diferentes grupos estudiados, donde la función normal corresponde al 100%. La evaluación un mes después de la lesión se realizó antes del trasplante en los grupos correspondientes. Entre los 2 y 4 meses posteriores a la lesión se observa una tendencia progresiva a la recuperación. No obstante lo anterior, no se encontró diferencia con significancia estadística en ningún grupo. La mayor diferencia en el porcentaje de recuperación funcional se obtuvo a los 4 meses después de la contusión, entre los animales del grupo control y los de NPPMP, la cual representó alrededor del 10%.

DISCUSIÓN.

Cuantificación de macrófagos, células de Schwann y fibroblastos después de lesión del nervio ciático.

Nuestros resultados indican que al seccionar en su totalidad la rama peroneal del nervio ciático de ratas Long-Evans, hembras, adultas, la mayor población de macrófagos se alcanza a los 7 días, de las CS a los 30 días y de los fibroblastos a los 60 días después de la lesión. Esto concuerda parcialmente con lo referido en la literatura (Miyamoto et al., 1986; Salonen et al., 1988), pero difiere con otros trabajos debido a que se utilizaron tiempos de estudio tan cortos que no permiten identificar el máximo incremento en las poblaciones de CS y fibroblastos (Clemence et al., 1989; Komiyama y Suzuky, 1992). En forma contraria, otros autores utilizaron tiempos de corte muy largos, e iniciaron la evaluación después de un mes de lesión (Miyamoto et al., 1986), lo cual no les permitió identificar el máximo incremento en la población de macrófagos que se observa en etapas tempranas. En otros trabajos se estudiaron distintas regiones del nervio o no se especificó el sitio de lesión (Clemence et al., 1989; Siironen et al., 1994), se utilizaron diferentes marcadores celulares o se hicieron observaciones meramente morfológicas (Miyamoto et al., 1986), lo cual después de una lesión hace muy difícil la identificación de los diferentes tipos celulares por las modificaciones estructurales que sufren. Otra posible explicación de las diferencias con otros trabajos se basa en el empleo de distintas cepas de rata o ratón (Avelino et al., 1995; Clemence et al., 1989; Komiyama y Siironen et al., 1992; Suzuky, 1992), o en la utilización de animales de diferentes edades (Komiyama y Suzuky, 1992). Lo anterior es relevante, ya que se ha demostrado que en los animales jóvenes la capacidad proliferativa de los fibroblastos es mayor que en los adultos, y en éstos últimos la capacidad proliferativa de la CS es mayor que en los jóvenes. Por otro lado, en pocas ocasiones se han estudiado los 3 tipos celulares en forma simultánea, como en el presente trabajo (Miyamoto et al., 1986; Salonen et al., 1988).

La importancia de conocer el momento preciso en el que cada tipo celular alcanza su máxima población radica en la función que cada célula realiza durante los procesos de

degeneración-regeneración en el sistema nervioso dañado. Los macrófagos eliminan los restos tisulares que pueden bloquear el recrecimiento axonal y producen proteínas asociadas con la regeneración, factores de crecimiento neural y factores mitogénicos para CS (Boyles et al., 1989; Friede y Beuche, 1993; Goodrum y Novicki, 1988; Pery y Brown, 1992). Por otra parte, las CS producen neurotrofinas, moléculas estimulantes del desarrollo y de la supervivencia neuronal como el NGF, el CNTF, el BDNF, moléculas de adhesión, integrinas y moléculas de la matriz extracelular. Además, las CS pueden fagocitar restos de mielina dañada y mielinizar un gran número de axones o prolongaciones de éstos (Acheson et al., 1991; Bandtlow et al., 1987; Baron-Van et al., 1982; Beuche y Friede, 1984; Danilooff et al., 1986; Lander, 1989; Martini y Schachner, 1988; Mirsky y Jenssen, 1990; Schachner, 1990; Taniuchi et al., 1986).

Por lo anterior, se deben seguir realizando estudios para identificar los factores como la edad adecuada de los animales, el sitio de sección del nervio y el tiempo preciso de predegeneración que requiere un NP para obtener las condiciones que le permitan funcionar de manera óptima para ser usado como trasplante.

Administración de metilprednisolona e Implante de nervio periférico predegenerado.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de la MP para proteger de la lesión a las vainas de mielina en un modelo de contusión severa de la ME y la capacidad del implante de NPP para remielinizar los axones que a pesar de la MP se desmielinizaron después de la lesión, para lo cual se evaluó tanto el número de fibras mielinizadas como el IDM. En forma paralela se determinó el número de axones y de colaterales axónicas en el epicentro de la lesión y el grado de funcionalidad de los miembros posteriores de los animales estudiados. Además de analizar las características del hematoma, la cavidad quística y el grado de fibrosis producidos después de la contusión. Los resultados se discuten a continuación:

A. Contusión de la médula espinal.

Después de efectuar la lesión por contusión severa de la ME según se describió en la sección de material y métodos, observamos que el tipo de hematoma que con más frecuencia se produjo fue el central, medial, mediano, con el cual se generó parálisis de ambas extremidades posteriores en el 91% de las ratas operadas, es decir que sólo se eliminó al 9% de los animales debido a fallas en la técnica de contusión (hematomas completamente lateralizados, doble golpe por rebote del impactador sobre la ME y ruptura de la duramadre, entre los principales).

Casi el 50% de los quistes intramedulares formados a consecuencia de la lesión midieron entre 2 y 4 mm (quiste mediano) y la fibrosis acompañante fue moderada. Sin embargo, no fue posible establecer ninguna correlación entre las características del hematoma y el tamaño de la cavidad quística o el grado de fibrosis, e incluso tampoco con el porcentaje de disfunción ocasionada. Lo anterior puede deberse tanto a la variabilidad biológica en la respuesta individual al trauma como a la capacidad particular del SNC para reaccionar ante una lesión de esta magnitud.

B. Mortalidad.

La mortalidad global observada en los 116 animales empleados en el presente estudio, fue del 20% (23 ratas), la cual puede considerarse como baja y contrasta con el alto índice de morbi-mortalidad reportado por otros autores para este tipo de patologías (Das et al., 1989). En nuestro caso, sólo 2 ratas murieron a consecuencia directa del procedimiento quirúrgico, debido a sangrado profuso durante la apertura de la cavidad quística y la eliminación de la fibrosis, previo a la colocación del implante. En 17 ratas la causa de muerte resultó de complicaciones inherentes al mismo proceso patológico (neumonía, infección de vías urinarias, autofagia y sepsis).

C) Efecto de la metilprednisolona.

Estudios *in vitro* señalan que la MP administrada a dosis de 30 µg/ml es capaz de proteger del trauma físico a las neuronas de la ME cultivadas y sometidas a una amputación de las dendritas (Rosenberg-Schaffer y Lucas, 1993) y trabajos realizados

en modelos animales con compresión de la ME, demuestran que este fármaco disminuye la degeneración axonal en los animales tratados (Iizuka et al., 1986). Lo anterior concuerda con lo observado en el presente estudio, ya que después de la lesión por contusión severa de la ME, encontramos que la MP evita, aunque en forma parcial, la destrucción de los axones, observándose diferencias significativas al comparar el grupo control con el grupo tratado.

En términos generales, en nuestro modelo experimental, se observó una pérdida axonal promedio de 96.7% en el grupo control y de 94.5% en el grupo al que se le administró MP, mientras que otros autores refieren pérdidas que oscilan entre el 87 y 99% de las fibras mielinizadas, a consecuencia de una LTME que se deja evolucionar en forma espontánea (Blight y Young, 1989). La variación en estos porcentajes puede estar dada por diferencias en la intensidad de la lesión o por el modelo animal empleado, ya que en el primer caso se utilizaron ratas y en el segundo fueron gatos.

A pesar de que el porcentaje de axones siempre fue mayor en los grupos a los que se les administró MP, en los grupos en los que no se administró el fármaco, incluyendo el grupo control, el porcentaje de colaterales axónicas fue mayor al compararlos con los grupos tratados, especialmente a los 4 meses después de la lesión.

Es decir, que la MP tiene un efecto protector sobre los axones, pero inhibe la emisión de colaterales axónicas. Este fenómeno se encuentra referido en un trabajo de tesis doctoral (Guizar-Sahagún, 1996), en el que se observó mediante técnicas histológicas para microscopía de luz, que la MP inhibe la formación de colaterales axónicas aberrantes en el epicentro de la lesión. En ese trabajo no se pudo explicar el mecanismo por el cual la MP bloquea la formación de colaterales. Debido a la metodología empleada en esta tesis, nosotros tampoco podemos explicarlo. Sin embargo, y aún cuando para los glucocorticoides se encuentran bien documentados ciertos mecanismos que parcialmente podrían explicar lo anterior, como el bloqueo en la producción de diferentes factores tróficos (Marx, 1995), debemos recordar que al emplear megadosis de MP sus efectos no se ejercen a nivel de los receptores esteroideos.

La importancia de las colaterales axónicas radica en que en muchas regiones del SNC las neuronas desnervadas pueden ser reinervadas por colaterales emitidas por neuronas no dañadas (Goldberg y Murray, 1982; Polistina et al., 1990). Mas aún, en ausencia de regeneración de las vías seccionadas, se ha sugerido que la reinervación por colaterales procedentes de las raíces dorsales está involucrada en la recuperación motora en animales con hemisección de la ME a nivel torácico bajo (Goldberg y Murray, 1982). Sin embargo, no hay que olvidar que las colaterales axónicas así formadas, pueden generar circuitos neuronales anormales que lejos de ser favorables para la recuperación funcional, la distorsionen, por lo que se deben realizar más estudios al respecto.

En cuanto al número de fibras mielinizadas, éste fue mayor en el grupo tratado con MP, observándose diferencias estadísticas con respecto al control, en todos los tiempos estudiados. Es decir, que la MP sí es capaz de proteger a las vainas de mielina después de una contusión severa de la ME.

Por otra parte, al evaluar el IDM, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con MP, demostrándose el efecto neuroprotector del fármaco sobre las vainas de mielina tanto a las 21 hrs como a los 7 días. No obstante lo anterior, 2 meses después de la lesión, el IDM en ambos grupos se alejó en forma importante de los parámetros de normalidad, lo cual fue más notorio en el grupo control. A los 4 meses, también en ambos grupos, se observó una tendencia hacia la recuperación del IDM, posiblemente dado por el proceso de remielinización. Al término del estudio, el IDM en el grupo que recibió el tratamiento farmacológico se aproximó más al 0.72 observado en los animales sanos.

Los efectos de la MP después de una lesión por contusión severa de la ME, que aquí se documentan, pueden deberse a la capacidad de la MP para inhibir la LP, ya que en otros estudios se ha demostrado que la inhibición de la LP con este fármaco se asocia tanto con la preservación del tejido como con la recuperación funcional de los animales

sometidos a una LTME (Hall, 1992), debido a que la preservación del sustrato anatómico se relaciona en forma directa con la recuperación neurológica. No obstante lo anterior, nuestros resultados indican que la neuroprotección que ejerció la MP fue parcial, lo cual puede explicarse en función de que el fármaco no es capaz de inhibir todos los mecanismos secundarios de lesión observados en la fisiopatología de una LTME.

Esta neuroprotección parcial a cargo de la MP, concuerda con algunos resultados referidos en trabajos previos, tanto en modelos experimentales de LTME (Constantini y Young, 1994; Hall y Braugher, 1981), como en pacientes con traumatismo raquímedular (Bracken, 1990 y 1992; Braugher et al., 1987).

D) Comparación del efecto del trasplante de nervio periférico fresco contra el predegenerado.

En un estudio previo, se observó que el NPP es capaz de incrementar el número de axones mielinizados 3 meses después del implante y mejorar de manera significativa, tanto la sobrevivencia de las células ganglionares de la retina, como la regeneración axonal, cuando se coloca justo después de seccionar el nervio óptico en mamíferos adultos (Bähr et al., 1992). Sin embargo, para otros autores, estos resultados son controversiales, ya que no han encontrado diferencias entre el implante de NP fresco y el de NPP, o sólo se ha podido demostrar que el NPP tiene efectos benéficos *in vitro* pero no *in vivo* (Hasan et al., 1996). Ello concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que a pesar de las diferencias observadas a favor del implante de NPP en cuanto a los parámetros evaluados, cuando se compararon con los obtenidos en el grupo trasplantado con NP fresco, no se encontraron diferencias con significancia estadística.

No obstante lo anterior, al comparar el grupo control con los grupos trasplantados tanto con NP fresco como con NPP, 4 meses después de la contusión, se encontraron diferencias con significancia estadísticas en el número total de axones y el número de fibras mielinizadas, pero no en cuanto al número de colaterales axónicas, ni a los

valores del IDM. Sin embargo, mientras el incremento en el número de colaterales axónicas fue más marcado en el grupo trasplantado con NP fresco, el mejor IDM se observó en el grupo trasplantado con NPP.

El hecho de que en los grupos trasplantados el número de axones fue mayor que en el control, puede deberse a la capacidad del implante para funcionar como guía y soporte trófico para el crecimiento y conectividad axonal (Aguayo, 1990; Bjourklund et al., 1987) y por el microambiente favorable que sus constituyentes aportan para tal proceso (Baron Van-Evercooren et al., 1982; Bogdan et al., 1992; Martini y Schachner, 1988), que según los resultados aquí obtenidos tal efecto se presenta de manera similar tanto al implantar NP fresco como NPP.

Al parecer, la tendencia del efecto producido tanto por el implante de NP fresco como de NPP era hacia la mejoría progresiva, no obstante lo anterior, como sólo se realizaron 2 cortes, uno al mes y otro a los 3 meses después del implante, no fue posible evidenciar la magnitud de este fenómeno. Aunado a lo anterior destaca el hecho de que la manipulación de la zona de lesión con el fin de preparar la cavidad quística para colocar el tejido de implante, produjo una nueva agresión en la ME, por lo que era de esperarse que al igual que en la lesión mecánica inicial, se desencadenara la cascada de efectos deletéreos característicos de la lesión secundaria (Grijalva, 1994), lo cual se tradujo en una destrucción adicional de axones. Este fenómeno puede llegar ser tan importante que en un trabajo previo se observó cierto deterioro funcional al término del seguimiento, con respecto a los valores de premanipulación o trasplante (Grijalva, 1997). No obstante lo anterior, nosotros sólo observamos un discreto deterioro funcional en el grupo trasplantado con NP fresco al comparar sus evaluaciones de un mes antes y de un mes después del implante.

Aún cuando los OD son las células responsables de la mielinización en el SNC, en el presente estudio, las vainas de mielina observadas en la ME de las ratas con remielinización espontánea, presentaron características compatibles con mielinización por CS en el 78% de los casos, por OD sólo en el 7% y por ambos tipos celulares en el

15% de las veces. Lo anterior contrasta con lo observado por Blight y Young (1989) quienes refieren que después de una contusión de ME en el 48% de los casos la remielinización estuvo a cargo de las CS, en el 36% de los OD y en el 16% por una combinación de CS y OD. Las diferencias proporcionales pueden estar dadas en función del tipo de lesión, ya que por la severidad de la contusión en nuestro modelo experimental, es probable que una gran parte de la barrera hematoencefálica se rompiera, permitiendo con ello una migración importante de CS procedentes de las raíces nerviosas, los nervios de la púa madre o los pequeños nervios de la *nerva vasorum* (Harrison, 1987).

Por otra parte, en los grupos con implante tanto de NP fresco como de NPP, la remielinización estuvo casi por completo a cargo de las CS. La diferencia con significancia estadística que se observó en el número de fibras remielinizadas y el IDM al comparar el grupo control con los grupos trasplantados indica, aunque en forma indirecta, la superioridad del implante para remielinizar un mayor número de fibras y acercar más el IDM a los parámetros de normalidad.

No obstante lo anterior y aún cuando las CS han demostrado ser capaces de generar remielinización funcional en el SNC, esto por sí sólo no significa que sean capaces de restaurar completamente la función axonal, o que éstas sean más efectivas que los OD para desempeñar dicha función, ya que la remielinización por CS implica que el medio ambiente normal de los axones, proporcionado por los astrocitos en el SNC, sea desplazado, lo cual puede afectar a largo plazo la función de estos axones, dado el papel de los astrocitos en el control del medio ambiente extracelular, por lo que se requieren más estudios dentro de este campo.

En cuanto al IDM, no se encontraron diferencias con significancia estadística entre los animales trasplantados con NP fresco y los trasplantados con NPP, pero sí se obtuvo significancia estadística al comparar estos grupos con el control. En los grupos con implante las CS fueron prácticamente las células responsables de la mielinización observándose que las vainas generadas por los OD, en la mayoría de los casos, fueron

mucho más delgadas que las de los axones del mismo diámetro, pero mielinizados por CS. Más aún, se ha observado que las vainas formadas por los OD después de una lesión son especialmente delgadas al compararlas con las de las fibras del tejido sin lesión, mientras que las formadas por las CS no presentan una diferencia significativa al compararlas con las vainas normales (Dusart et al., 1992), lo cual repercute directamente sobre el IDM.

E) Tratamiento combinado con MP e implante de NP fresco o NPP.

A pesar de los múltiples efectos benéficos que la MP tiene sobre las estructuras nerviosas después de una LTME (Demopoulos et al., 1982; Hall, 1991; Hall et al., 1984; Rosenberg-Schaffer y Lucas, 1993; Saunders et al., 1987; Young y Flam, 1982), existen limitaciones en cuanto a su efecto neuroprotector, pues este fármaco no puede controlar todos los mecanismos de lesión secundaria presentes en esta patología (Hall et al., 1995) y de acuerdo a nuestros resultados, la MP es capaz de inhibir la emisión de colaterales emitidas por neuronas no dañadas. Por su parte, los implantes de NP tampoco han sido capaces de regenerar el tejido dañado en forma significativa después de una LTME (Ard et al., 1987; Bixby et al., 1988; Richardson et al., 1980; Sceats; 1986).

En el presente estudio se exploró la existencia de un posible efecto sinérgico entre la MP y el implante de NP. Lo anterior tenía que ser valorado cuidadosamente debido a que existe un reporte reciente en el que se buscó un efecto sinérgico al combinar 2 neuroprotectores, la MP y el gangliosido GM1 que por separado ya habían demostrado tener efecto benéfico después de lesión del SNC, pero al realizar esta combinación y contrario a lo que podría esperarse, resultó que el GM1 bloqueó los efectos benéficos de la MP (Constantini y Young, 1994). Aunado a lo anterior, existe otro trabajo sobre LTME en el que no se observó ningún efecto sinérgico al combinar el implante de NP fresco disociado con la administración de MP. Sin embargo, esta maniobra se realizó en la fase aguda (Guizar-Sahagún, 1996), es decir, inmediatamente después de la lesión, cuando la ME se encuentra edematosa, la hemorragia es intensa y la isquemia muy marcada. No obstante lo anterior, en teoría, la asociación de MP con el implante de NP

fresco o de NPP después de una LTME, podría limitar la destrucción de las vainas de mielina y favorecer la remielinización de aquéllas que a pesar del tratamiento farmacológico se hubieran lesionado, al emplear el implante de NP fresco o predegenerado en la fase crónica y la MP en la fase aguda y antes de realizar el implante.

En el presente estudio, se observó que 4 meses después de la contusión, el grupo que recibió implante de NPP y administración de MP mostró diferencias con significancia estadística en la población de axones, el número de fibras mielinizadas y el IDM al compararlo con el grupo control.

Es probable que el mayor número de axones observado en el grupo de NPPMP esté dado tanto por el efecto neuroprotector de la MP como por el efecto trófico y de guía para el recrecimiento axonal del NPP (Bähr et al., 1992; Danielsen et al., 1994 y 1995; Kerns et al., 1993; Zhao et al., 1994) y a pesar del daño adicional producido por la manipulación de la ME al prepararla para recibir el implante, la combinación de ambos tratamientos mostró ser superior al analizar los parámetros morfométricos referidos previamente, que cuando se emplearon por separado.

Por otra parte, la significancia estadística observada al comparar el número de fibras mielinizadas del grupo control con las del NPPMP pudo estar dada por el gran número de CS que se obtienen al predegenerar un nervio. Más aún, se encontraron diferencias estadísticas en el número de fibras mielinizadas al comparar el grupo de NPMP y el de NPPMP, lo que sugiere una posible superioridad del NPP sobre el NP fresco para remielinizar axones. No obstante lo anterior, esto fue sólo evidente al combinar el implante con la administración de MP, con lo cual se apoya la hipótesis de que la combinación de ambos tratamientos puede tener un efecto sinérgico.

En cuanto al IDM, se obtuvo significancia estadística al término del estudio entre el grupo control y el de NPPMP, cuyos valores fueron de 0.88 y 0.80, respectivamente. Si se considera que el IDM óptimo para que exista una adecuada propagación del impulso

nervioso en las fibras mielínicas oscila entre 0.60 y 0.80 (Williams y Chalupa, 1983), se puede decir que la combinación de NPP y MP aproxima el IDM a los límites que permiten a las fibras nerviosas mantener su función.

En un trabajo previo, en el que se utilizó el mismo modelo experimental empleado en este estudio, se observó que el IDM generado por la remielinización espontánea un año después de la contusión fue de 0.83, (Salgado-Ceballos et al., 1998), es decir, que con la combinación del implante de NPP y MP obtenemos un IDM más cercano a lo normal 4 meses después de la lesión (0.80), que incluso aquel generado en forma espontánea un año después de la contusión (0.83).

En términos generales, el grupo con mayor número de axones y fibras mielinizadas, con un IDM más cercano a los parámetros de normalidad y un mejor porcentaje de funcionalidad fue el de NPPMP, con lo que se demostró la existencia de un efecto sinérgico cuando se emplean en combinación, ya que al usarlos por separado el beneficio en todos los parámetros referidos fue menor.

F) Evaluación funcional.

El déficit funcional observado después de una contusión severa de la ME se debe, en gran parte, a la destrucción de los axones a través de los cuales pasan las señales eléctricas que conectan al cerebro con el resto del organismo (Young, 1989) y a la deficiente conducción de los impulsos nerviosos producto de la desmielinización de las fibras que sobreviven a la lesión (Blight, 1985; Dusart et al., 1992) y a la incapacidad del sistema para remielinizar no sólo a los axones sobrevivientes, sino también a aquellos resultantes de los procesos plásticos inherentes a la ME.

Aunque existen numerosos estudios que han demostrado que el tratamiento con MP promueve la recuperación funcional en animales con LTME por contusión o por compresión (Anderson et al., 1985; Braugher et al., 1987; Demopoulos et al., 1982; Green et al., 1980; Means et al., 1981; Young y Flamm, 1982), otros estudios no han podido demostrar la efectividad de este tratamiento (Faden et al., 1984), por ejemplo:

Utilizando un modelo animal de compresión de la ME en gatos, Braughler y colaboradores observaron que el estado clínico general y la recuperación funcional de los animales tratados con MP fue mejor más temprana y completa que en los controles (72% vs 31%), un mes después de la lesión (Braughler et al., 1987). Más aún, Holtz y colaboradores (1990) demostraron en un modelo en ratas que la MP tiene efecto sobre la función, ya que al evaluar la capacidad de los animales para sostenerse sobre un plano con diferentes grados de inclinación (prueba del plano inclinado), obtuvieron 63° en la evaluación preoperatoria promedio (control), mientras que el día 1 postlesión esta cifra se redujo a $33 \pm 2^\circ$ en el control y sólo a $50 \pm 1^\circ$ en el tratado con MP. No obstante lo anterior, en un modelo muy parecido al primero se demostró que la MP protege en forma significativa a los axones de la degeneración postraumática, sin embargo, la evaluación clínica a los 7 días no mostró diferencias al compararla con los controles (Iizuka et al., 1986), situación muy parecida a la ocurrida en el presente estudio, en el que el implante de NPP y el uso de la MP modificaron en forma estadísticamente significativa varios parámetros morfométricos, pero a pesar de ello no fue posible demostrar diferencias estadísticas en las evaluaciones clínicas, lo anterior probablemente debido a que el tiempo de corte fue en etapas muy tempranas.

En modelos de lesión similares al empleado en el presente trabajo, se ha demostrado que la MP reduce el volumen de la lesión en la ME, a las 24 hrs., en el 56% en lesiones leves, en el 28% en lesiones moderadas y en el 13% en lesiones severas al compararlos con los controles, siendo significativo en los 2 primeros casos pero no en las lesiones severas (Constantini y Young, 1994). Como el efecto neuroprotector de la MP disminuye conforme se incrementa la severidad de la lesión según se demostró anteriormente, es probable que en nuestro modelo experimental, el volumen de lesión sólo se redujo en un 4%, ya que lo que Constantini y Young consideraron como lesión severa se provocó con una fuerza de 50g/cm^2 y lo que nosotros consideramos como lesión severa se produjo con una fuerza de 150g/cm^2 . Lo anterior puede estar directamente implicado en el efecto funcional logrado.

En los humanos con LTME, se ha reportado mejoría motora después de tratamiento con MP. La administración de este fármaco en pacientes con lesión leve y lesión moderada mostró diferencias significativas al comparar el efecto de la MP con el del placebo, sin embargo, en los pacientes con lesión grave, no se encontraron diferencias significativas y la mejoría inclusive fue a favor del placebo. Al tomar en cuenta los 3 grupos, tan sólo se logró en proporción, una mejoría que osciló entre 5 y 7% en favor de la MP a los 6 y 12 meses de seguimiento, respectivamente (Bracken, 1990, 1992).

Por otra parte, aunque con el implante de NP fresco o de NPP se incrementó el número de axones y la emisión de colaterales axónicas y se acercó el IDM hacia los parámetros de normalidad, los resultados funcionales no fueron tan favorables como se esperaba. Nosotros pensamos que no se alcanzaron diferencias con significancia estadística en la recuperación funcional quizá porque no permitimos que el implante ejerciera todo su efecto benéfico, ya que al realizar el trasplante se produjo un daño adicional para cuya recuperación sólo se dispuso de 3 meses. Lo anterior es relevante, debido a que otros autores han reportado calificaciones con significancia estadística, incluso más altas en los controles en comparación con los transplantados en evaluaciones a corto plazo (Stokes y Reier, 1992).

Tal vez también sea necesario realizar el implante en etapas más tempranas (Anderson et al., 1995), aunque otro autor (Grijalva, 1997), no está de acuerdo en la existencia de una "ventana terapéutica" en cuanto al tiempo postlesión y el momento del trasplante propuesta por Anderson y colaboradores es probable que esto tenga validez.

En el presente estudio, el máximo porcentaje de recuperación funcional se obtuvo en el grupo de NPPMP y correspondió al 56%, observándose una diferencia con el grupo control de alrededor del 10%, lo cual sin embargo, no alcanzó significancia estadística. No obstante lo anterior, aunque estas mejorías sean en proporción pequeñas, pueden tener una gran importancia funcional, debido a que estas ganancias menores observadas en animales de experimentación, podrían traducidas a la clínica, repercutir en la vida cotidiana de los individuos, haciéndolos menos dependientes.

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados indican que después de una contusión severa de la ME en ratas adultas:

1. La MP administrada en forma temprana y a razón de 30 mg/kg de peso corporal ejerce un efecto neuroprotector caracterizado por la presencia de un mayor número de axones y de fibras mielinizadas en el epicentro de la lesión y un IDM más cercano a los parámetros de normalidad, en comparación con el grupo control, lo cual se demuestra por la significancia estadística observada en todos los tiempos de corte.
2. La MP sí es capaz de proteger a las vainas de mielina del daño producido por una contusión severa de la ME en ratas adultas.
3. La MP inhibe la formación de colaterales axónicas.
4. El implante de NP fresco o NPP, favorece la recuperación de los parámetros morfométricos, que se caracteriza por la presencia de un mayor número de axones y de fibras mielinizadas en el epicentro de la lesión y un IDM más cercano a los parámetros de normalidad, en comparación con el grupo control, lo anterior aunado al incremento en la emisión de colaterales axónicas.
5. El implante de NPP permite una remielinización más extensa que la observada en forma espontánea e incluso que la generada con implantes de NP fresco.
6. La combinación de MP con el implante de NP fresco o con NPP produce un efecto sinérgico que se ve reflejado en el número de axones y de fibras mielinizadas en el epicentro de la lesión, en el IDM y en el porcentaje de funcionalidad.
7. La máxima recuperación funcional observada se obtuvo al combinar MP más implante de NPP y fue del 56%, la cual difirió del grupo control en alrededor de un 10%.

PERSPECTIVAS A FUTURO.

1. Se deberán realizar estudios a largo plazo para permitir que los trasplantes ejerzan la totalidad de su efecto en la recuperación de los parámetros morfométricos y funcionales.
2. Evaluar la realización de trasplante en etapas más tempranas
3. Evaluar el empleo en combinación con MP y/o NPP y otra medida terapéutica con efecto sinérgico que permita lograr una mejor funcionalidad en individuos sometidos a LTME.

FALTA PAGINA

No. 84

BIBLIOGRAFIA.

1. Acheson A., Barker P., Anderson R., Miller F. and Murphy R. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 1991;7:265-75.
2. Aguayo A.J, David S. and Bray G.M. Influences of the glial environment on the elongation of axon after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 1981;95:231-240.
3. 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.
4. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publish. Inc., 1994, pp. 971-1000.
5. Allen A.R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column *JAMA* 1911;57:878-880.
6. Anderson DK, Means ED, Waters TR. and Spears DJ. Spinal cord energy metabolism following compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg* 1980;53:375-380.
7. Anderson D.K., Means E.D., Waters T.R. and Green E.S. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg* 1982;56:106-113.
8. Anderson, D.K. and Means, E.D. Iron induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone. *J Free Rad Biol Med* 1985; 1:59-64.
9. Anderson, D.K., Saunders, R.D., Demediuk, P., Dugan, L.L., Braughler, J.M., Hall E.D., Means, E.D., Horrocks, L.A. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: Partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *CNS Trauma* 1985; 2:257-267.
10. Anderson D.K., Reier P.J., Wirth E.D., Theele D.P., Mareci T. and Brown S.A. Delayed grafting of fetal CNS tissue into chronic compression lesions of the adult cat spinal cord. *Res Neurol Neurosci* 1991;2:309-325.
11. Anderson D.K., Howland D.R. and Reier P.J. Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. *Brain Pathology* 1995;5:451-457.
12. Antal EJ, Wright CE, Gillespie WR, Albert KSJ. Influence or route of administration on the pharmacokinetics of methylprednisolone. *J Pharmacokinet. Biopharm.* 1983; 11:561-576.
13. Ard M.D., Bunge R.P. and Bunge M.B. Comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth. *J Neurocytol* 1987;16:539-555.
14. Avellino A., Hart D., Dailey A., McKinnon M., Ellegala D. and Kliot M. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurol.* 1995;136:183-98.
15. Bähr M. and Bunge RP. Functional status influences the ability of Schwann cells to support adult rat retinal ganglion cell survival and axonal regrowth. *Exp Neurol* 1989;106:27-40.

16. Bähr M., Eschweiler G., and Wolburg H. Precrushed sciatic nerve grafts enhance the survival and axonal regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. *Exp. Neurol.* 1992;116:13-22.
17. Baichwal R., Bigbee J., and De Vries G. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:1701-05.
18. Bancroft J. Enzyme histochemistry. In: Bancroft J. and A. Stevens (eds): *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone, London UK. 1990 pp. 379-399.
19. Bandtlow C., Heumann R., Schwab M., and Thoenen H. Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *EMBO J.* 1987;6:891-9.
20. Baron-Van Evercooren A., Kleinman H.K., Ohno S., Naranjos P., Schwartz J.P. and Dubois-Dalcq M.E. Nerve growth factor, laminin and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures. *J Neurosci Res* 1982;8:179-183.
21. Baron-Van Evercooren A., Gansmüller A., Clerin-Duhamel E., Pascal F. and Gumpel M. Repair of a myelin lesion by Schwann cells transplanted in the adult mouse spinal cord. *J Neuroimmunol* 1992;40 234-242.
22. Baron Van-Evercooren, Barut S, Canbolat A, Bilge T, Aydin Y, Cokneseli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 1993;16:53-59.
23. Baron Van Evercooren A, Avellana-Adalid V., Younes-Chennooufi A.B, Gansmüller A, Nait-Oumesmar B. and Vignais I. Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. *GLIA* 1996;16:147-164.
24. Barut S, Canbolat A, Bilge T, Aydin Y, Cokneseli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. Time-level relationship. *Neurosurg Rev* 1993;16:53-59.
25. Basso DM., Beattie M.S., Bresnahan J.C., Anderson D.K., Faden-AI., Gruner J.A., Holford T.R., Hsu C.Y., Noble L.J., Nockels R., Perot P.L., Salzman S.K., Young W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma* 1996;13(7):343-359.
26. Beuche W. and Friede R. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 1984;13:767-96.
27. Bixby J.L., Lillien J. and Reichardt L.F. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 1988;107:353-362.
28. Bjourklund A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Victorin K., Strecker R.E., Clarke D.J. and Dunnet S.B. Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *TINS* 1987;10:509-516.
29. Blakemore W.F. Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. *J Neurocytol* 1975;4:745-757
30. Blakemore W.F. Invasion of Schwann cells into the spinal cord of the rat following local injections of lysolecithin. *Neuropathol. Appl Neurobiol* 1976;2:21-39

31. Blakemore W.F. Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted from the sciatic nerve. *Nature (London)* 1977;266:68-69.
32. Blakemore W.F. and Crang A.J. The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. *J Neurol Sci* 1985;70:207-223.
33. Blight A.R. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for "secondary" cell damage in spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985;2:299-315.
34. Blight A.R. and Young W. Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by Schwann cells. *J Neurol Sci* 1989;91:15-34.
35. Bogdan C., Paik J., Vodovotz Y. and Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 1992;267:23301-8.
36. Boyles J., Zollner C., Anderson L., Kosik L., Pitas R., Weisgraber K., Hui D., Mahley R., Gebike-Haerter P., Ignatius M. and Shooter E. A role for a lipoprotein E, apolipoprotein A-1, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 1989;83:1015-31.
37. Bracken, M.B., Collins, W.F., Freeman, D.F., et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*. 1984; 251:45-52.
38. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Hellenbrand, K.G., et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Study. *J. Neurosurg*; 1985; 63:704-713.
39. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F., Holford, T.R., Young, W., Baskin, D.S., et al. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *New Engl. J. Med.* 1990; 322:1405-1411.
40. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F., Holford, T.R., Baskin, D.S., Eisenberg, H.M., et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J. Neurosurg*. 1992; 76:26-31.
41. Bracken M.B., Shepard M.J., Holford T.R., Leo-Summers L., Aldrich E.F., Fazi M., Fehlings M., Herr D.L., Hitchon P.W., Marshall L.F., Nockels R.P., Pascale V., Perot P.L., Piepmeier J., Sonntag V.K., Wagner F., Wilberger J.E., Winn H.R., Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National acute spinal cord injury study. *JAMA* 1997;277(20):1597-1604.
42. Braughler, J.M. and Hall, E.D. Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effects on (Na⁺ + K⁺)-ATPase, lipid peroxidation, and alpha motor neuron function. *J. Neurosurg*. 1982; 56:838-844.
43. Braughler J.M. and Hall E.D. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1983a;59:256-261.

44. Braughler JM, Hall ED. Uptake and elimination of methylprednisolone from contused cat spinal cord following intravenous injection of the sodium succinate ester. *J Neurosurg* 1983b;58:538-542
45. Braughler, J.M. and Hall, E.D. Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J. Neurosurg.* 1984; 61:290-295.
46. Braughler JM. Lipid peroxidation-induced inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J Neurochem* 1985;44:1282-1288.
47. Braughler, J.M., Hall E.D., Means, E.D., Waters, T.R. and Anderson, D.K. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 1987; 67:102-105.
48. Burney R.E., Mario R.F., Maynard F. and Karunas R. Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg* 1993;128:596-599.
49. Burns SP, Golding DG, Rolle WA Jr., Graziani V, Ditunno JF Jr. Recovery of ambulation in motor incomplete tetraplegia. *Arch Phys med Rehabil* 1997;78(11):1169-1172
50. Clemence A., Mirsky R. and Jessen R. Non-myelin-forming Schwann cells proliferate rapidly during Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurocytol* 1989;18:185-92.
51. Clendenon N.R., Allen H., Gordon W.A. and Bringham W.G. Inhibition of Na⁺K-activated ATPase activity following experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* 1978;49:563-568.
52. Coggi G., Dell'Orto P., Viale G. Avidin-biotin methods. In: Polak, J., and S. Van Norden (eds): *Immunocytochemistry*. 2nd. ed. John Wrigth and Sons Ltd. England. 1986 pp 54-70.
53. Constantini, S. and Young, W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J. Neurosurg.* 1994; 80:97-111.
54. Cooper M.E. Acute care of the spinal cord injured. *Axone* 1996;17(4):76-80.
55. Chiquet M. Neurite growth inhibition by CNS myelin proteins: a mechanism to confine fiber tracts?. *Trends Neurosci* 1989;12:1-3.
56. Danielsen N., Kerns J.M., Holmquist B., Zhao Q., Lundborg G., and Kanje M. Predegenerated nerve grafts enhance regeneration by shortening the initial delay period. *Brain Res* 1994;666:250-254.
57. Danielsen N., Kerns J.M., Holmquist B., Zhao Q., Lundborg G. and Kanje M. Predegeneration enhances regeneration into acellular nerve grafts. *Brain Res* 1995;681:105-108.
58. Daniloff J., Levi G., Grumet M., Rieger F. and Edelman G. Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J Cell Biol* 1986;103:929-45.
59. Das G. D. Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. *Brain Res Bull* 1989;22:7-32.

60. Demediuk, P., Saunders, R.D., Anderson, D.K., Means, E.D. and Horrocks, L.A. Membrane lipid changes in laminectomized and traumatized cat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985a; 82:7071-7075.
61. Demediuk, P., Saunders, R.D., Clendenon, R.D., Means, E.D., Anderson D.K. and Horrocks, L.A. Changes in lipid metabolism in traumatized spinal cord. *Prog. Brain Res.* 1985b; 63:211-226.
62. Demediuk, P. and Faden, A.I. Traumatic spinal cord injury in rats causes increases in thromboxane but not peptidoleukotrienes. *J. Neurosci. Res.* 1988; 20:115-121.
63. Demopoulos H.B., Flamm E.S. and Pietronigro D.D. The free radical pathology and the microcirculation in the motor central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (suppl III)* 1980;492:91-119.
64. Demopoulos, H.B., Flamm, E.S., Seligman, M.L., Pietronigro, D.D., Tomasula, J. and Decrescito, V. Further studies on free radical pathology in the major central nervous system disorders: Effects of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Can J Physiol* 1982; 60:1415-1424.
65. DeVivo MJ, Kartus PL, Stover SL, et al. Cause of death for patients with spinal cord injuries. *Arch Intern Med* 1989;149:1761-1766.
66. DeVivo MJ, Kartus PL, Stover SL. Fine RR. Benefits of early admission to an organised spinal cord injury care system. *Paraplegia* 1990;510:355-359.
67. DeVivo MJ, Black KJ, Stover SL. Causes of death during the first 12 years after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1993;74:248-254.
68. Ditunno, J.F. and Formal, C.S. Chronic spinal cord injury. *New Engl J Med* 1994; 330:550-556.
69. Dixon, G.S., Danesh, J.N. Caradoc-Davies, T.H. Epidemiology of spinal cord injury in New Zeland. *Neuroepidemiology.* 1993; 12:88-95.
70. Dohrman G.J. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch Neurol* 1972;27:468-473.
71. Duh M.S., Shepard M.J., Wilberger J.E., Bracken M.B. The effectiveness of surgery on the treatment of acute spinal cord injury and its relation to pharmacological treatment. *Neurosurgery* 1994;35(2):240-248.
72. Duncan ID, Aguayo AJ, Bunge RP, Wood PM. Transplantation of rat Schwann cells grown in tissue culture into the mouse spinal cord. *Journal of the Neurological Sciences* 1981;49:241-252.
73. Duncan, I.D. Hammang, J.P., Jackson, K.F., Wood, P.M., Bunge, R.P. and Langford, I. Transplantation of oligodendrocytes and Schwann cell into the spinal cord of the myelin-deficient rat. *J. Neurocytol.* 1988; 17:351-360.
74. Duncan I.D. and Milward E.A., Glial cell transplants: Experimental therapies of myelin diseases. *Brain Pathol* 1995;5:301-310.
75. Dusart I., Marty S. and Peschanski M. Demyelination and remyelination by Schwann cells and oligodendrocytes after kainate induced neuronal depletion in the central nervous system. *Neurosci* 1992;51:137-148.
76. Eisenberg M.G. and Tierney D.O. Changing demographic profile of the spinal cord injury population: implications for health care support systems. *Paraplegia* 1985;23:335-343.

77. Faden AI, Jacobs TP, Patrick DH, et al. Megadose corticosteroid therapy following experimental spinal injury. *J Neurosurg* 1984;60:712-717
78. Faden, A.I. Pharmacological treatment of central nervous system trauma. *Pharmacol. Toxicol.* 1996; 78:12-17.
79. Fawcett J., and Keynes R. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:43-60.
80. Fehlings MG. Current medical management of acute spinal injury. *Neurol Emerg Worldwide Studies* 1994;5(2):1-4.
81. Fehlings M.G., Low D. Initial stabilization and medical management of acute spinal cord injury. *Am Fam Pshysician* 1996;54(1):155-162.
82. Fehlings MG, and Nashmi R. A new model of acute compressive spinal cord injury in vitro. *J Neurosci Methods* 1997;71(2):215-224.
83. Felts P.A, and Smith K.J. Conduction properties of central nerve fibers remyelinated by Schwann cells. *Brain Res* 1992;574:178-192.
84. Friede R. and Beuche W. Macrophage functional properties during myelin degradation. *Adv Neurol* 1993;59:327-36.
85. Gerndt S.J., Rodríguez J.L., Pawlik J.W., Taheri P.A., Wahl W.L., Micheals A.J., Papadopoulos S.M. Consequences of high dose steroid therapy for acute spinal cord injury. *J Trauma* 1997;42(2):279-284.
86. Gledhill R.F., Harrison B.M. and Mc Donald W.L. Demyelination and remyelination after acute spinal cord compression. *Exp Neurol* 1973;38:472-487.
87. Goldberger M.E. and Murray M. Lack of sprouting and its presence after lesions of the cat spinal cord. *Brain Res* 1982;242:227-239.
88. Goodrum J., and Novicki D. Macrophage-like cells from explant cultures of rat sciatic nerve produce apopipoprotein E. *J Neurosci Res* 1988;20:457-62.
89. Green BA, Kahn T, and Klose KJ. A comparative study of steroid therapy in acute experimental spinal cord injury. *Surg Neurol* 1980;13:91-97
90. Griffin J., R. George and Ho T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52(6):553-60.
91. Grijalva I., Guizar-Sahagun G., Madrazo I., Franco-Bourland R.E., Salgado-Ceballos H., Ibarra A., Espitia A.L. Neuroprotection by methylprednisolone for mechanic-enzymatic manipulation of contused spinal cord areas in rats. *Neurodegeneration* 1994;3:159-162.
92. Grijalva Otero José Efren Israel. Efecto funcional del trasplante fetal alogénico homotópico en un modelo de contusión de la médula espinal de ratas adultas en fase de reparación y estabilización. Tesis Doctorado en Ciencias, U.N.A.M., 1997.
93. Guizar-Sahagun G., Grijalva I., Madrazo I., Franco-Bourland R., Salgado-Ceballos H., Ibarra A., Larriva-Sahd J. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 1994;7:61-70.
94. Guizar-Sahagun G. Evaluación morfofuncional del implante de nervio periférico y metilprednisolona después de contusión medular en ratas. Tesis Doctorado en Ciencias, U.N.A.M., 1996.

95. Guy J., Ellis A.E., Kelley K. and Hope G.M. 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.
96. Hall, E.D. and Braugher, J.M. Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the *in vitro* peroxidation of cat spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* 1981; 73:321-324.
97. Hall ED. Acute effects of intravenous glucocorticoid on cat spinal motor neuron electrical properties. *Brain Res* 1982;240:186-190
98. Hall, E.D. and Braugher, J.M. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity: Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J. Neurosurg.* 1982; 57:247-253.
99. Hall, E.D., Wolf, D.L. and Bruagher, J.M. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J. Neurosurg.* 1984; 61:124-130
100. Hall E.D. Beneficial affects of acute intravenous ibuprofen on neurologic recovery of head-injured mice; comparison of cyclooxygenase inhibition with inhibition of thromboxane A₂ synthetase or 5-lipoxygenase. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985;2:75-83.
101. Hall, E.D. and Wolf, D.L. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanism of posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg.* 1986; 64:951-961.
102. Hall, E.D. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma. *J Neurotrauma* 1991; 8 (Suppl. 1): S31-S41.
103. Hall E.D. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992;76:13-22
104. Hall, E.D. and Braugher, J.M. Free radicals in CNS injury, in: *Molecular and cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease*. S.G. Waxman (ed.). Raven Press, New York, 1993, pp.81-105.
105. Hall, E.D., Yonkers, P.A., Taylor, B.M. and Sun, F.F. Lack of effect of postinjury treatment with methylprednisolone or tirilazad mesylate on the increased in eicosanoid levels in the acutely injured cat spinal cord. *J. Neurotrauma.* 1995; 12:245-255.
106. Harrison B.M. Schwann cells divide in a demyelinating lesion of the central nervous system. *Brain Res* 1987;409:163-168.
107. Haynes, R.C. and Murad, F. Adrenocorticotrophic hormone, adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of synthesis and actions of adrenocortical hormones, in: *The pharmacological Basis of Therapeutics*. A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, and P. Taylor (eds.). Pergamon Press, New York, 8th ed., 1990 pp.1431-1462.
108. Hirata F., Schiffman E., Venkatasubramanian K, Solomon D. and Axelrod J. A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2533-2536.
109. Holtz A., Nyström B. and Gredin B. Effect of methylprednisolone on motor function and spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats. *Acta Neurol Scand* 1990;82:68-73.

- 110.Hsu, C.Y. and Dimetrijevic, M.R. Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action. *J. Neurotrauma*. 1990; 7:115-119.
- 111.Hsu, C.Y., Halushka, P.V., Hogan, E.L., Banik, N.L., Lee, W.A., and Perot, P.L. Alterations of thromboxane and prostacyclin levels in experiemetal spinal cord injury. *Neurology*. 1985; 35:1003-1009.
- 112.Ibarra LG., Donati SR., Contreras RV. Lesiones traumáticas de la médula espinal. Estudio epidemiológico. *Cirugía y Med Urg* 1990; 15: 51-55.
- 113.Iizuka H, Iwasaki Y, Yamamoto T. Morphometric assessment of drug effects in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1986;65:92-98.
- 114.Jonsson, H.T. and Danieli, H.B. Altered levels of PGF in cat spinal cord tissue following traumatic injury. *Prostaglandins*. 1976; 11:51-59.
- 115.Kerns J.M., Danielsen N., Holmquist B., Kanje M. and Lundborg G. The influence of predegeneration on regeneration through peripheral nerve grafts in the rat. *Exp. Neurol*. 1993;122:28-36.
- 116.Koles Z.J. and Rasminsky M. A computer simulation of conduction in demyelinated nerve fibers. *J Physiol* 1972;227:351-364.
- 117.Komiyama A., and Suzuki K. Age-related differences in proliferative responses of Schwann cells during Wallerian degeneration. *Brain Res*. 1992;573:267-275.
- 118.Krause JS,Stemberg M, Lottes S, Maides J. Mortality after spinal cord injury an 11 year prospective study. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78(8):815-821
- 119.Lander A. Understanding the moluculas of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. *Trends Neurosci*. 1989;12:189-95.
- 120.Levy M.L., Gans W., Wijesinghe H.S., SooHoo W.E., Adkins R.H., Stillerman C.B. Use of methylprednisolone as an adjunct in the management of patients with penetrating spinal cord injury outcome analysis. *Neurosurgery* 1996;39(6):1141-1148
- 121.Levi R, Hultling C, Seiger A. The stockholm spinal cord injury study.. 4. Psychosocial and financial issues of the Swedish annual level of living survery in SCI subjects and controls. *Paraplegia* 1996;34(3):152-157
- 122.Ley General de Salud de la República Mexicana. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, Sexta edición, México D.F. 1990; pp 430-431.
- 123.Lindhholm D., Heumann R., Meyer M. and Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987;330:658-9.
- 124.Lindhholm D., Heumann R., Hengerer B. and Thoenen H. Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263:16348-16351.
- 125.Ludwin S.K. Remyelination in the central nervous system and the peripheral nervous system. *Adv Neurol* 1988;47:215-254.
- 126.Ludwin S.K. Evolving concepts and issues in remyelination. *Dev.Neurosci* 1989;11:140-148.
- 127.Martini R. and Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L-1, N-CAM and myelin associated glycoprotein in regenerating mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 1988;106:1735-47.
- 128.Marx J.L. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 1995;270:232-233.

129. McDonald W.I. and Sears T.A. Focal experimental demyelination in the central nervous system. *Brain* 1970;93:575-582.
130. McGinley, P.A., Braugher, J.M. and Hall, E.D. Determination of methylprednisolone in central nervous tissue and plasma using normal phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982; 230:29-35.
131. McIntosh, T.K. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. *Cereb. Brain Metab. Rev.* 1994; 6:109-162.
132. McMorris F.A. and McKinron R.D. Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol* 1996;6:313-329.
133. Means E.D., Anderson D.K., Waters T.R. and Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma of the feline spinal cord. *J Neurosurg* 1981;55:200-208.
134. Means ED. and Anderson DK. Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983;42:707-719
135. Mirsky R. and Jessen K. Schwann cell development and the regulation of myelination. *Sem Neurosci* 1990;2:423-35.
136. Miyamoto Y., Higaki T., Sugita T., Ykuta Y. and Tsuge K. Morphological Reaction of Cellular Elements and the Endoneurium Following Nerve Section. *Periph Nerve Repair Regen* 1986;3:7-18.
137. Naso W.B., Perot P.L., Cox R.D. The neuroprotective effect of high dose methylprednisolone in rat spinal cord hemisection. *Neurosci Lett* 1995;189(3):176-178
138. Nathaniel EJH, Pease D.C. Degenerative changes in rat dorsal roots during Wallerian degeneration. *J Ultrastr Res* 1963;9:511-532
139. Novak E, Stubbs SS, Seckman CE, et al. Effects of a single large intravenous dose of methylprednisolone sodium succinate. *Clin Pharmacol Ther* 1970;11:711-717
140. Oudega M, Varon S. and Hagg T. Regeneration of adult rat sensory axons into intraspinal nerve grafts: promoting effects of conditioning lesion and graft pre-degeneration. *Exp. Neurol* 1994;129:194-206
141. Paino, C.L. and Bartlett, M.B. Induction of axon growth into Schwann cell implants grafted into lesioned adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 1991; 114:254-257.
142. Perry V., Brown M. and Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J Exp Med* 1987;165:1218-23.
143. Perry V., Brown M. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioessays* 1992;14:401-6.
144. Pitts, L.H., Ross, A., Chase, G.A. and Faden, A.I. Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries. *J. Neurotrauma.* 1995; 12:235-243.
145. Polistina D.C., Murray M. and Goldberger M.E. Plasticity of dorsal root and descending serotonergic projections after partial deafferentation of the adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1990;299:349-363.
146. Regan, R.F. and Choi, D.W. Excitotoxicity and central nervous system trauma. In: *The neurobiology of Central Nervous System Trauma.* Eds.: S.K. Slazman and A. Y. Faden. Oxford University Press, New York. 1994, pp. 173-181.
147. Rhoney D.H., Luer M.S., Hughes M., Hatton J. New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 1996;16(3):382-392.

148. Richardson P.M., McGuinness U.M. and Aguayo A.J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 1980;284:264-265.
149. Richardson P.M., McGuinness U.M. and Aguayo A.J. Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: studies with axonal tracing methods. *Brain Res* 1982;237:147-162.
150. Rish B.L., Dilustro J.F., Salazar A.M., Schwab K.A. Brown H.R. Spinal cord injury: a 25 years morbidity and mortality study. *Mil-Med* 1997;162(2):141-148
151. Rosenberg-Schaffer, L.J. and Lucas, J.H. An *in vitro* study of the effects of methylprednisolone on lesioned and uninjured mammalian spinal neurons. *Brain Res*. 1993; 605:327-331.
152. Salgado-Ceballos H., Guizar-Sahagun G., Feria-Velasco A., Grijalva I., Espitia L., Ibarra A., Madrazo I. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res* 1998;782:126-135.
153. Salonen V., Aho H., Roytta M. and Peltonen J. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropath Berl* 1988;75:331-336.
154. Saunders, R.D., Dugan, L.D., Demediuk, P., Means, E.D., Horrocks, L.A. and Anderson, D.K. Effects of methylprednisolone and the combination of alphatocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J. Neurochem.* 1987; 49:24-31.
155. Sceats D.J., Friedman W.A., Sybert G.W. and Ballinger W.E. Regeneration in peripheral nerve grafts to the cat spinal cord. *Brain Res* 1986;362:149-156.
156. Schachner M. Functional implications of glial cell recognition molecules. *Sem Neurosci* 1990;2:497-507.
157. Schwab M.E. and Schnell L. Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *J Neurocytol* 1989;18:161-169.
158. Schwab M.E. Myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Exp Neurol* 1990;109:2-5.
159. Schwab M.E., Kapfhammer J.P. and Bandtlow C.E., Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci* 1993;16:565-595.
160. Siesjö, B.K. Historical overview: calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1988; 522:638-661.
161. Siironen J., Collan Y., and Røyttä M. Axonal reinnervation does not influence Schwann cell proliferation after rat sciatic nerve transection. *Brain Research*. 1994;654:303-11.
162. Smith G.V. and Stevenson J.A. Peripheral nerve grafts lacking viable Schwann cells fail to support central nervous system axonal regeneration. *Exp Brain Res* 1988;69:299-306
163. Sterio D. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microscopy*. 1984;134:127-36.
164. Stoffel W. The myelin membrane of the central nervous system essential macromolecular structure and function *Angew Chem Int De Engl* 1990;29:958-976.
165. Stokes B.T., Fox P. and Hollinden G. Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1983;80:561-172.

166. Stokes B.T. and Reier P.J. Fetal grafts after chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1992;116:1-12.
167. Stoll G., Griffin J., Li C. and Trapp B. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 1989;18:671-83.
168. Stripling, T.E. The cost of economic consequences of traumatic spinal cord injury. *Paraplegia News*. 1990: 50-54.
169. Taniuchi M., Clark H. and Johnson E. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986;83:4094-8.
170. Tarlov I.M., Klinger H. and Vitales S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Arch Neurol Psych* 1953;70:813-819.
171. Tator C.H. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 1995;5(4):407-413
172. Tator, C.H. and Fehlings, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanism. *J. Neurosurg.* 1991; 75:15-26.
173. Whiteneck, G.G., Charlifue, S.W., Frankel, H.L., Fraser, M.H., Gardner, B.P., Kerhart, K.A., Krishnan, K.R., Meter, R.R., Nuseibeh, I., Short, D.J. and Silver, J.R. Mortality, morbidity, and psychosocial outcomes of persons spinal cord injured more than 20 years ago. *Paraplegia*; 1992; 30:617-630.
174. Wilson J.W. Cellular localization of ³H-labeled corticosteroids by electron microscopic autoradiography after hemorrhagic shock, in Glenn TM (ed): *Steroids and shock*. Baltimore: University Park Press 1974, pp 275-299.
175. Williams P.L. and Wendel-Smith C.P. Some additional parametric variations between peripheral nerve fiber populations. *J Anat (London)* 1971;109:502-526.
176. Williams R.W. and Chalupa L.M. An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: Evidence of size groupings and regional organization. *J Neurosci* 1983;3:1554-1564.
177. Wrathall J.R. Behavioral methods for evaluating rats with contusive spinal cord injury: The combined behavioral score. En: Brown M. Goldberger M. (Eds.). *Conference proceedings: Criteria for assessing recovery of function: Behavioral methods*. American Paralysis Association, Springfield NJ 1989; pp 26-33.
178. Wrathall J.R., Rigamonti D.D., Braford M.R. and Kao C.C. Reconstruction of the contused cat spinal cord by the delayed nerve graft technique and cultured peripheral non-neuronal cells. *Acta Neuropathol* 1982;57:59-69.
179. Xu XM, Chen A, Guenard V, Kleitman N and Bunge MB. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol* 1997;26(1):16f.
180. Young, W. and Flamm, E.S. Effects of high dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J. Neurosurg.* 1982; 57:667-673.
181. Young W, Yen V. and Blight A. Extracellular calciumionic activity in experimental spinal cord contusion. *Brain Res* 1982;253:105-113

182. Young W. Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. In: F.J. Seil (Ed.), *Neural Regeneration and Transplantation*. A.R. Liss, New York, 1989, pp. 157-169.
183. Young, W. Medical treatments of acute spinal cord injury. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1992; 55:635-639.
184. Young, W. The role of calcium in spinal cord injury. *Cent. Nerv. Syst. Trauma*. 1985; 2:109-114.
185. Yue T.L and Feuerstein G. Platelet activating factor: a putative neuromodulator and mediator in the pathophysiology of brain injury. *Crit Rev Neurobiol* 1994;8:11-24.
186. Zhao Q., and Kerns J.M. Effects of predegeneration on nerve regeneration through silicone Y-chambers. *Brain Res* 1994;633:97-104.