

12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION, LA LOCALIZACION E INTENSIDAD DE LA LESION TRAUMATICA DE LA MEDULA ESPINAL SOBRE LA FUNCION LINFOCITARIA EN RATAS ADULTAS

T E S I S

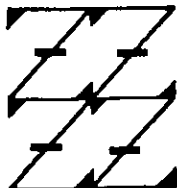
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALMA DELIA JIMENEZ GONZALEZ

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

ASESOR DE TESIS: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MEXICO, D. F.

2000

285116



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Neuroinmunología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Laboratorio de Neuroinmunología del Centro de Investigación del Proyecto CAMINA A.C.

Laboratorio de cultivo celular, Depto. de Biotecnología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas.

Laboratorio de Inmunología L-313 de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II.

**JURADO:**

DR. RUBEN MARROQUÍN SEGURA

Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN

M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL

Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA

DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

## AGRADECIMIENTOS

Al ser más grande y bondadoso que existe ..... **DIOS**, porque me ha dado la fuerza y perseverancia para lograr este pequeño éxito.

Al **Dr. Juan Antonio Ibarra** por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo, por esos consejos que me hicieron engrandecer, por su confianza, por todo el apoyo que me brindó en los momentos más difíciles, y sobre todo por su amistad.

Al **Biol. Víctor Pérez González**, por haber confiado en mí y por recomendarme con el Dr. Ibarra.

Al **M. en C. Misael González R.** y la **Q.F.B. Alejandra S. Canales R.**, por su amistad y sus palabras de aliento.

Al **Dr. Rubén Marroquín Segura**, por su ayuda y disposición en la realización del trabajo experimental.

A la **Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán** por haberme permitido trabajar en su laboratorio y darme la oportunidad de convivir con su gran equipo de trabajo, muy especialmente con: **M. en C. Edith Medina Escutia, Q.B.P Ma. Dolores Tellez Saucedo, Biol. Dolores León García, M. en C. America del Pilar Mandujano Martínez, Ql Antonio Meza Lucas y el Sr. Armando Rodríguez Olvera.**

A aquellas personas quienes con sus experiencias y conocimientos me ayudaron a salir adelante: **Q.F.B. Abigail Clatza Juárez, M. en C. Rosa María Salazar González y la Dra. Guadalupe Rico.**

Al **Dr. Gabriel Guizar Sahagún** y al incomparable equipo de Proyecto CAMINA: **MVZ Angelina Martínez, QFB Carolina Cortes, Dra. Araceli Díaz, Dra. Leticia Cruz, Biol. Ana Laura Espitia, Biol. Edson Hernández, Q.F.B Veronica Rodríguez, C.D. Ma. Luisa Gomez, Srta. Laura Baldwin, Sr. Fidel, Sra. Mary, al Sr. Guillermo y sus hijos** por su ayuda y gran disposición.

Agradezco el apoyo económico recibido por **CONACYT** (proyecto con No. de Reg. 129995-M) para la realización de la presente tesis.

## DEDICATORIA

### ***A mis padres, Albertina y Eugenio:***

Quienes con su paciencia y sacrificio  
me apoyaron en los momentos más difíciles  
y me dieron fuerzas para terminar.  
*Los quiero mucho*

### ***A la personita que más he sacrificado. El amor y la razón más grande de mi vida, mi hijo Carlitos:***

Porque desde que llegaste a mi vida,  
haz llenado de alegría cada instante.  
En los momentos en que sentí desistir,  
aún sin saberlo con un un abrazo y una sonrisa  
me diste fuerzas para seguir adelante.  
*Te amo demasiado gordito*

### ***Muy especialmente a mis hermanos Paco, Ade y mi cuñado Manuel:***

Por toda su confianza y apoyo incondicional.  
Porque nunca podre pagarles todo lo que han hecho por mi,  
por ello, solo les digo muchas gracias.

### ***A mi gran amiga Lilian Bornio:***

Porque ha estado conmigo  
en todos los momentos difíciles e importantes de mi vida.  
Mil gracias por todo ese cariño y apoyo incondicional.  
*Te Quiero Mucho.*

### ***A Guadalupe, Carmen y Roberto:***

Por su paciencia y gran ayuda al principio de mis estudios,  
sin lo cual no hubiera realizado este sueño,  
por eso les voy a estar eternamente agradecida.

### ***A Mauricio, mi cuñada Carmen y mis sobrinos Julieta, Edith, Sonia, Mauricio, Amira y Habid:***

Por toda su comprensión, apoyo y tiempo  
para ayudarme a terminar.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	5
ANTECEDENTES	
Generalidades sobre el Sistema Nervioso	
Anatomía del Sistema Nervioso Periférico.....	6
Anatomía del Sistema Nervioso Central.....	9
Histología del SNC.....	11
Fisiología del SNC.....	13
Generalidades sobre el Sistema Inmunológico	
Órganos linfoides.....	14
Inervación de los órganos linfoides.....	15
Histología del SI.....	16
Respuesta inmune.....	19
Mecanismos de Activación linfocitaria.....	21
Generalidades sobre la Lesión de la Médula Espinal	
Fisiopatología de la lesión de la médula espinal.....	23
Función del SI después de una lesión de la médula espinal.....	24
JUSTIFICACION.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y METODOS	
Diseño experimental.....	28
Consideraciones técnicas.....	29
Descripción de variables.....	30
Descripción de técnicas.....	31
Método estadístico.....	36
Consideraciones éticas.....	36

## RESULTADOS

Análisis estadístico.....	37
Proliferación celular.....	37
Producción de Inmunoglobulinas.....	42
DISCUSION.....	46
CONCLUSIONES.....	50
PERSPECTIVAS.....	50
APENDICE.....	51
GLOSARIO.....	56
REFERENCIAS.....	58



## RESUMEN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un fenómeno de alta incidencia que además de causar pérdida en las funciones motoras origina alteraciones a nivel sistémico. Uno de los efectos con mayor repercusión es la inmunosupresión poslesión. Diversos estudios han sugerido que la LTME origina una disminución en la función del sistema inmunológico (SI) lo cual provoca que los pacientes con este tipo de lesión presenten una gran predisposición a padecer infecciones y en casos muy severos llegar a la muerte. Se ha sugerido también que la localización de la LTME puede ejercer cierta influencia sobre las alteraciones del SI, sin embargo, no se han realizado estudios de manera muy controlada en cuanto a la intensidad o incluso al tiempo de evolución de la LTME, variables que pueden tener también un efecto importante sobre la función inmunológica. Así pues, se decidió realizar el presente trabajo, en el que de manera controlada, evaluamos el efecto que puede tener el tiempo de evolución, la localización y la intensidad de la lesión sobre la función de los linfocitos. Para tal efecto, se utilizaron ratas hembras de la cepa Fischer 344 con las que se formaron 4 grupos: (1) ratas sin procedimiento quirúrgico, (2) ratas con procedimiento quirúrgico pero sin LTME, (3) ratas con LTME de localización alta (T1) y (4) ratas con LTME de localización baja (T11). Los grupos 3 y 4 se dividieron a su vez en dos subgrupos para evaluar la intensidad (severa y moderada). Los grupos 2, 3 y 4 fueron evaluados 1 (fase aguda), 10 (fase subaguda) y 30 (fase crónica) días posteriores a la cirugía. En todos los grupos se realizaron estudios de proliferación de los linfocitos T, obtenidos de ganglios cervicales y de bazo, así mismo se evaluó la producción basal de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. La LTME disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) la proliferación de los linfocitos T obtenidos de ganglios desde la fase aguda independientemente de la localización y la intensidad de la lesión. En este mismo caso, durante la fase subaguda, no se observó ningún cambio significativo en la proliferación linfocitaria de los animales con lesión de localización alta, independientemente de la intensidad. Sin embargo, los animales con lesión baja e intensidad moderada, presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la proliferación, no así los de intensidad severa. Para la fase crónica, independientemente de la localización y de la intensidad de la lesión en todos los grupos (a excepción de los animales con lesión baja moderada) se observó una tendencia a incrementarse la proliferación pero sin alcanzar los valores de ratas no lesionadas. En lo

que respecta a los linfocitos T obtenidos de bazo, fue hasta la fase subaguda, en que los animales con lesión alta, independientemente de la intensidad, presentaron una disminución significativa de la proliferación, no así los de lesión baja. Para la fase crónica, en todos los grupos estudiados se observó una tendencia a incrementar la proliferación linfocitaria, sin embargo en los animales con lesión baja moderada fue mayor dicho incremento. Finalmente en cuanto a la producción basal de inmunoglobulinas, ninguno de los grupos estudiados presentó diferencias significativas con respecto a los animales no lesionados ( $p > 0.05$ ).

En términos generales podemos concluir que la LTME disminuye significativamente la proliferación de los linfocitos T, dicha disminución depende del órgano linfoide analizado, del tiempo de evolución (fase de la lesión), de la localización y de la intensidad de la lesión. Siendo más acentuada, durante la fase aguda (ganglio) o subaguda (bazo), cuando es de localización alta e intensidad severa. Por otra parte, la LTME no tiene ningún efecto sobre la producción basal de inmunoglobulinas por parte del linfocito B.

## INTRODUCCION

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) implica la pérdida de funciones motoras y/o sensoriales. La incidencia de morbi-mortalidad es considerablemente elevada, la causa principal son las infecciones del tracto urinario (ITU), tracto respiratorio y septicemia secundaria a las ITU (Whiteneck 1991, Sugarman 1982 a, b, DeVivo 1993, Stocker 1998). Las principales causas de la LTME son los accidentes en vehículos de motor y las caídas (Bracken 1981, Harvey 1992).

El promedio de hospitalización por lesiones medulares en Estados Unidos es de 5 por 100,000 habitantes por año (Sugarman 1982 a, b) y el promedio de decesos anuales es de 11.2% (Bracken 1981), en nuestro país al momento no existen estudios a nivel nacional sin embargo, se reporta en la zona metropolitana del Distrito Federal una incidencia de 12 por millón de habitantes (Ibarra 1990). La LTME representa un problema psicológico y socioeconómico a nivel personal y familiar, ya que se requiere de personal y tecnología altamente especializada desde el momento del accidente y hasta que el paciente es reincorporado a sus actividades productivas anteriores (Harvey 1992, Cook 1999).

La LTME no sólo se asocia con paraplejía, sino que también ocasiona disfunción somática y autónoma sobre la homeostasis esquelética, cardiopulmonar, circulatoria, genitourinaria, gastrointestinal, endocrina (Nash 1994) e inmunológica (Cruse 1992a, Cruse 1992b, Cruse 1994, Cruse 1996, Kliesch 1996, Segal 1997).

El SI representa el principal mecanismo de sobrevivencia de los pacientes con LTME, el cual al encontrarse alterado provoca que estos individuos mueran por procesos infecciosos como consecuencia de la disminución de la función del SI (Montgomery 1997). En el presente trabajo se analizará la influencia que pueden ejercer el tiempo de evolución, la intensidad y el nivel de lesión sobre la proliferación de los linfocitos T y la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B de animales con LTME.

## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES SOBRE SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) se divide en:

- 1) El sistema nervioso central (SNC) que comprende la corteza cerebral, encéfalo y médula espinal.
- 2) El sistema nervioso periférico (SNP) que funcionalmente está dividido en SN somático y SN autónomo (Testut 1997, Waxman 1997).

#### ANATOMIA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO (SNP)

El SNP Comprende dos divisiones:

- 1) SISTEMA NERVIOSO SOMATICO: comprenden fibras aferentes que conectan las terminaciones sensitivas con el SNC, y otras eferentes que conectan al SNC con el aparato efector. Abarca doce pares de nervios craneales que se originan en el encéfalo y los treinta y un pares de nervios raquídeos que se originan en la médula espinal (Williams 1992).
- 2) EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (SNA) o vegetativo comprende porciones de los SNC y SNP. Consiste en neuronas eferentes viscerales agrupadas en nervios, ganglios y plexos. Este sistema cumple únicamente funciones motoras, todos los axones autónomos son fibras eferentes. El SNA está constituido por el sistema nervioso simpático y el parasimpático.

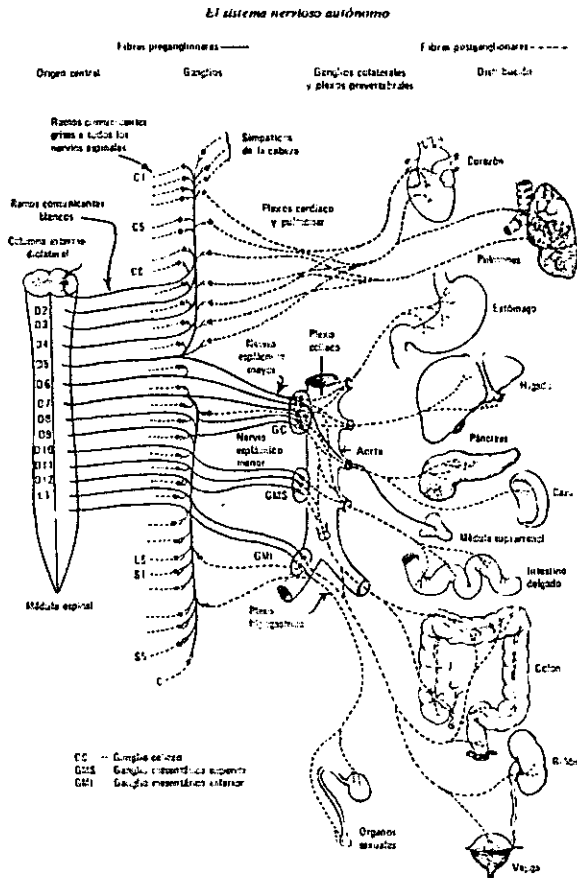
*Sistema nervioso simpático* o toracolumbar es el componente de mayor tamaño del SNA. En el humano se localiza a nivel del primer segmento torácico y hasta el cuarto segmento lumbar de la médula (T1-L4), mientras que en la rata se localiza a partir del segmento T1 y hasta el segmento L2. Su neurotransmisor es la noradrenalina. Comprende los dos troncos simpáticos ganglionares y sus ramos, plexos y ganglios subsidiarios.

La cadena simpática está conectada con la médula espinal (fig. 1). Las fibras simpáticas dejan la médula por las raíces anteriores de los nervios raquídeos. A continuación, viajan a menos de 1 cm y pasan por un nervio blanquecino pequeño, llamado *ramo blanco*, hacia la cadena simpática. Desde aquí las fibras viajan en dos direcciones. Algunas pasan hacia los nervios simpáticos viscerales que inervan los órganos internos del cuerpo, en tanto que otras vuelven por medio de otro pequeño nervio llamado *ramo gris*,

hacia la médula espinal. Estas últimas fibras viajan a continuación por todo el cuerpo para inervar todas las glándulas sudoríparas de la piel, los músculos erectores del pelo, las paredes vasculares de muchos vasos sanguíneos, el corazón, órganos linfoides, los pulmones y otras vísceras (Guyton 1987, Paxinos 1995, Williams 1992). El simpático funciona como un sistema de urgencia, en condiciones de tensión, por causas físicas o emocionales los impulsos simpáticos aumentan en gran medida hacia casi todos los efectores viscerales (Anthony 1983).

El SN simpático está formado por dos cadenas ganglionares localizadas a ambos lados de la médula espinal, sus fibras viajan a través de la cadena ganglionar paravertebral para hacer sinapsis con las neuronas posganglionares que están situadas normalmente en los ganglios paravertebrales o prevertebrales. Los axones preganglionares tienen sus cuerpos celulares en la columna lateral de la materia gris de la médula espinal y salen a través de las raíces ventrales con los axones de las neuronas somático motoras (Brading 1999).

*Sistema nervioso parasimpático o craneosacro.* Funciona como el principal regulador de muchos efectores viscerales (corazón, músculo del tubo digestivo, etc.), su neurotransmisor es la acetilcolina que estimula la secreción de jugos digestivos, insulina y la peristalsis. Sus neuronas preganglionares tienen sus cuerpos celulares en los núcleos del tallo del encéfalo o en las columnas grises laterales de la médula sacra, sus axones están conectados con los nervios craneales III (motor ocular común), VII (facial), IX (glossofaríngeo), X (vago) y XI (espinal) y en algunos nervios pélvicos. Sus neuronas posganglionares tienen sus dendritas y cuerpos celulares en los ganglios parasimpáticos más externos y envían sus axones cortos hacia las estructuras cercanas, haciendo sinapsis sólo con neuronas posganglionares que emiten ramas hacia un solo efector (Anthony 1983).



**Figura 1** Anatomía del Sistema Nervioso Simpático (Chusid 1987).

**FISIOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO**

Las fibras autónomas liberan sustancias neurotransoras en las sinapsis y en los sitios de contacto entre fibras autónomas y efectores viscerales, a los cuales se les conoce como uniones neuroefectoras (unión del músculo y células glandulares). Según la sustancia neurotransora que produzcan, a las fibras autónomas se les clasifica como

colinérgicas (liberan acetilcolina) y adrenérgicas (liberan noradrenalina). Las fibras colinérgicas incluyen a todos los axones preganglionares simpáticos y parasimpáticos. La mayoría (pero no todos) de los elementos simpáticos posganglionares son adrenérgicos. La mayoría (pero probablemente no todos) de los elementos posganglionares parasimpáticos son colinérgicos (Tortora 1984, Chusid 1987).

### ANATOMIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

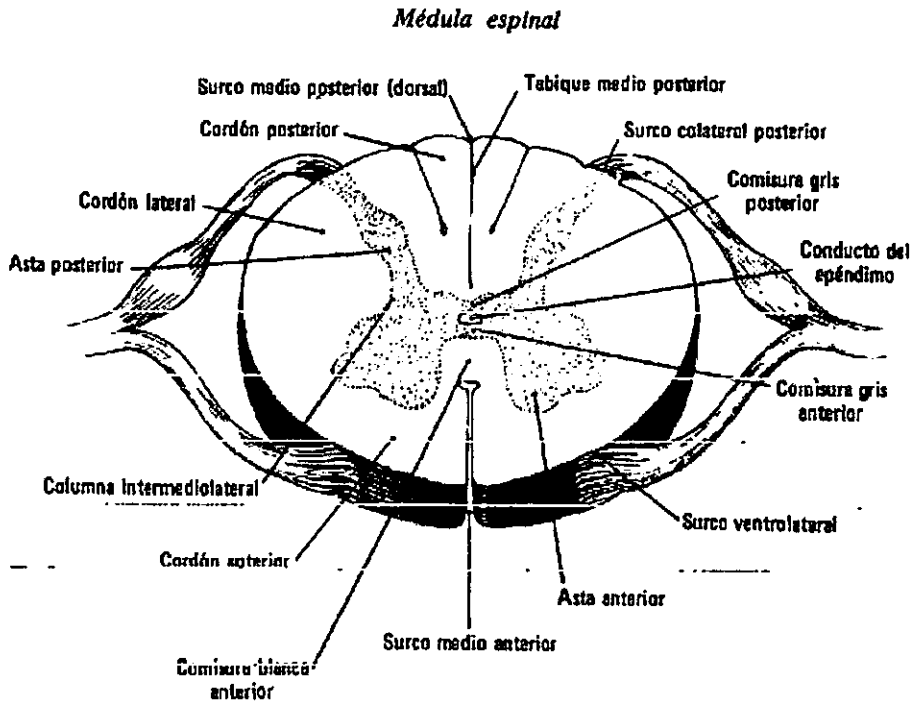
El SNC ejerce diferentes grados de control sensitivo y motor sobre la totalidad de los órganos del cuerpo. Para su estudio se divide en: corteza cerebral, encéfalo y médula espinal.

**CORTEZA CEREBRAL:** Es la división mayor y más alta del encéfalo, la fisura longitudinal, lo divide en 2 mitades denominadas hemisferios cerebrales izquierdo y derecho, éstos por la parte media están unidos por un tejido formado de sustancia blanca, llamada cuerpo calloso. Las fisuras más sobresalientes son la fisura central (de Rolando), lateral (de Silvio) y la parietooccipital. Estas dividen a su vez a cada hemisferio cerebral en cuatro lóbulos, cada uno de los cuales recibe el nombre del hueso que se encuentra por encima: lóbulo frontal, parietal, temporal y occipital. La corteza cerebral cumple funciones sensitivas (comparación, evaluación e integración de las sensaciones para formar percepciones totales), motoras (control de los movimientos voluntarios) y de integración como son el sueño, vigilia, memoria y lenguaje (Anthony 1983).

**ENCEFALO:** Se encuentra totalmente dentro de la cavidad craneal, está formado por: rombencéfalo (encéfalo inferior), mesencéfalo (encéfalo medio) y prosencéfalo (encéfalo anterior), todas estas estructuras constituyen el tallo cerebral. El rombencéfalo comprende el bulbo raquídeo, la protuberancia anular y cerebelo. El prosencéfalo está dividido en diencefalo y telencefalo. Por lo común se le considera el órgano únicamente relacionado con el pensamiento, memoria y la conciencia. También se relaciona con todas las formas de actividad motora, con la regulación de las funciones viscerales, endocrinas y somáticas, y con el empleo receptivo y expresivo de los símbolos y signos que sustentan la comunicación (Carpenter 1994).

**MEDULA ESPINAL:** es la parte más caudal, se encuentra alojada en el canal vertebral o conducto raquídeo, en la parte central está ocupada por la sustancia gris espinal, rodeada por la sustancia blanca, ventralmente destaca la fisura mediana y dorsalmente la continuación glial del surco medio posterior o tabique medio posterior (fig. 2). La sustancia gris une dos extensas masas de sustancia gris de cada lado, las extensiones

superiores son los cuernos ventrales y las posteriores los cuernos dorsales. Estos se unen por una extensión lateral de la comisura gris a la que se denomina sustancia gris intermedia lateral.



**Figura 2** Anatomía de la médula espinal (Chusid 1987).

La *sustancia gris* tiene forma de letra H o de mariposa, contiene los cuerpos de las neuronas espinales y se divide en núcleos o láminas, en la sustancia gris intermedia lateral se encuentran situadas las neuronas viscerales tanto motoras como sensitivas.

La *sustancia blanca* se divide en cordones anteriores laterales y posteriores, gracias a la presencia de fisuras de las raíces ventrales y dorsales que penetran o salen de la médula



(Valadez 1998). Los tractos que componen los cordones laterales y anteriores son ascendentes y descendentes. Los ascendentes tienen su origen en células de la sustancia gris medular; los tractos descendentes largos provienen de los núcleos del tronco del encéfalo y de la corteza cerebelosa (Carpenter 1994).

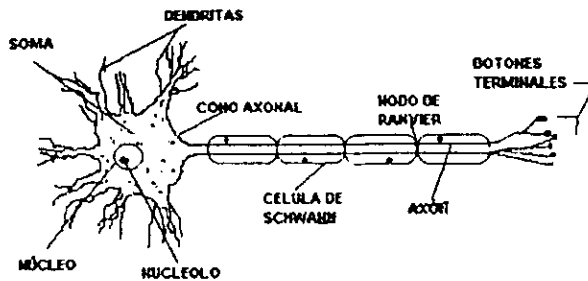
Aunque la médula espinal constituye sólo el 2 % del SNC, sus funciones tienen una gran importancia ya que comprenden: vías aferentes que conducen impulsos sensoriales de la mayor parte del cuerpo, vías descendentes que median la función motora voluntaria y modifican el tono muscular y, sistemas de fibras y neuronas que median los reflejos segmentarios y suministran inervación autónoma (Carpenter 1994).

### HISTOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El tejido nervioso es uno de los cuatro tejidos fundamentales y de ellos, el de mayor grado de especialización. Como todo tejido está compuesto por células, un espacio intercelular ocupado por líquidos y sustancias disueltas en él, tales como iones, neurotransmisores, enzimas, etc.

Las células del tejido nervioso son de dos tipos básicos: las neuronas y células gliales.

**NEURONA:** es la unidad genética, anatómica y funcional del sistema nervioso, es incapaz de reproducirse, su conductibilidad y excitabilidad están altamente desarrolladas. Está formada por 3 regiones distintas: 1) el cuerpo celular es el centro metabólico de la neurona, contiene todos los organelos, 2) dendritas se originan del cuerpo celular y son finas arborizaciones que constituyen el aparato de la neurona, que recoge la información procedente de las otras neuronas, 3) axón es una prolongación única que también se origina del cuerpo celular, suministra el paso para las moléculas fabricadas en el núcleo y transportadas a lo largo del axón hasta su terminación (fig. 3), representan las fibras nerviosas las cuales pueden ser mielínicas o amielínicas, la mielina desempeña un papel fundamental en la rapidez de conducción del impulso nervioso, esto depende de la presencia de estrechamientos periódicos de la vaina de mielina: los nódulos de Ranvier (Habib 1994, Valadez 1998).



**Figura 3** Estructura básica de una neurona (Kibiuk L. En [www.sfn.org/backgrounders/communication.html](http://www.sfn.org/backgrounders/communication.html)).

**CELULAS GLIALES:** Son pequeñas células redondeadas diseminadas por todo el SNC, sin capacidad para generar impulsos nerviosos, se distinguen dos tipos: 1) la macroglia que está representada por los astrocitos y los oligodendrocitos. Los astrocitos tienen un papel nutritivo, metabólico y de sostén, los oligodendrocitos tienen como función producir la mielina que recubre los axones centrales y 2) la microglia o fagocitos, desempeñan un papel de defensa inmunitaria. También hay células gliales en el parénquima del encéfalo y médula espinal, y células ependimales que recubren sus cavidades. En los ganglios de las raíces nerviosas y del SNA hay células capsulares que rodean los cuerpos celulares; periféricamente las células de Schwann revisten el axón, las células terminales rodean las cápsulas sensoriales, las células telogliales rodean las terminales motoras y las células de soporte sostienen la estructura de los epitelios sensoriales (Habib 1994, Valadez 1998, Williams 1992).

## FISIOLOGIA DEL SNC

**POTENCIAL DE ACCION:** Las neuronas se caracterizan por su capacidad para recibir, conducir y transmitir información, la cual está codificada por cambios electroquímicos transitorios en su membrana plasmática. El elemento base de la transmisión de información a la neurona es un breve impulso eléctrico denominado potencial de acción, que atraviesa el axón. Es una modificación momentánea del potencial de membrana que aparece cuando la membrana llega súbitamente a ser permeable a los iones sodio y después a los iones potasio. El proceso que origina el potencial de acción se denomina *despolarización* y corresponde a la transición en el interior de la neurona de una carga negativa de -70 mV a una carga positiva de +50 mV. Por el contrario un aumento del potencial de reposo provoca una *hiperpolarización* la cual disminuye la capacidad de una célula para generar un potencial de acción (Valadez 1998, Williams 1992).

**SINAPSIS:** Es el lugar de conexión entre dos neuronas, aquí se efectúa la transmisión de la información de una neurona a otra. Existen dos tipos: eléctricas para las cuales la transmisión implica un proceso solamente eléctrico, y químicas, en las que interviene la secreción y liberación de sustancias químicas necesarias para la transmisión de la información. En la sinapsis el potencial de acción se propaga a lo largo del axón, cuando alcanza el extremo terminal, se inicia una entrada masiva de calcio. En el lado postsináptico se fija a su receptor el transmisor provocando una modificación de la permeabilidad de la membrana postsináptica lo cual provoca la abertura de los canales de sodio ocasionando una despolarización postsináptica llamada "potencial postsináptico excitatorio", si éste alcanza el umbral se desencadena un potencial de acción que a continuación se propagará por todo el elemento postsináptico, a partir de este momento tiene lugar la transmisión. Por último el transmisor se separa de su receptor y puede ser degradado enzimáticamente o recaptado e integrado en nuevas vesículas (Habib 1994).

## GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA INMUNOLOGICO

El sistema inmunológico (SI) es el encargado de defender al organismo de agentes invasores, está formado por los órganos linfoides y una serie de células y moléculas responsables de la inmunidad.

### ORGANOS LINFOIDES

Con el fin de optimizar las interacciones celulares para las fases de la respuesta inmunitaria específica, la mayoría de las células de SI se localizan y concentran en órganos o tejidos anatómicamente definidos que son los lugares donde se transportan y concentran los antígenos.

Los tejidos linfoides se clasifican en dos grupos:

Organos generadores o tejido linfoide primario: son los tejidos en los que los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional. Entre éstos se incluyen la médula ósea y el timo.

Organos periféricos o tejido linfoide secundario: es donde se inicia y desarrolla la respuesta de los linfocitos a los antígenos y, son los ganglios linfáticos y bazo.

**MEDULA OSEA:** Es un tejido blando que se encuentra en las cavidades medulares cilíndricas y las trabéculas de los huesos largos. Su composición difiere en los distintos huesos y en las diferentes edades, y se encuentra en dos formas: la médula amarilla constituida por una base de tejido conectivo, que contiene numerosos vasos sanguíneos y células, la mayoría son adipocitos y la médula roja que está constituida por un entramado de tejido conectivo reticular y está constituida por una variedad de células sanguíneas y sus precursores y algunos adipocitos. Aquí se originan todas las células sanguíneas a partir de una célula madre, la proliferación y maduración de las células (hematopoyesis) es estimulada por citoquinas. La maduración de los linfocitos T ocurre en timo y no en la médula ósea (Ham 1985, Williams 1992, Abbas 1999).

**EL TIMO:** Localizado en el mediastino, se extiende por el cuello hasta el borde inferior de la glándula tiroidea y por debajo hasta el cartílago costal. Es un órgano bilobulado que se divide en pequeños lobulillos mediante septos fibrosos. Cada uno consta de una corteza celular densa y una médula interior, menos densa. Ambas partes se componen de linfocitos dispuestos en una pequeña red epitelial diferente del tejido conjuntivo de sostén que se observa en otros órganos linfoides (Anthony 1983). Las células inmaduras migran de la corteza a la médula y se ponen en contacto con células epiteliales, macrófagos y

células dendríticas (Abbas 1999). Sus funciones principales son: es una fuente de linfocitos antes del nacimiento, maduración de los linfocitos T (Anthony 1983).

**GANGLIOS LINFÁTICOS:** Son estructuras ovaladas de diferente tamaño. Se disponen en grupos o acúmulos en determinadas áreas. Los de mayor importancia son: los ganglios submentonarios, cervicales, axilares e inguinales. Cada ganglio está formado por una corteza externa que tiene agregados de células (folículos), algunos de los cuales tienen un área central llamada centro germinal y una médula formada principalmente por linfocitos y fagocitos mononucleares. De no ser en otros sitios (p. ej. en la circulación) es precisamente en los ganglios, donde se lleva a cabo la fagocitosis. Así mismo es el lugar donde son transportadas y concentradas las proteínas antigénicas de la linfa, y donde se puede iniciar y desarrollar la respuesta inmunitaria frente a esos antígenos (Anthony 1983, Abbas 1999).

**EL BAZO:** Situado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, irrigado por una única arteria esplénica que perfora la cápsula y se divide progresivamente en ramas pequeñas que permanecen rodeadas por una trabécula fibrosa que sirve de soporte y protección. Las pequeñas arteriolas se hallan envueltas por una capa de linfocitos llamada vaina linfóide periarteriolar que tiene folículos linfoides algunos con centros germinales. Tiene una pulpa blanca formada por tejido linfóide denso de las vainas periarteriolares y folículos y, la pulpa roja por grandes cantidades de eritrocitos, macrófagos, células dendríticas y escasos linfocitos. El bazo es un filtro para la sangre; los macrófagos de la pulpa roja limpian la sangre de sustancias extrañas indeseables y eritrocitos viejos, incluso en ausencia de inmunidad específica (Abbas 1999).

### INERVACION DE LOS ORGANOS LINFOIDES

Tanto los órganos linfoides primarios como los secundarios reciben inervación simpática postganglionar noradrenérgica. Los cuerpos celulares preganglionares están localizados en la columna celular intermediolateral de la médula espinal torácica y lumbar. Sus axones inervan ganglios en la cadena simpática o en los plexos prevertebrales asociados con los grandes vasos. La distribución en el parénquima de las fibras parece dirigirse más enfáticamente hacia zonas de los linfocitos T y macrófagos, así como a regiones nodulares y foliculares de los linfocitos B (Felten 1985, 1987, Madden 1995, Kohm 1999). En seguida se describirá brevemente la inervación de los órganos linfoides primarios y secundarios.

**MEDULA OSEA:** Algunas fibras noradrenérgicas (NA) muy finas entran con el sistema arteriolar, mientras que los plexos de fibras permanecen con la vasculatura, algunas ramas irradian al parénquima y terminan entre las células hematopoyéticas (Felten 1985, 1987, Madden 1995).

**TIMO:** Las fibras NA entran con los grandes vasos y rodean el plexo nervioso, estas fibras están distribuidas casi exclusivamente en la corteza tímica. Existen dos zonas de la corteza que reciben una densa inervación: la zona más externa, compuesta principalmente por tímocitos inmaduros, y la vasculatura de la unión cortico-medular. A través de la corteza, un grupo de fibras se extiende desde el plexo vascular nervioso hasta el parénquima (Felten 1985, 1987, Madden 1995, Ghoshal 1998).

**GANGLIOS LINFATICOS:** En las ratas y los ratones hay inervación NA en compartimentos específicos de los ganglios linfáticos cervicales, poplíteos y mesentéricos. Las fibras simpáticas postganglionares entran a través del hillus y se distribuyen al cordón medular y sistema capsular/subcapsular. Las fibras se extienden desde los pequeños plexos asociados con los vasos sanguíneos hasta las regiones de los linfocitos T en las zonas cortical y paracortical (Lockhart 1965, Felten 1985, 1987, Madden 1995, Ghoshal 1998, Panuncio 1999).

**BAZO:** Se han encontrado fibras NA en el bazo de muchos animales incluyendo la rata y el ratón. Se ha demostrado que hay abundantes fibras NA en la vasculatura de la pulpa blanca y que terminan en el parénquima. Las fibras NA viajan con la arteria esplénica, la cual contiene el 97% de axones simpáticos postganglionares y entran al hillus del bazo. La pulpa roja tiene fibras nerviosas que constituyen menos del 1% de la inervación NA. Frecuentemente hay pequeñas fibras nerviosas dentro de los folículos, y están asociados con pequeños acúmulos de linfocitos T (Lockhart 1965, Felten 1985, 1987, Madden 1995).

### *HISTOLOGIA DEL SISTEMA INMUNOLOGICO*

Las células del SI en condiciones normales están presentes como células circulantes en la sangre y en la linfa, formando grupos definidos anatómicamente en los órganos linfoides y como células dispersas en casi todos los tejidos, excepto en el SNC.

Los linfocitos son las células que específicamente reconocen y responden a un antígeno. Sin embargo en otras fases de la respuesta inmunitaria (efectora y de activación) intervienen otras células no linfoides llamadas células accesorias.

**LINFOCITOS:** Células con núcleo grande, se originan en la médula ósea a partir de una célula madre linfoide (fig. 4) y adquieren sus receptores conforme van madurando. Son mediadores de la respuesta inmunitaria específica, son las únicas células capaces de reconocer específicamente y distinguir diferentes determinantes antigénicos.

Existen dos clases funcionales dependiendo de sus receptores y de la estimulación antigénica.

*Linfocito B* sus primeras fases de maduración tienen lugar en la médula ósea, son las únicas células capaces de producir anticuerpos.

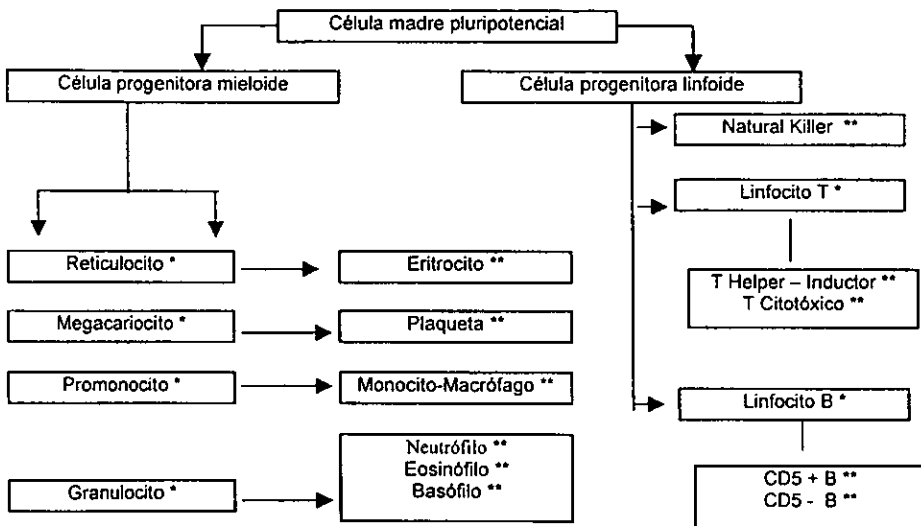
*Linfocito T* sus precursores se originan en la médula ósea y luego migran y maduran en el timo, se subdividen en dos poblaciones: linfocitos T CD4 o colaboradores y linfocitos T CD8 o citotóxicos. Existe un tercer grupo de células consideradas dentro de la familia linfoide, son muy semejantes a los linfocitos y se denominan células NK (Natural Killer) que son capaces de lisar células tumorales o infectadas por virus sin una estimulación antigénica clara (Abbas 1999).

**FAGOCITOS MONONUCLEARES:** es la segunda población importante del SI. Se originan y maduran en médula ósea a partir de una célula madre mieloide (fig. 4), cuando pasan a sangre se llaman monocitos. Una vez que éstos colonizan tejidos se llama macrófago o histiocito y recibe nombres específicos dependiendo del tejido (microglia en SNC, célula de Kupffer en hígado etc). Su función principal es la fagocitosis, presentación de antígeno, y la producción de citoquinas para atraer células inflamatorias (Abbas 1999).

**CELULAS DENDRITICAS:** Son células accesorias que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria. Existen dos tipos; las células dendríticas interdigitantes, se localizan en zonas ricas en células T de los ganglios linfáticos y bazo, son eficientes en la presentación de antígenos proteicos a los linfocitos T colaboradores, y las células dendríticas foliculares localizadas en el centro germinal de los folículos linfoides de los ganglios linfáticos y bazo, éstos atrapan antígenos unidos a anticuerpos o productos del complemento y lo expresan en su superficie para que sean reconocidos por los linfocitos B (Abbas 1999).

**GRANULOCITOS:** Estas células se originan en médula ósea a partir de una célula progenitora mieloide (fig. 4) y en sangre periférica hay 3 tipos, identificados básicamente por las características de tinción de sus gránulos: neutrófilo o polimorfonuclear (PMN), responde rápidamente a estímulos quimiotácticos, fagocitan y pueden ser activados por citoquinas producidas por macrófagos y células endoteliales y actúan como células

efectoras de la inmunidad humoral. Poseen receptores para IgG y proteínas del complemento. Los basófilos son células circulantes derivadas de la médula ósea, tienen gránulos citoplásmicos ricos en histamina y receptores para IgE; generalmente se supone que los basófilos participan en las reacciones mediadas por IgE, su importancia en la inmunidad e hipersensibilidad aún no se comprueba. Los eosinófilos derivan también de la médula ósea su producción aumenta en casos de infestación por helmintos, tienen receptores de baja afinidad para la IgE, pueden degranularse en reacción a células diana grandes no fagocitables (Roitt 1994, Stites 1994, Abbas 1999).



**Figura 4** Maduración de las células sanguíneas (hematopoyesis) \* Progenitores especializados, \*\* Progenie diferenciada (Roitt 1994).



## RESPUESTA INMUNE

La inmunidad es la reacción a sustancias extrañas (macro y microorganismos) sin que dicha reacción tenga repercusión fisiológica o patológica y la respuesta inmunitaria es la respuesta global y coordinada tras la introducción de sustancias extrañas. Los individuos sanos se encuentran protegidos contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos:

**INMUNIDAD INNATA** (natural o nativa): representa la primera línea defensiva contra los microorganismos. Sus elementos esenciales son: barreras físicas y químicas (epitelio, piel, defensinas, etc.), proteínas sanguíneas (proteínas del complemento y mediadores de la inflamación), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y otros leucocitos (células NK).

**INMUNIDAD ESPECIFICA** (adaptativa): Es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado que la inmunidad innata, es estimulado tras la exposición a agentes infecciosos y cuya intensidad y capacidad defensiva aumenta después de la posterior exposición a un determinado microorganismo. Sus principales características son: es específica, origina memoria inmunológica, es transferible, es inducible, tiene autolimitación, especialización, diversidad, y es capaz de discriminar lo propio de lo no propio.

### *TIPOS DE INMUNIDAD ESPECIFICA*

*Inmunidad activa*: genera respuesta inmunológica después de la exposición de un individuo a un antígeno (todo aquello capaz de inducir una respuesta inmunológica específica).

*Inmunidad pasiva*: se da por transferencia de células o suero de individuos previamente inmunizados a otros que nunca hayan sido sensibilizados con ese antígeno.

La inmunidad específica también se puede clasificar en dos tipos, dependiendo de los componentes del SI que participa en la respuesta.

*Inmunidad humoral*: participan los anticuerpos (Ab).

*Inmunidad celular o mediada por células*: participan los linfocitos T.

### *FASES DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA*

La eliminación de los antígenos se lleva a cabo mediante una serie de mecanismos en cascada. El reconocimiento de un antígeno es el punto clave de la respuesta inmune adaptativa (Roitt 1994)

**RECONOCIMIENTO:** Las células T sólo reconocen antígenos sobre la superficie de células accesorias en asociación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), para ello la célula presentadora de antígeno (CPA) internaliza las proteínas extracelulares en los endosomas, estas proteínas sufren proteólisis, mientras que en el retículo endoplasmico (RE) se sintetizan las moléculas del MHC clase II y se asocian a una cadena invariable, este complejo es transportado del RE a las vesículas endosómicas donde la cadena invariable sufre proteólisis dejando libre a las moléculas del MHC clase II y éstas son capaces de unirse a las proteínas extracelulares ya procesadas, posteriormente el complejo proteína extracelular-molécula del MHC clase II se traslada hacia la superficie de la CPA en donde el reconocimiento de este complejo por los linfocitos T CD4 ocasiona su activación (Abbas 1999).

**ACTIVACION:** La interacción entre un linfocito en reposo y un antígeno desencadena una serie de acontecimientos bioquímicos tempranos, que conducen a la formación de segundos mensajeros en el seno de la célula B o T. Estos mensajeros inducen cambios a nivel del DNA celular. Una vez que se ha llevado a cabo la interacción, en primera instancia, se activa la tirosinacinasasa ZAP-70 que a su vez activa a la fosfolipasa C gamma-1 (PC $\gamma$ 1) misma que es la responsable de hidrolizar a nivel membranal al fosfatidilinositol, reacción que genera dos mensajeros secundarios: el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y el diacilglicerol (DAG). El IP3 provoca la liberación de calcio almacenado en el interior de la célula, mientras que el DAG activa la protein cinasa C. Junto con otras cinasas, la protein cinasa C fosforila una serie de moléculas de superficie, lo que provoca la activación de determinados genes. Como consecuencia de estas reacciones de activación, las células linfoides expresan en su membrana receptores de varias citoquinas, por ejemplo, el receptor para IL-2. La interacción de estas citoquinas con su receptor específico determina la proliferación y diferenciación de los linfocitos (Roitt 1994, Abbas 1999).

**EFFECTORA:** es el estadio en el que los linfocitos que han sido activados por los antígenos, desarrollan las funciones que conducen a la eliminación de éstos. Los linfocitos T CD8 que han sido activados destruyen al antígeno mediante un proceso de lisis, mientras que los linfocitos T CD4 van a secretar mediadores solubles denominados citoquinas y que en conjunto modulan la respuesta inmune, p. ej. la IL-14 ocasiona la proliferación y diferenciación de los linfocitos B mientras que la IL-8 es un quimiotáctico

de los neutrófilos, linfocitos y basófilos, siendo todas estas células necesarias para tener una buena respuesta inmune (Moreno 1996, Abbas 1999).

Los linfocitos B son los responsables de la función de reconocimiento y efectora de la respuesta inmune humoral, la cual está caracterizada por su capacidad para responder a distintos antígenos produciendo diversas clases de anticuerpos. Su activación requiere de la interacción entre linfocito T y B mediante sus receptores específicos y la participación de moléculas llamadas coestimuladores y la posterior estimulación por citoquinas producidas por los linfocitos T. El contacto entre el antígeno y la célula B ocasiona que esta se desarrolle y diferencie en célula plasmática que es la única capaz de producir anticuerpos. En la mayoría de los mamíferos superiores se han identificado cinco clases diferentes de Ig, de las cuales, en el humano la IgG constituye el 70-75 % de las Igs totales, la IgM el 10 %, la IgA el 15-20 %, la IgD menos del 1% y la IgE se encuentra en muy poca cantidad en el suero (Roitt 1994), mientras que en la rata la IgG constituye el 96%, la Ig M el 3%, la IgA, IgE y la IgD en conjunto menos del 1% de las Igs totales (Carter 1980).

### MECANISMOS DE ACTIVACION LINFOCITARIA

Los linfocitos son las principales células de la respuesta inmune específica, su activación da lugar a procesos parcialmente competitivos: proliferación celular y diferenciación en células efectoras. Existen diferentes mecanismos de activación de los linfocitos entre los cuales se mencionan:

1) ACTIVACION ANTIGENO-ESPECIFICA: Tanto los linfocitos T como los B se activan al unirse con sus antígenos específicos. Los linfocitos T necesitan reconocer al antígeno asociado a las moléculas del MHC expresadas por CPAs, mientras que los linfocitos B pueden unirse a los antígenos libres, aunque generalmente necesitan de la participación de los linfocitos T para activarse (Roitt 1994).

2) ACTIVACION INESPECIFICA: Los mitógenos son una clase de moléculas que pueden activar de manera inespecífica los linfocitos T o B. Son útiles para estudiar la función del linfocito mediante su activación y proliferación inducida *in vitro* en forma inespecífica. Los mitógenos son lectinas, es decir, proteínas de origen vegetal y bacteriano, capaces de unirse a los carbohidratos. Algunas de ellas activan los linfocitos B mediante entrecruzamiento de sus receptores (BCR) y los linfocitos T se activan por la unión del mitógeno con carbohidratos membranales, se cree que la estimulación por estos agentes es semejante a lo que ocurre *in vivo*. Los linfocitos T humanos y murinos son activados

por la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con A), por otra parte, el lipopolisacárido (LPS) estimula los linfocitos B murinos, mientras que el mitógeno de hierba carmín "pokweed" estimula los linfocitos T y B murinos (Roitt 1994).

Otro grupo de moléculas que activan inespecíficamente las células T son los "Superantígenos", la mayoría de los cuales tienen origen bacteriano. Entre ellos se encuentran las enterotoxinas estafilocócicas, la toxina del síndrome del shock tóxico, toxina de la dermatitis exfoliativa y algunas proteínas víricas. Los superantígenos se unen a las moléculas del MHC clase II localizadas en la membrana de las CPAs, de esta manera interactúan con el TCR de los linfocitos T, específicamente con la región V $\beta$  de este receptor (Roitt 1994).

Actualmente se sabe que existe una gran interacción entre el SNC y SI. Como consecuencia de esto, una lesión al SNC puede originar alteraciones en la función del SI. La lesión traumática de la médula espinal puede entonces originar alteraciones en la función inmunológica. A continuación hablaremos en general de las características de la lesión medular y sus implicaciones sobre el SI.

## GENERALIDADES DE LA LESION TRAUMATICA DE LA MEDULA ESPINAL

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es uno de los padecimientos más serios experimentados por el hombre. Provoca deficiencia sensorial o motora, y pérdida del control de esfínteres que puede ser temporal o permanente. Las lesiones que ocurren a nivel cervical se caracterizan por dejar al individuo tetraplégico, es decir sin movimiento en las extremidades tanto inferiores como superiores y, cuando ocurre a nivel torácico, lumbar o sacro resulta en una paraplejía (inmovilidad de las extremidades inferiores). La LTME que causa pérdida total de la función motora y sensorial por debajo de la zona de lesión se considera " lesión completa " y si afecta alguna función motora y/o sensorial se llama " lesión incompleta" (Price 1994).

El impacto socioeconómico personal y familiar es elevado. El manejo integral de la LTME es muy complejo, requiere de la intervención de un grupo multidisciplinario, así como de tecnología especializada, desde el momento del accidente y hasta que el individuo es rehabilitado. Se ha estimado que los gastos en promedio (en dólares) son de \$95,203 para hospitalización inicial, \$7,866 por servicios médicos y equipo de adaptación, \$ 8,208 para modificaciones al hogar y \$6,296 para asistencia personal, los gastos pueden variar

dependiendo de la severidad de la lesión (Harvey 1992). En Estados Unidos se ha estimado que los costos por lesión a las unidades de cuidados médicos ascienden a \$2.3 billones de dólares en promedio de vida (Cook 1999).

De acuerdo a diferentes estudios epidemiológicos las principales causas de la LTME son los accidentes en vehículos de motor y las caídas, la población más afectada es la de personas entre los 15 y 45 años de edad con un marcado predominio en los hombres, casados y de raza blanca. (Bracken 1981, Harvey 1992). Sin embargo, las lesiones provocadas por disparo de arma de fuego son más frecuentes en jóvenes solteros y desempleados (Mckinley 1999). El promedio de hospitalización por lesiones medulares agudas en Estados Unidos es de 5 por 100,000 habitantes por año (Sugarman 1982 a, b) y el promedio de decesos es de 11.2% por año (Bracken 1981). En nuestro país, específicamente en el Distrito Federal se reporta una incidencia de 12 por millón de habitantes (Ibarra 1990) y en un estudio más reciente en la misma zona se reporta una incidencia de 9 por cada millón de habitantes (Grijalva 1995).

La causa principal de morbilidad y mortalidad son las infecciones del tracto urinario (ITU), tracto respiratorio y septicemia secundaria a las ITU (Whiteneck 1991, Sugarman 1982 a, b, DeVivo 1993, Montgomerie 1997, Berrouane 1998, Mckinley 1999). En la actualidad el índice de mortalidad ha aumentado hasta en un 10%, debido a los problemas psicológicos que la LME origina (Fish 1997).

### FISIOPATOLOGIA DE LA LESION TRAUMATICA EN MEDULA ESPINAL.

Se ha establecido que existen dos mecanismos de daño a la médula espinal después de haber ocurrido una LTME:

A) LESION PRIMARIA. Varía de acuerdo al tipo e intensidad del mecanismo de lesión. Se caracteriza por daño mecánico en las membranas de las células nerviosas (neuronas y gliales).

B) LESION SECUNDARIA. Comprende los cambios que se presentan debido a uno o más procesos iniciados después de la lesión primaria y que se dan con el transcurso del tiempo. Básicamente son la consecuencia de varios mecanismos autodestructivos entre los cuales se puede incluir la isquemia que posteriormente puede llevar al paciente a un infarto (Tator 1995). Secundario a este fenómeno también se pueden observar cambios bioquímicos fundamentales en la fisiopatología de la LTME, caracterizados por el aumento en los niveles de aminoácidos neurotóxicos como el aspartato y glutamato (De la Torre 1981, Faden 1988, Panter 1990, Tator 1991, 1995), acumulación de

catecolaminas, liberación de ácido araquidónico y síntesis de eicosanoides, presencia de opiodes endógenos (Tator 1995), lipoperoxidación (Hall 1994), producción de citocinas (Giulian 1990), además hay un marcado intercambio de electrolitos en los que se observa incremento de calcio y sodio intracelular y potasio extracelular manifestándose como edema celular (Tator 1991, 1995, Young 1982, Amar 1999). Todo esto lleva a la disminución en la transmisión de los impulsos eléctricos e incluso a la muerte celular (Tator 1995).

Así mismo ocurren varios cambios a nivel sistémico los cuales comprenden principalmente shock neurogénico caracterizado por el aumento temporal de los niveles de catecolaminas, presión sanguínea y velocidad del corazón, además de una resistencia periférica y capacidad cardiaca disminuida (Tator 1991, 1995).

Además de estos cambios también se ha observado una alteración en la función del sistema Inmunológico misma que participa importantemente en la susceptibilidad de estos pacientes a diferentes tipos de infecciones las cuales en ocasiones pueden incluso originar la muerte del paciente (Montgomerie 1997).

#### FUNCION DEL SISTEMA INMUNOLOGICO DESPUES DE UNA LESION TRAUMATICA DE LA MEDULA ESPINAL

La interacción entre las diferentes vías de comunicación del sistema nervioso, endocrino e inmune facilita la inmunorregulación fisiológica. Algunos factores externos pueden romper esas vías de comunicación provocando una alteración del sistema inmune (Cruse 1992, 1996, Madden 1995, Kliesch 1996, Segal 1997, Befus 1999, Campagnolo 1999, Cruse 2000 ). La presencia de fibras nerviosas en tejido linfoide sugiere una unión estructural potencial entre el SNC y el sistema inmunológico (Besedovsky 1979, Felten 1985, Felten 1987, Chamber 1993, Yanguo 1994, Douglas 1995, Callahan 1998, Ghoshal 1998, Tang 1999). La inervación noradrenérgica influye sobre los linfocitos y particularmente sobre los linfocitos T (Felten 1985, Felten 1987, Madden 1995, Cavallotti 1999, Panuncio 1999). Algunos experimentos permiten establecer que tras una simpatectomía química hay un incremento en la síntesis de DNA de los linfocitos T y B (Madden 1989), por lo tanto aumenta la proliferación celular pero la migración se ve alterada por la disminución en la expresión de moléculas de adhesión (Madden 1994 a); también se ha encontrado que las alteraciones inducidas por la simpatectomía no siempre

se correlacionan con cambios en una población específica de las células T (Madden 1994 b).

Los efectos de la LTME originan disfunción somática y autónoma sobre la homeostasis esquelética, cardiopulmonar, circulatoria, genitourinaria, gastrointestinal, endocrina (Besedovsky 1979, Nash 1994) e inmunológica, de hecho se sabe que después de una LTME se origina una disminución de la función del sistema inmune (Cruse 1992a, Cruse 1992b, Cruse 1994, Cruse 1996, Kliesch 1996, Campagnolo 1997, Segal 1997, Cruse 2000). Dicha disminución ha tratado de ser explicada por: (1) interrupción del flujo de las señales del sistema nervioso simpático a los tejidos linfoides y sus vasos sanguíneos así como del regreso de las señales aferentes de esos tejidos al cerebro. (2) inmunosupresión causada por corticosteroides, catecolaminas y endorfinas producidas como respuesta al estrés que padece este tipo de paciente. (3) interrupción del regreso de las señales al SNC de la periferia ocasionando por la LTME que puede reducir la facilitación de las neuronas inmunorregulatorias del SNC y por lo tanto disminuye su actividad y (4) una combinación de los 3 mecanismos (Cruse 1996). Sin embargo aún se encuentra en estudio el origen de dicha alteración.

Los pacientes con LTME presentan un alto riesgo de morbilidad y mortalidad por infecciones. Esto se debe en parte a la disminución significativa de la respuesta inmune natural (células NK) y adaptativa (linfocitos T), así como a los niveles reducidos de moléculas de adhesión celular (CAMs) (Cruse 1992a, Cruse 1992b, Cruse 1996, Kliesch 1996, Campagnolo 1997, Segal 1997, Kokkier 1998, Okada 1999) las cuales juegan un papel crítico en el movimiento, proliferación y diferenciación celular, es decir son indispensables en la respuesta inmune (Cruse 1996); también se ha observado una disminución de la proliferación de los linfocitos T a mitógenos, de la actividad citotóxica de las células NK a pesar de que el número de estas células sea normal. Finalmente también se ha demostrado un desequilibrio de la relación cooperador : supresor de los linfocitos T (Campagnolo 1994). Aunque la LTME esta asociada con una elevación en la cuenta de leucocitos, la función de dichas células se encuentra muy disminuida. Además la cuenta regresa al límite normal después de 3 semanas de haber ocurrido la lesión (Travlos 1994, Woiciechowsky 1999).

La alteración inmunológica varía dependiendo del nivel al que ocurre el trauma (Nash 1994) ya que la alteración es mayor cuando ocurre a nivel alto (cervical) que cuando es a nivel bajo (torácico) (Campagnolo 1994, 1997, Kliesch 1996).

## JUSTIFICACION

Después de una LTME se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos que resultan en una alteración de la homeostasis del organismo. Entre las alteraciones más importantes destaca la disminución en la función del SI. Esta alteración origina una alta incidencia de problemas infecciosos en los pacientes con LTME. Hasta el momento no se ha estudiado en forma sistemática el efecto de la LTME sobre la función del SI, se desconoce la influencia que puedan tener el tiempo de evolución, la intensidad y la localización de la lesión sobre la función del SI, en particular de los linfocitos. Es por ello que en este trabajo se evaluarán sistemáticamente todos estos parámetros en animales con LTME para conocer con mejor detalle su influencia sobre la función linfocitaria.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿La fase de la lesión (aguda, subaguda y crónica), tendrá algún efecto sobre la función linfocitaria?
2. ¿La localización de la lesión (alta (torácica 1) o baja (torácica 11)), tendrá algún efecto sobre la función linfocitaria?
3. ¿La intensidad de la lesión (moderada o severa), tendrá algún efecto sobre la función linfocitaria?



## **HIPOTESIS**

1. La función linfocitaria será menor durante las fases aguda y subaguda en comparación con la fase crónica de la LTME.
2. Mientras más cefálica sea la localización de la LTME, será menor la función linfocitaria.
3. Mientras más severa sea la intensidad de la LTME, será menor la función linfocitaria.

## **OBJETIVOS**

1. Evaluar y comparar el efecto del tiempo de evolución (fase: aguda subaguda y crónica) de la LTME sobre la función linfocitaria.
2. Evaluar y comparar el efecto de la localización (torácica alta y torácica baja) de la LTME sobre la función linfocitaria.
3. Evaluar y comparar el efecto de la intensidad (moderada y severa) de la LTME sobre la función linfocitaria.

## MATERIAL Y METODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un total de 106 ratas adultas de la cepa Fischer 344, de 180 a 250 g de peso; mismas que fueron divididas en cuatro grupos como sigue:

Grupo 1. Ratas sin procedimiento quirúrgico (PQ) (n=8).

Grupo 2. Ratas con PQ pero sin LTME (n=25).

Grupo 3. Ratas con LTME de localización alta (T1), (n=38).

Grupo 4. Ratas con LTME de localización baja (T11), (n=35).

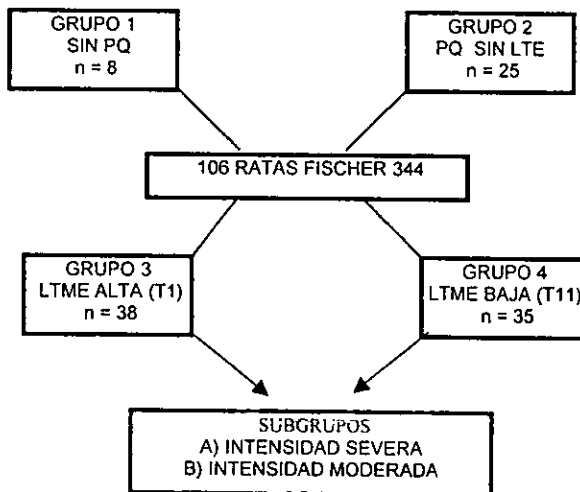
Los animales de los grupos 3 y 4 se dividieron a su vez en dos subgrupos como sigue:

Grupo 3 A. Ratas con LTME de localización alta e intensidad de lesión severa (n=17).

Grupo 3 B. Ratas con LTME de localización alta e intensidad de lesión moderada (n=21).

Grupo 4 A. Ratas con LTME de localización baja e intensidad de lesión severa (n=18).

Grupo 4 B. Ratas con LTME de localización baja e intensidad de lesión moderada (n=17).



### CONSIDERACIONES TECNICAS

(a) A las ratas del grupo 1 se les realizaron los mismos estudios inmunológicos que a las ratas de los grupos 3 y 4 para determinar los valores de referencia.

(b) Las ratas del grupo 2 fueron sometidas al mismo procedimiento quirúrgico (PQ) que las ratas de los grupos 3 y 4 pero sin ser lesionadas.

(c) El grupo 2 comprende ratas con PQ a nivel de T1 o ratas con PQ a nivel de T11.

(d) A las ratas del grupo 2 se les realizaron los estudios inmunológicos a los mismos tiempos establecidos para las ratas de los grupos 3 y 4.

(e) El grupo 3 (lesión alta) y 4 (lesión baja) fueron divididos a su vez en: A (intensidad severa) y B (intensidad moderada) y estos subgrupos a su vez se dividieron en 3 grupos para evaluar el tiempo de evolución (1, 10 y 30 días). El número de ratas que formaron cada grupo se describe en la tabla 1.

TABLA 1. Distribución de animales por grupo estudiado.

GRUPO	Tipo de LTME	1 Día (Fase aguda)	10 Días (F. subaguda)	30 Días (F. crónica)	Total
1	Ratas normales	-	-	-	8
2	Laminect. Alta	6	4	3	13
2	Laminect. Baja	6	3	3	12
3 A	Alta Severa	7	5	5	17
3 B	Alta Moderada	7	9	5	21
4 A	Baja Severa	7	6	5	18
4 B	Baja Moderada	5	7	5	17
	TOTAL	36	35	27	106

(f) En los días establecidos para el sacrificio de los animales, se obtuvo una muestra de sangre de cada rata estudiada para llevar a cabo una electroforesis.

## DESCRIPCION DE VARIABLES

*Lesión Traumática de la Médula Espinal (LTME):* Daño en la médula espinal causado por el impacto con un cilindro de acero de 15 g de peso. El daño origina inflamación y destrucción del tejido neural así como pérdida total o parcial de la actividad motora de las extremidades posteriores.

### *VARIABLES INDEPENDIENTES*

*Tiempo de evolución:* se refiere a las diferentes fases posteriores a la LTME: aguda, subaguda y crónica.

*Fase aguda de la lesión:* es el período comprendido entre el momento de la lesión y las primeras 72 horas postlesión.

*Fase subaguda de la lesión:* período comprendido entre los 3 y los 15 días postlesión.

*Fase crónica de la lesión:* período comprendido a partir de los 15 días postlesión.

*Lesión alta:* lesión en la médula espinal realizada a nivel de la primera vértebra torácica.

*Lesión baja:* lesión es la médula espinal realizada a nivel de la décimo primera vértebra torácica.

*Lesión de intensidad moderada:* lesión producida al dejar caer un cilindro de acero de 15 g de peso desde una altura de 5 cm sobre la médula espinal y que permite preservar más del 40% del tejido en la médula espinal y que le permite al animal recuperar un grado 3 en las extremidades posteriores con respecto a la escala de Tarlov (base de sustentación amplia, movimientos coordinados con la marcha pero muy tambaleantes y con pérdida del equilibrio).

*Lesión de intensidad Severa:* lesión producida al dejar caer un cilindro de acero de 15 g de peso desde una altura de 10 cm sobre la médula espinal, siendo mínima la preservación de tejido de la médula espinal (< 15 %) y en que el 95% de los animales quedan parapléjicos.

### *VARIABLES DEPENDIENTES*

*Inmunosupresión:* Consideramos como inmunosupresión postlesión a la disminución significativa de la función linfocitaria.

*Función linfocitaria:* Es la capacidad de activación de los linfocitos T y B. En el caso de los linfocitos B, se refiere a la capacidad de producir niveles basales de inmunoglobulinas. Para los linfocitos T, se refiere a la capacidad de estas células para proliferar ante la presencia de un mitógeno.

*Proliferación linfocitaria:* Expansión del número de células, secundaria a la activación y división mitótica de cada linfocito inducida por el antígeno específico o por mitógenos. Un mitógeno es todo aquello capaz de inducir una respuesta inmune no específica e indiscriminada. La proliferación se evaluó mediante el índice de proliferación (IP): IP=promedio de cuentas por minuto de los pozos problema/ promedio de cuentas por minuto de los pozos testigo.

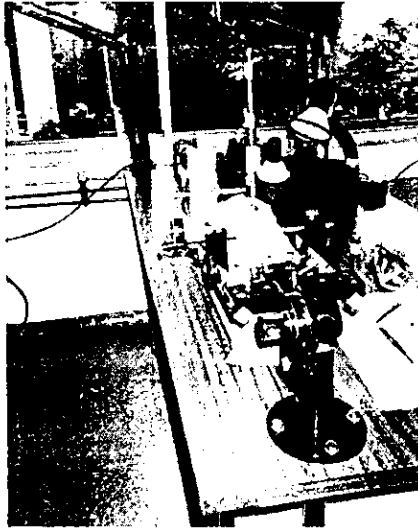
*Producción de Inmunoglobulinas por los linfocitos B:* se refiere a la capacidad de los linfocitos B para producir niveles basales de inmunoglobulinas.

### DESCRIPCION DE TECNICAS

#### *Lesión traumática de la médula espinal*

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (77.5 mg/ Kg de peso) y Clorhidrato de Xilazina (12.5 mg/Kg de peso). Previa asepsia y antisepsia de la región toraco-lumbar se procedió a realizar la cirugía como se indica a continuación:

Se realizó una incisión vía dorsal por planos de aproximadamente 2 cm, hasta llegar a la columna vertebral. Bajo visión con microscopio quirúrgico, se quitó la lamina de la vértebra T1 (cuando se trataba de una lesión alta) o T11 (para la lesión baja) hasta dejar expuesta la médula espinal. Si la rata correspondía a los grupos de laminectomía, el siguiente paso fue suturar el área de cirugía. Si la rata correspondía a los grupos con LTME, se colocó en un aparato estereotáxico (fig. 5) y a través de un tubo guía se dejó caer un cilindro de acero de 15 g de peso desde una altura de 5 cm si la lesión era moderada o desde 10 cm si la lesión era severa. Se verificó la correcta realización de la lesión bajo el microscopio, observándose un hematoma central en la zona medular donde se realizó el impacto y finalmente se cerró por planos con sutura dermalón 4-0.



**Figura 5** Técnica empleada para realizar una lesión por contusión (aparato estereotáxico).

#### *Cuidados posquirúrgicos*

Todos los animales se colocaron en cajas individuales y en una unidad de cuidados intensivos. Se mantuvieron en cajas con aserrín estéril y en una habitación aséptica. El agua y aserrín se cambiaron cada tercer día. El intestino y vejiga de cada animal se evacuaron manualmente cada 12 horas.

#### *Proliferación celular*

##### *Obtención de los ganglios y preparación de la muestra*

Bajo anestesia y en condiciones de asepsia y antisepsia se realizó un corte longitudinal de la región media del maxilar inferior a la región media del esternón. Se disecó el tejido subcutáneo y se localizaron 4 ganglios cervicales (2 en cada extremo de la cadena cervical). Se disecaron y se extrajeron para ser colocados inmediatamente en solución de RPMI para posteriormente ser macerados (sin llegar a triturar) con el émbolo de una jeringa estéril, para obtener las células y continuar con los siguientes pasos:

1. Las células en suspensión, se centrifugaron a 1500 rpm a TA durante 5 min.
2. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en RPMI para ser nuevamente centrifugadas.
3. Se repitieron 2 veces los pasos 1 y 2.
3. Se resuspendieron las células en 1 mL de RPMI + 20% SFB (RPMIc).
4. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L, se mezcló con 20  $\mu$ L de azul de tripan (0.4%) y se realizó la cuenta celular y viabilidad.

#### *Obtención del bazo y preparación de la muestra*

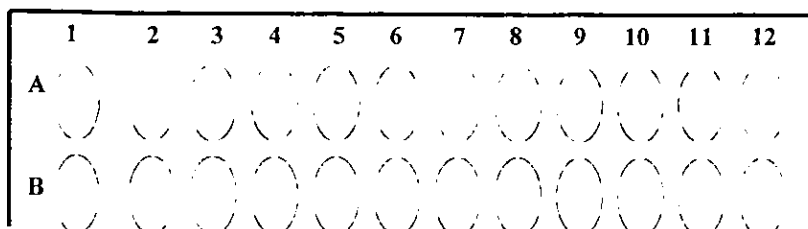
Bajo anestesia, y previa asepsia y antisepsia se realizó un corte transversal de la región infra-torácica izquierda para disecar y extraer el bazo. Se colocó inmediatamente en una caja de petri estéril con medio RPMI. En condiciones de esterilidad se maceró (sin llegar a triturar) con ayuda de una malla y el émbolo de una jeringa estériles, para obtener las células y continuar con los siguientes pasos:

1. La suspensión celular se transfirió a tubos cónicos de 50 mL estériles, se adicionó una solución de lisis (NH<sub>4</sub>Cl (0.15 M), KHCO<sub>3</sub> (0.01 M) y EDTA (0.0001 M)), se homogeneizó y dejó a temperatura ambiente por 5 minutos.
2. Pasado este tiempo se adicionaron 5 mL de RPMI y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 10 mL de RPMI y se centrifugó nuevamente, se realizaron dos lavados más con 5 mL de RPMI cada uno.
3. El paquete celular se resuspendió finalmente en 3 mL de RPMIc.
4. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L, se mezcló con 20  $\mu$ L de azul de tripan y se realizó la cuenta celular y viabilidad.

#### *Técnica de proliferación:*

1. En placas de 96 pozos para cultivo de células, se colocaron 350,000 células por pozo diluidas en RPMIc.

2. A cada pozo se le agregaron 100µl ya sea de RPMIc (testigo negativo), o bien RPMIc mezclado con concanavalina-A (Con A) como sigue:



Células de ganglios + concanavalina A 10 µg/mL: A1 a A5

Células de ganglios + RPMIc: A7 a A11

Células de bazo + concanavalina A 10 µg/mL: B1 a B5

Células de bazo + RPMIc: B7 a B11

3. Se incubaron las placas a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>

8. Cuarenta y ocho horas después, se agregó 1µ curie de timidina-H<sup>3</sup> (Amersham pharmacia biotech, actividad específica 25 Ci/mmol 185 MBq) por pozo.

4. Veinte horas después las células fueron procesadas en un cosechador (Skatron Instruments).

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

6. Todas las muestras fueron evaluadas en un analizador de radioactividad β Beckman L5 6000 TA, para obtener los valores correspondientes expresados en cuentas por minuto.

Una vez obtenidos los valores, se eliminó el valor más alto y el más bajo, y se procedió a promediar cada triplicado y el valor resultante se utilizó para obtener el índice de



proliferación (IP) correspondiente, mismo que resultó de dividir las cuentas por minuto promedio de los pozos problema entre las cuentas por minuto promedio de los pozos testigo (células + RPMIc).

### Electroforesis de proteínas séricas

#### *Obtención de la muestra de suero*

1. Bajo anestesia y antes de obtener los órganos linfoides, se tomó una muestra de 1 mL de sangre por punción intracardiaca.
2. Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Posteriormente (previa retracción del coágulo) se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.
4. Se obtuvo el suero correspondiente y se colocó en tubos eppendorf, se adicionaron 20  $\mu$ L de timerosal por cada 500  $\mu$ L de suero (para tener una concentración final de 0.01% de timerosal en suero) y se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
5. Todas las muestras de suero se procesaron el mismo día bajo las mismas condiciones.

#### *Técnica*

1. Se humedeció una membrana de acetato de celulosa con la solución reguladora por 10 minutos.
2. Pasado este tiempo se absorbió el exceso de humedad con un papel filtro.
3. Se colocó la membrana sobre la cámara y se aplicaron las muestras, seleccionando la muestra número 1 en el lado donde se observaba una muesca que indicaba la posición 1 y en seguida se aplicaron las muestras correspondientes (8 muestras por acetato).
4. La cámara se conectó y dejó correr durante 20 minutos a 200 voltios.
5. Se sacó la membrana y tñó por 10 minutos en rojo de Ponceau al 5% en ácido tricloroacético al 7.5%.
6. La membrana se enjuagó varias veces en solución de ácido acético al 5% en agua, hasta eliminar el exceso de colorante, posteriormente se colocó en la mezcla aclaradora por 5 minutos y luego en una placa de vidrio teniendo cuidado que no se formaran burbujas.

7. Con ayuda de una pistola de aire se secó cada membrana, para después separar la membrana de la placa de vidrio.

8. Cada muestra se digitalizó y procesó para conocer la densidad de cada banda con el software Syngene Gene Tool Synoptics. Ltd 1998 .

Una vez obtenidos los resultados, se procedió a calcular los porcentajes correspondientes a cada banda, tomando como referencia la suma de los píxeles de todas las bandas (100%). El valor correspondiente a cada banda se multiplicó por 100 y se dividió entre el número total de píxeles resultante de la suma de todas las bandas.

### METODO ESTADISTICO

Se realizó estadística descriptiva, se calcularon promedios o medianas según el caso. Para determinar el tipo de pruebas estadísticas todos los valores resultantes de las pruebas se sometieron a pruebas de normalidad. Se propuso que si la distribución de los valores de una variable determinada presentaba una distribución normal en todos los casos, se realizaría una prueba estadística paramétrica, pero si en uno o más de los casos la distribución es anormal, se utilizaría una prueba no paramétrica. En todos los casos, el valor de la probabilidad para mostrar diferencias entre los grupos se consideró con una  $p = \alpha < 0.05$ .

### CONSIDERACIONES ETICAS DEL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El presente proyecto se realizó tomando en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (Ley general de Salud 1995).

## RESULTADOS

### ANALISIS ESTADISTICO

En la mayoría de los casos, el análisis de normalidad demostró que los datos de todos los grupos presentaban una distribución heterogénea, por ello se analizaron mediante pruebas no paramétricas.

#### *Proliferación celular*

Para conocer las diferencias estadísticas entre los grupos 1 y 2, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Para comparar los resultados entre el grupo 1 y los diferentes subgrupos (3A, 3B, 4A, 4B) por separado, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida por la prueba de Dunn's o U de Mann Whitney. Para comparar la intensidad de la lesión se realizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. En lo que respecta al tiempo de evolución de la LTME se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney.

#### *Electroforesis de proteínas séricas*

Para conocer la diferencia entre el grupo 1 y 2 se realizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Para comparar el grupo 1 con los diferentes subgrupos se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

### PROLIFERACION CELULAR

#### *Influencia de la intensidad de la lesión sobre la función de los linfocitos T obtenidos de ganglio cervical*

En la figura 6 se observa que la LTME disminuye la proliferación de los linfocitos T en los 3 tiempos estudiados. En la fase aguda los animales con lesión alta (fig. 6 A) independientemente de la intensidad, presentan una disminución del IP (severa: 93% y moderada: 75%) con respecto a los animales no lesionados, sin embargo dicha disminución no alcanzó la significancia estadística ( $p > 0.05$ ). Para la fase subaguda, el IP presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo de lesión moderada (88% menor a los animales no lesionados), mientras que, los animales con lesión severa no mostraron cambios respecto a la fase aguda ( $p > 0.05$ ). Hacia la fase crónica, aunque ambos grupos lesionados presentaron un incremento del IP éste siguió siendo menor al presentado por el grupo de animales no lesionados (72% menor) ( $p < 0.05$ ).

Respecto a los animales con lesión baja (fig. 6 B), durante la fase aguda se observó una disminución significativa del IP independientemente de la intensidad (87% menor a los animales sin lesión) manteniéndose sin cambios hacia la fase subaguda para los animales con lesión severa ( $p>0.05$ ), mientras que los de lesión moderada presentaron un incremento significativo (40% menor al de los no lesionados) ( $p<0.05$ ). Durante la fase crónica los animales con lesión severa mostraron un incremento no significativo del IP ( $p > 0.05$ ) respecto a las fases anteriores mientras que los animales con lesión moderada presentaron una disminución (74% menor al de los no lesionados) aunque no estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ).

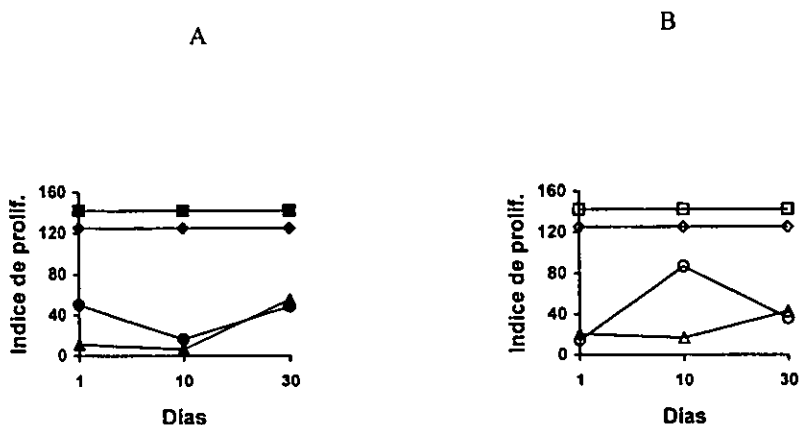


Figura 6. Índices de proliferación de linfocitos T obtenidos de ganglios cervicales de ratas sin lesión (cuadros), con laminectomía (rombos) y con LTME de localización alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

*Influencia de la localización de la lesión sobre la función de los linfocitos T obtenidos de ganglio cervical*

En la figura 7A se observa que durante la fase aguda, la lesión de intensidad moderada independientemente de la localización origina una disminución del IP (alta: 65%, baja: 90% menor a los animales no lesionados) aunque ésta no alcanzó la significancia estadística ( $p>0.05$ ). En la fase subaguda el IP de los animales con lesión alta disminuyó

aún más (88% menor a los animales no lesionados y 67% respecto a la fase aguda) mientras que en los de lesión baja presentó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ), pero sin alcanzar el valor presentado por los animales no lesionados (40% menor a este grupo). Durante la fase crónica se presentó un incremento no significativo ( $p > 0.05$ ) del IP en el grupo de lesión alta (66% menor a los no lesionados), mientras que en los animales de lesión baja éste disminuyó nuevamente aunque sin alcanzar la diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) (41% menor a la fase subaguda y 75% menor a los animales no lesionados). Respecto a la lesión de intensidad severa (fig. 7B), independientemente de la localización (alta o baja) se observó un comportamiento similar. Durante la fase aguda se presentó una disminución del IP (baja: 86% y alta: 92% menor a los animales sin lesión;  $p > 0.05$ ), manteniéndose sin cambios en la fase subaguda ( $p > 0.05$ ), para posteriormente aumentar hacia la fase crónica aunque no en forma significativa (baja: 70% y alta: 61% menor a los animales no lesionados;  $p > 0.05$ )

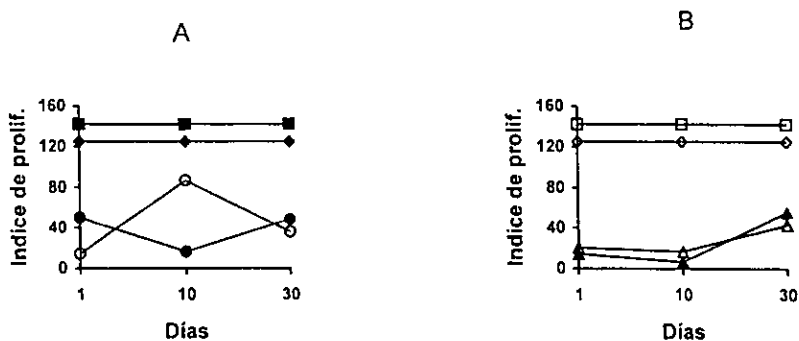


Figura 7. Índices de proliferación de linfocitos T obtenidos de ganglios cervicales de ratas sin lesión (cuadros), con laminectomía (rombos) y ratas con LTME de localización alta (círculo y triángulos negros) o baja (círculos y triángulos blancos) e intensidad moderada (A) o severa (B).

#### *Influencia de la intensidad de la lesión sobre la función de los linfocitos T obtenidos de bazo*

En la figura 8A se observa que durante la fase aguda, los animales con lesión alta independientemente de la intensidad, presentaron valores similares a los de los animales no lesionados ( $p > 0.05$ ). En la fase subaguda, ambos grupos lesionados mostraron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el IP (moderada: 86% y severa 92% menor a los

animales sin lesión). Sin embargo, para la fase crónica, se observó un incremento aunque no significativo ( $p>0.05$ ), en la proliferación de los linfocitos de los grupos lesionados, el cual siguió siendo menor al valor de los animales sin lesión (moderada: 50% y severa 64% menor).

Durante la fase aguda, se observó una disminución no significativa ( $p>0.05$ ) del IP en el grupo de animales con lesión baja (fig. 8B), independientemente de la intensidad (moderada: 65% y severa: 52% menor a los animales sin lesión). El IP disminuye aún más para la fase subaguda (moderada: 87% y severa 90% menor a los animales sin lesión) sin alcanzar nuevamente la diferencia estadística ( $p>0.05$ ) y finalmente hacia la fase crónica ambos grupos lesionados presentan un incremento no significativo ( $p>0.05$ ) siendo éste más evidente en los animales con lesión moderada (moderada: 10% y severa: 65% menor a los animales sin lesión).

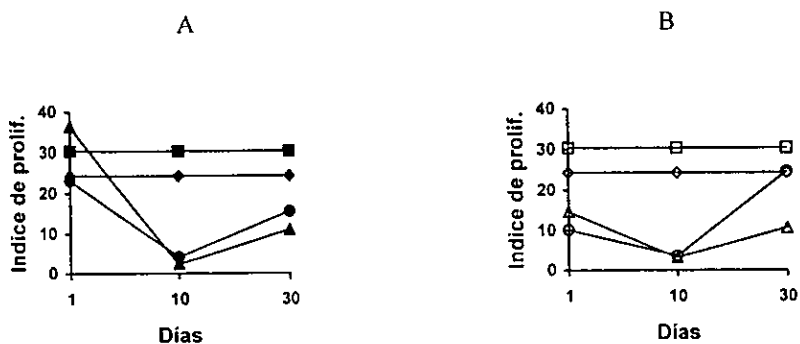


Figura 8. Índices de proliferación de linfocitos T obtenidos de bazo de ratas sin lesión (cuadros), con laminectomía (rombos) y con LTME de localización alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

#### *Influencia de la localización de la lesión sobre la función de los linfocitos T obtenidos de bazo*

En la figura 9A se observa que durante la fase aguda la lesión de intensidad moderada y localización alta no origina cambios significativos en el IP ( $p>0.05$ ) con respecto a los animales no lesionados, en tanto que la lesión de localización baja si presenta una disminución aunque no significativa del IP (66% menor a los animales no lesionados;  $p>0.05$ ). Para la fase subaguda se observó una disminución del IP ( $p>0.05$ )

independientemente de la localización respecto a la fase aguda, (baja: 88% y alta: 86% menor a los animales sin lesión). Hacia la fase crónica, el IP se incremento en ambos grupos aunque no en forma significativa ( $p>0.05$ ), siendo más marcado dicho incremento en los animales de lesión baja (alta: 50% y baja: 20% menor a los animales no lesionados).

Respecto a la intensidad severa (fig. 9B), cuando se trata de una lesión alta, no se presentó ningún cambio significativo en el IP, con relación a los animales no lesionados, mientras que en los de localización baja, el IP disminuyó aunque no de manera significativa (52% menor a los animales no lesionados;  $p>0.05$ ). Hacia la fase subaguda ambos grupos experimentaron una disminución significativa ( $p<0.05$ ) respecto a la fase aguda (baja: 78% y alta: 94% menor a los valores observados en la fase aguda) y a los animales no lesionados (baja: 89% y alta: 92%). Para la fase crónica ambos grupos presentan un incremento aunque no significativo ( $p>0.05$ ) del IP (64% menor a los animales no lesionados).

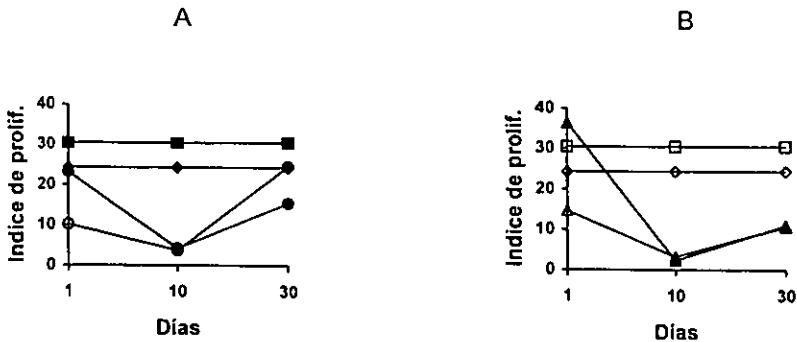


Figura 9. Índices de proliferación de linfocitos obtenidos de bazo de ratas sin lesión (cuadros), con laminectomía (rombos) y ratas con LTME de localización alta (círculos y triángulos negros) o baja (círculos y triángulos blancos) e intensidad moderada (A) o severa (B).

PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS POR LOS LINFOCITOS B

*Región Gamma*

Aunque en los grupos con lesión alta se observa una ligera disminución en el porcentaje de gamma globulinas (fig. 10A), ésta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) independientemente de la intensidad y del tiempo de evolución. Durante la fase aguda, en los grupos con lesión baja (fig. 10 B) tampoco se demostró una diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con respecto a los grupos normales. Hacia la fase subaguda, los animales con lesión severa, no presentan cambios con respecto a la fase aguda, sin embargo en el grupo con lesión moderada el porcentaje disminuye significativamente con respecto a la fase aguda (66% menor a los animales no lesionados) ( $p<0.05$ ) pero también los animales laminectomizados presentaron esta disminución. Durante la fase crónica se presenta un incremento en el porcentaje en todos los grupos, siendo más significativo en los de lesión moderada.

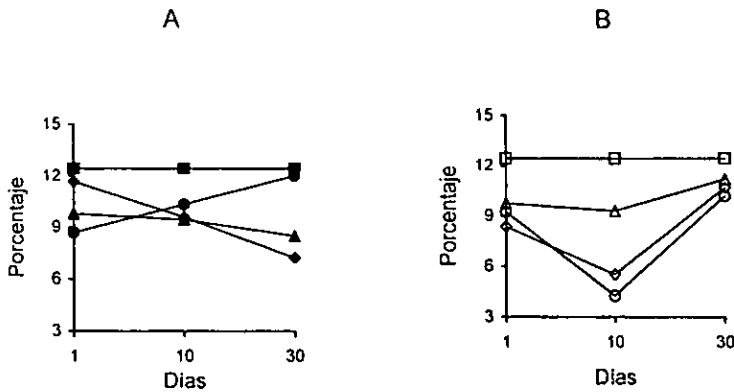


Figura 10. Porcentaje de gamma globulinas de ratas sin lesión (cuadros), o con laminectomía (rombos) y ratas con lesión alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).



### Región Beta

La LTME de localización alta (fig. 11A) independientemente de la intensidad y del tiempo de evolución no altera la producción de beta globulinas por los linfocitos B ( $p>0.05$ ).

En la figura 11B se observa que durante la fase aguda los animales con lesión baja; independientemente del tipo de intensidad presentan un porcentaje de beta globulinas similar al de las ratas sin lesión ( $p>0.05$ ). Aunque existe una tendencia del porcentaje a incrementar a través del tiempo, en la fase subaguda y crónica ambos grupos lesionados presentan un porcentaje similar al del grupo sin lesión pero con laminectomía ( $p>0.05$ ).

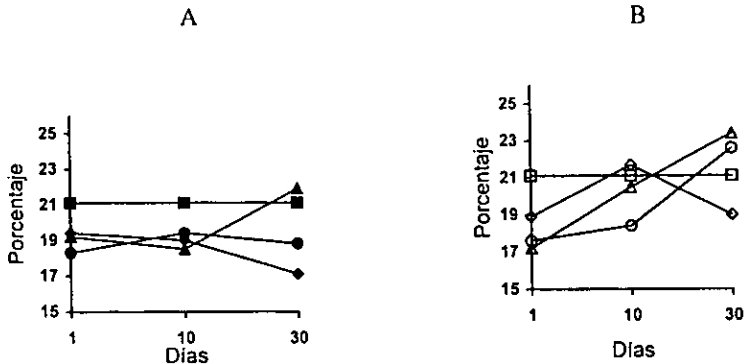


Figura 11. Porcentaje de beta globulinas de ratas sin lesión (cuadros), o con laminectomía (rombos) y ratas con lesión alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

### Región Alfa 1

Durante la fase aguda y subaguda no se demostró ningún cambio en el porcentaje de alfa globulinas (fig. 12 A y B) independientemente de la localización e intensidad de la lesión ( $p>0.05$ ). Durante la fase crónica ambos grupos lesionados presentan un moderado incremento en el porcentaje sin alcanzar la significancia estadística ( $p>0.05$ ).

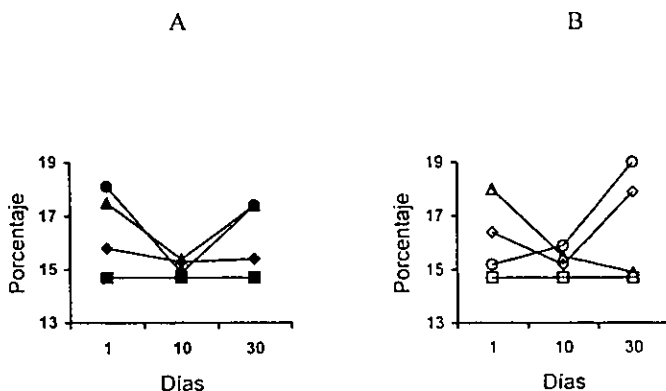


Figura 12. Porcentaje de alfa1 globulinas de ratas sin lesión (cuadros) o con laminectomía (rombos) y ratas con lesión alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

### Región Alfa 2

Los animales con lesión alta (fig. 13A) y baja (fig. 13B) independientemente de la intensidad y del tiempo de evolución, no presentaron diferencias en el porcentaje de alfa globulinas respecto a los animales no lesionados, aunque durante la fase aguda los animales lesionados presentaron un porcentaje ligeramente mayor al grupo no lesionado esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

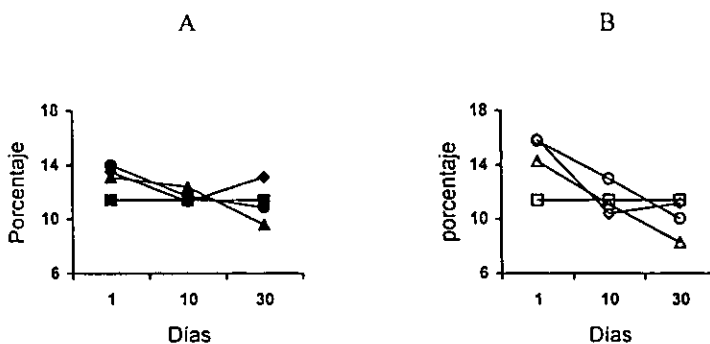


Figura 13. Porcentaje de alfa2 globulinas de ratas sin lesión (cuadros), o con laminectomía (rombos) y ratas con lesión alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

### Albúmina

Los animales con lesión alta (fig. 14A) independientemente de la intensidad de la lesión, presentan un incremento paulatino del porcentaje de albúmina a través del tiempo, con respecto a los animales sin lesión. Dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ). Durante la fase aguda y crónica los grupos de animales con lesión baja (fig. 14B) no mostraron modificaciones en la producción de albúmina respecto a los animales no lesionados, sin embargo, en la fase subaguda, ambos grupos lesionados, presentaron un porcentaje ligeramente mayor que los animales sin lesión, pero tal diferencia no fue significativa ( $P>0.05$ ).

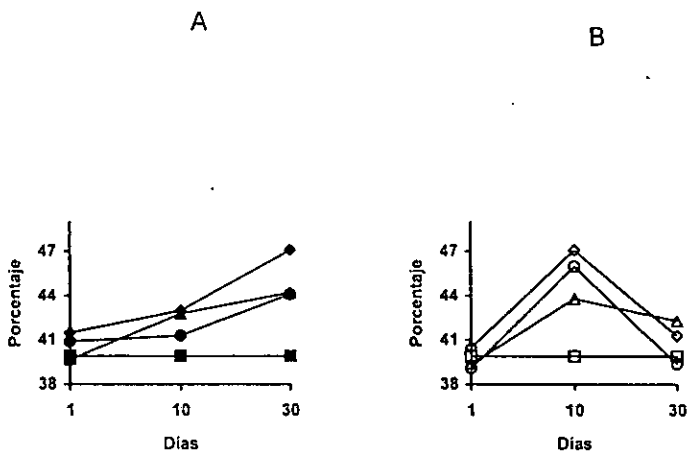


Figura 14. Porcentaje de albúmina en ratas sin lesión (cuadros), o con laminectomía (rombos) y ratas con lesión alta (A) o baja (B) e intensidad severa (triángulos) o moderada (círculos).

## DISCUSION

En el ambiente se encuentran una gran cantidad de agentes infecciosos que pueden causar enfermedades y, si se multiplican sin control alguno, pueden llegar a producir la muerte del huésped. Generalmente las infecciones que ocurren en individuos normales son de corta duración y el daño es mínimo (Roitt 1994), pero esto no sucede cuando alguno de los componentes del sistema inmunológico se encuentra alterado. Una inmunodeficiencia ya sea de carácter congénito o adquirido, clínicamente se manifiesta con infecciones severas por organismos de patogenicidad normalmente baja.

La causa principal de morbi-mortalidad en pacientes con LTME son las infecciones, ya sea del tracto urinario, respiratorio o septicemia secundaria a las infecciones del tracto urinario (ITU) (Whiteneck 1991, Sugarman 1982 a, b, DeVivo 1993, Montgomerie 1997, Berrouane 1998, Mckinley 1999). Varios estudios han demostrado que después de una LTME se origina una disminución en la función del sistema inmunológico tanto de la inmunidad innata como adaptativa, lo cual explica en cierta forma la alta predisposición de estos pacientes a contraer determinado tipo de infecciones (Cruse 1992, 1994, 1996, Campagnolo 1994, Kliesch 1996). Se ha sugerido que dicha alteración esta relacionada con la localización a la que ocurre el trauma en el paciente lesionado (Campagnolo 1994, 1997). Provocando una mayor disminución en la función inmunológica cuando la lesión es de localización más cefálica que cuando es de localización más caudal. Los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan en cierta manera con estos datos. Aunque durante la fase aguda no se presentaron diferencias significativas, fue claro observar que en la fase subaguda los linfocitos T obtenidos de ganglios de animales con lesión baja moderada presentaron una recuperación en el índice de proliferación significativamente mayor al de los animales con lesión alta independientemente de la intensidad. Desde este punto de vista, son dos los fenómenos que se tienen que analizar, por una parte el efecto de la localización pero también el de la intensidad de la lesión ya que cuando la intensidad es severa, no se observa ninguna influencia de la localización. Así pues, en lo referente al efecto de la localización, la diferencia observada puede explicarse por la ubicación anatómica del sistema simpático, que es el encargado de inervar los órganos linfoides. En el humano las fibras preganglionares del simpático emergen de la médula espinal desde T1 a L4 (Anthony 1983; Brading 1999) y en la rata desde T1 a L2 (Paxinos 1995), de tal forma que, una lesión localizada en T1 o en una posición más cefálica,

origina una desconexión total entre el SNC y el sistema simpático misma que provoca el fenómeno de hiperreflexia autonómica (Amzallang 1993) que se caracteriza por una hiperfunción simpática como resultado de la desconexión del simpático con los centros superiores. El aumento en la función del sistema simpático puede originar a su vez inmunodepresión por 2 vías diferentes. Por una parte, se ha demostrado que la hiperactividad del simpático provoca una disminución de la secreción de citoquinas hematopoyéticas (Ghoshal 1998), moléculas indispensables para el buen funcionamiento del SI. Por otro lado, también la hiperactividad simpática es capaz de originar un importante aumento en la liberación de corticosteroides (Callahan 1998), sustancias que por si mismas tienen un importante efecto inmunosupresor. Así pues, por efecto de la hiperreflexia autonómica se puede estar originando en forma más marcada el efecto inmunosupresor observado en los animales con lesión alta.

Por otra parte, vale la pena mencionar que la influencia de la localización sólo fue observada en los linfocitos que se obtuvieron de ganglios linfáticos no así en los obtenidos de bazo ya que en este último, aunque si se logró observar una disminución en la función T, los valores fueron muy similares independientemente de la localización de la lesión. La influencia ejercida por el sistema simpático sobre la función T probablemente no tenga la misma importancia en bazo que a nivel ganglionar y por ello no se observen diferencias significativas.

Por otra parte, en lo que respecta a la intensidad de la lesión, es claro observar que independientemente de la localización y el órgano estudiado (ganglio o bazo) la lesión severa induce una disminución en la proliferación T, misma que hasta después de la fase subaguda de la lesión, presenta cierta recuperación. En este caso es importante mencionar que, aún los animales con lesión baja severa presentaron una proliferación linfocitaria muy disminuida. Como antes se mencionó, en un individuo con lesión baja independientemente de la intensidad, el sistema simpático debe de seguir conectado al sistema nervioso y por lo tanto no se esperaría una disminución en la función inmunológica por los mecanismos antes descritos. Sin embargo en este trabajo aún en los animales con lesión severa baja existe una marcada disminución en la proliferación linfocitaria. En este caso podría estar participando importantemente otro fenómeno que se origina una vez que se lleva a cabo la lesión: el choque espinal. El choque espinal es un fenómeno caracterizado por la pérdida total de estímulos eléctricos con la consiguiente pérdida de actividad sensorial y motora seguido esto de una recuperación gradual de los reflejos medulares (Guttmann 1970, Bach y Rita 1993). La duración del choque medular

es muy variable (días a semanas) y depende importantemente de la severidad de la lesión, presentando una mayor duración cuando más severa es la lesión (Bach y Rita 1993). El choque medular en realidad origina una desconexión con el SNC por la pérdida de impulsos eléctricos. Así pues, en los animales con lesión severa baja una mayor duración del periodo de choque medular podría estar contribuyendo a originar por un mayor tiempo la muy disminuida proliferación presentada por los linfocitos T de individuos con este tipo de lesión.

Las fases de evolución de la lesión también influyen sobre la función T. Como se pudo observar en este trabajo, independientemente de la intensidad o localización los linfocitos T obtenidos de ganglio presentaron una disminución en la proliferación desde la fase aguda y tiende a recuperarse en las fases siguientes. En este caso es muy probable que la influencia de la fase tenga que ver nuevamente con el periodo de choque espinal, de tal forma que en la medida en que pasa el tiempo el choque medular tiende a desaparecer y así mismo tiende a recuperarse la proliferación T. Nuevamente la duración del choque espinal se vería influenciada por la localización y la intensidad de la lesión. Vale la pena mencionar que en el caso de los linfocitos obtenidos de bazo, la disminución en la proliferación se observa hasta la fase subaguda de la lesión, sin embargo, tiende a recuperarse también para la fase crónica. En este caso, el efecto tardío (hasta la fase subaguda) de la lesión sobre la proliferación T en comparación con el efecto observado en linfocitos de ganglio puede deberse como ya antes lo sugerimos, a una menor influencia del sistema nervioso sobre la función de las células alojadas en este órgano. Sin embargo con los resultados obtenidos en este trabajo no podemos demostrar en forma exacta esta observación por lo que deberá ser un tópico a desarrollar en futuras investigaciones.

Finalmente, otro dato que vale la pena analizar es el relacionado con el porcentaje de inmunoglobulinas producido por los linfocitos B. Con relación a esto, en el presente trabajo no se logró demostrar una influencia significativa de la localización, intensidad o fase de evolución sobre dicha función B. Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores donde al evaluar en general el efecto de la LTME sobre la producción de gamma globulinas no observaron alteración alguna (Lyons 1987). Vale la pena mencionar que, al evaluar la producción de estas proteínas se está evaluando en realidad una función basal de los linfocitos B y no una función que resulte de la estimulación antigénica. En el primer caso la función B no necesariamente es dependiente de una buena función de los linfocitos T, mientras que en la segunda, la función dependería en

buena parte de la actividad T. Así pues, no por haber observado en este trabajo alterada la función T, necesariamente tendríamos que esperar una alteración también en la producción de gamma globulinas, sin embargo llama la atención el resultado. Se ha descrito que gran parte de la inervación simpática en órganos linfoides está dirigida sobre todo a los sitios donde se localizan los linfocitos T (Felten 1985, 1987, Madden 1995), de tal manera que muy probablemente para los linfocitos B no sea tan importante la influencia y por tanto la conexión con el sistema nervioso como lo es para los T.

Otros estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron una significativa disminución de la respuesta humoral contra un antígeno proteico heterólogo en ratas con LTME (Ibarra 2000). En este caso estamos hablando en realidad de una función B que es absolutamente dependiente de la función T, por tanto dicha alteración podría explicarse como el resultado de una mala función T y no necesariamente por alteración en la actividad B.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que la LTME tiene efecto directo sobre la función de los linfocitos T, pero no sobre la función de los linfocitos B.

Así mismo sugiere que la localización, la intensidad y fase de evolución de la lesión son factores que influyen sobre la proliferación de los linfocitos T. Estos resultados pueden ser de gran utilidad para conocer en mejor forma los efectos que la LTME origina y que se relacionan directamente con la evolución y pronóstico del paciente lesionado.

ESTA TESIS NO PUEDE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **CONCLUSIONES**

1. La lesión traumática de la médula espinal no tiene ningún efecto sobre la producción basal de inmunoglobulinas por parte del linfocito B.
2. La lesión traumática de la médula espinal origina una disminución en la función de los linfocitos T.
3. La función de los linfocitos T se encuentra más disminuida cuando la lesión es de localización más cefálica y de intensidad severa.
4. La proliferación de los linfocitos T es menor durante las fases aguda y subaguda, en comparación con la fase crónica de la lesión traumática de la médula espinal.

## **PERSPECTIVAS**

1. Deberá evaluarse la respuesta específica de los linfocitos T y la respuesta inespecífica y específica de los linfocitos B después de una lesión de la médula espinal.
2. Será importante determinar cuáles son los mecanismos por medio de los cuales se ve afectada la función de los linfocitos T después de una lesión en la médula espinal.
3. Se deberá demostrar si el sistema nervioso tiene una menor influencia sobre la función de las células inmunes almacenadas en bazo.



## APENDICE

### MATERIAL

#### Lesión traumática de la médula espinal

Bisturi

Cilindro de acero de 15 g

Gubia

Pinza de dientes de ratón

Pinza AA

Pinza 2a

Pinza 0

Tijeras

#### Proliferación celular

Cajas de petri estériles (Costar)

Cámara de Neubauer

Filtro de fibra de vidrio

Gradilla

Jeringa para insulina

Mallas de tela estériles

Pipeta automática de 20, 200 y 1000  $\mu$ L (Costar)

Pipetas graduadas estériles de 1, 5 y 10 mL (Costar)

Pipetor automático (pipet aid Drummon)

Puntas estériles

Placas de 96 pozos para cultivo celular (Costar)

Tubos cónicos estériles de 15 y 50 mL (Costar)

Viales para centelleo

#### Electroforesis

Aplicador Sepratek-8 Mod. 51158 Gelman Sciences

Capilares

Membrana Sephaphore III 5.7 X 12.7 cm Helena Laboratories

Tubos eppendorf

## EQUIPO

### Lesión traumática de la médula espinal

Aparato estereotáxico

Microscopio quirúrgico

### Proliferación celular

Centrifuga

Cosechador de células (Skatron instruments)

Contador de radiactividad ( $\beta$  Beckman L5 6000 TA)

Incubadora de CO<sub>2</sub>

Microscopio invertido

Microscopio óptico

### Electroforesis

Cámara Sepratek Mod. 51156 Gelman Sciences

Densitómetro (software Syngene Gene Tool Synoptics. Ltd 1998)

Pistola de aire

## REACTIVOS

### Lesión traumática de la médula espinal

Clorhidrato de Xilazina

Isodine

Ketamina

### Proliferación celular

Acido clorhidrico (Sigma)

Acido etilendiaminotetracético (EDTA, Sigma)

Agente antiPPLO 100X, preparado con 6 mg de tilosina/mL en 0.85% de solución salina (GibcoBRL)

Agente Hepes ( ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfónico (GibcoBRL)

Azul de tripano (Sigma)

Bicarbonato de potasio (Sigma)

Bicarbonato de sodio para cultivo celular (GibcoBRL)

Cloruro de amonio (Sigma)

Concanavalina A de Canavalia ensiformis tipo IV(Sigma)

Hidróxido de sodio (Sigma)  
L-Glutamina 200mM, 100 X (GibcoBRL)  
Líquido de centelleo (Aquasol, Sigma corp)  
Medio de cultivo RPMI 1640 en polvo (GibcoBRL)  
2-Mercaptoetanol  $5.5 \times 10^{-2}$  en D-PBS, 1000X (GibcoBRL)  
Piruvato de sodio para cultivo celular (GibcoBRL)  
Solución de aminoácidos no esenciales 10 mM, 100X(GibcoBRL)  
Solución de penicilina-estreptomicina 10,000UI/10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (GibcoBRL)  
Suero fetal bovino libre de ácido (Hyclone)  
Timidina tritiada ( 5 mCi/5 mL de Amersham pharma biotech, actividad específica 25 Ci/mmol 185 MBq)

### Electroforesis

Ácido acético (Sigma)  
Ácido 5,5-dietilbarbitúrico (Sigma)  
Ácido tricloroacético (Sigma)  
Amortiguador electra HR, Helena laboratories  
5,5-dietilbarbiturato de sodio (Sigma)  
Rojo de ponceau (Sigma)  
Solución aclaradora (40% v/v N-metilpirrolidona ) Sepra clear II Helena laboratories  
Timerosal (Merthiolate, Sigma)

## PREPARACION DE SOLUCIONES

### Proliferación celular

AZUL DE TRIPANO 0.4%: Se pesaron 0.2 g del colorante y se aforó a 50 mL con agua destilada. Se filtró y almacenó a temperatura ambiente.

CONCAVALINA A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : Se preparó una solución stock que contenía 1 mg de ConA/mL de RPMIc, de la cual se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 800  $\mu\text{L}$  de RPMIc para tener una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de esta solución y se mezclaron con 4500  $\mu\text{L}$  de RPMIc (concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se esterilizó pasando la solución a través de un filtro millipore de poro 0.22  $\mu\text{m}$ .

**MEDIO DE CULTIVO RPMI:** se mezcló 10.4 g de medio RPMI 1640 en polvo, 10 mL de la solución de penicilina-estreptomicina, 10 mL del agente antiPPLO, 10 mL de L-glutamina, 2 g del agente Hepes y 0.2 g de piruvato de sodio, todo se llevó a 900 mL con agua destilada. Los reactivos se disolvieron con agitación constante por aproximadamente 10 minutos, se ajustó el pH a 6.8 y el volumen se completó a 1000 mL. Bajo condiciones de esterilidad el medio de cultivo se filtró por vacío a través de un filtro millipore (poro 0.22  $\mu\text{m}$ ).

**NOTA:** Si el medio de cultivo, no se consumió en el mes siguiente a su preparación, fue necesario volver a adicionar las mismas cantidades de L-glutamina y aminoácidos no esenciales, así como volver a filtrar para esterilizar.

**RPMI COMPLEMENTADO:** se mezcló 20 mL de SFB y 80 mL de RPMI.

**SOLUCION DE LISIS:** Se pesaron 1.652 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2 g de  $\text{KHCO}_3$  y 0.0074 g de EDTA. Se mezclaron con agua destilada a un volumen final de 200 mL. Se esterilizó por vacío con ayuda de un filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**NOTA:** Esta solución se utilizó el mismo día de cada ensayo e inmediatamente después de su preparación.

**TIMIDINA TRITIADA 1  $\mu\text{Ci}/20 \mu\text{L}$ :** Se tomó 1 mL de T-H3 (1 mCi/mL) y se diluyó con 19 mL de RPMI, obteniendo finalmente una concentración de 1 mCi/20 mL.

### Electroforesis

**ACIDO ACETICO AL 5% v/v:** En un matraz volumétrico se adicionaron 5 mL de ácido acético y se completó el volumen a 100 mL con agua destilada.

**ACIDO TRICLOROACETICO AL 7.5%:** Se pesaron 7.5 g de TCA y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

**ROJO DE PONCEAU AL 5% EN TCA:** Se pesaron 5 g de rojo de ponceau y se aforó a 100 mL con la solución de TCA al 7.5 %.

**SOLUCION AMORTIGUADORA DE BARBITAL pH 8.6:** Solución A, se pesó 12 g de barbiturato de sodio y se disolvieron en 800 mL de agua destilada. Solución B, se pesó

4.4 g del ácido barbiturico y se disolvió con 150 mL de agua destilada a 95°C. Se mezclaron los 800 mL de la solución A y los 150 mL de la solución B y se ajustó el pH a 8.6 con NaOH. Finalmente se agregaron 0.15 g de merthiolate como conservador y el volumen se ajustó a 1000 mL.

TIMEROSAL: Se pesaron 0.026 g de timerosal y se disolvieron con 100 mL de solución fisiológica (0.26  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ó 5.2  $\mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$ ). Se almacenó en refrigeración protegido de la luz.

NOTA: Por cada 500  $\mu\text{L}$  de suero se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de la solución conservadora de timerosal, para tener una concentración final de 5.2  $\mu\text{g}$  en 520  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ ), es decir, 0.01% de timerosal en suero.

## GLOSARIO

Ab. ....	Anticuerpo (del ingles <i>antibody</i> )
BCR. ....	Receptor del linfocito B
CAM. ....	Molécula de adhesión celular
ConA. ....	Concanavalina A
CPA. ....	Célula presentadora de antígeno
DAG. ....	Diacilglicerol
DNA.....	Acido desoxirribonucleico
Ig. ....	Inmunoglobulina
IL. ....	Interleuquina
IP3. ....	Trifosfato de inositol
ITU. ....	Infecciones del tracto urinario
LPS. ....	Lipopolisacárido
LTME. ....	Lesión traumática de la médula espinal
$\mu$ Ci. ....	Microcurie
mCi. ....	Milicurie
MHC.....	Complejo principal de histocompatibilidad (del ingles <i>Major Histocompatibility complex</i> )
NA. ....	Noradrenérgica
NK. ....	Natural Killer
Pcy1. ....	Fosfolipasa C gama-1
PHA. ....	Fitohemaglutinina
PMN.....	Polimorfonuclear
PQ.....	Procedimiento quirúrgico
RE.....	Reticulo endoplasmico
rpm. ....	Revoluciones por minuto
RPMIc.....	RPMI complementado
SFB. ....	Suero fetal bovino
SI. ....	Sistema Inmunológico
SN.....	Sistema nervioso
SNA. ....	Sistema nervioso autónomo
SNC. ....	Sistema nervioso central

SNP. ....Sistema nervioso periférico  
TA. ....Temperatura ambiente  
TCA.....Acido tricloroacético  
TCR. ....Receptor del linfocito T

## REFERENCIAS

- Abbas AK. Inmunología celular y molecular. Ed. Mc Graw Hil, 3a. ed. Madrid España 1999.
- Amar P, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999; 44(5): 1027-1040.
- Amzallag M. Autonomic hyperreflexia. *Int. Anesthesiology Clin.* 1993; 31(1):87-102
- Anthony CP. Anatomía y fisiología. Ed. Interamericana, 10a. ed. México D.F. 1983.
- Bach-y-Rita P. Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. *Paraplegia* 1993; 31:82-87
- Befus AD, Mathison R and Davison J. Integration of neuro-endocrine immune responses in defense of mucosal surfaces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999 Apr; 60 (4 suppl ): 26-34.
- Berrouane Y, Daudenthum I, Riegel B, Emery MN, Martin G, Krivosic R and Grandbastien B. Early onset pneumonia in neurosurgical intensive care unit patients. *J. Hosp. Infect.* 1998; 40(4): 275-280.
- Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E, Da Prada Mi and Keller HH . Immunoregulation mediated by the Sympathetic Nervous System. *Cell. Immunol.* 1979; 48: 346-355.
- Bracken MB, Freeman DH Jr. and Hellenbrand K. Incidence of acute traumatic hospitalized spinal cord injury in the United States, 1970-1977. *Am. J. Epidemiol.* June 1981; 113:615-622.
- Brading A. The autonomic nervous system and its effectors. Blackwell, U.S.A 1999.



Callahan TA, Moynihan JA and Piekut DT. Central nervous system activation following peripheral chemical sympathectomy: implications for neural-immune interactions. *Brain Behav. Immun.* 1998; 12(3): 230-241.

Campagnolo DI, Keller SE, DeLisa JA, Glick TJ, Sipski ML and Schleifer SI. Alteration of immune system function in tetraplegics. A Pilot Study. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 1994; 73:387-393.

Campagnolo DI, Bartlett JA, Keller SE, Sanchez W and Oza R. Impaired phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in complete tetraplegics. *Am. J. Phys. Med. Rehabil* 1997; 76: 276-280.

Campagnolo DI, Bartlett JA, Chatterton R and Keller SE. Adrenal and pituitary hormone patterns after spinal cord injury. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 1999; 78:361-366.

Carpenter MB. *Neuroanatomia, fundamentos*. Ed. Medica Panamericana, 4a ed. Madrid España 1994.

Carter PB and Bazin H. *The rat laboratory. Immunology*. Vol. II. Academic press USA 1980.

Cavalloti C, Artico M and Cavalloti D. Occurrence of adrenergic nerve fibers of noradrenaline in thymus gland of juvenil and aged rats. *Immunol. lett.* 1999; 70(1): 53-62.

Chambers DA, Cohen RL and Perlman RL. Neuroimmune modulation: signal transduction and catecholamines. *Neurochem Int.* 1993; 22 (2): 95 -110.

Chusid JG. *Neuroanatomia correlativa y neurologia funcional*. Ed. El manual moderno, 7a. ed. México D.F. 1987.

Cook PJ, Lawrence BA, Ludwing J and Miller TR. The medical costs of gunshot injuries in the United States. *JAMA* 1999 Aug; 282(5): 447-454.

Cruse JM, Lewis RE, Bishop GR, Kliesch WF and Gaitan E (a). Neuroendocrine-immune interactions associated with loss and restoration of immune system function in spinal cord injury and stroke patients. *Immunol. Res.* 1992; 11(2): 104-116.

Cruse JM, Lewis RE, Ruggs M and Kliesch WF (b). Loss and restoration of immune function in spinal cord injury patients. *FASEB J.* 1992; 6:A1424.

Cruse JM, Lewis RE Jr, Bishop GR, Kliesch WF, Gaitan E and Britt R. Decreased immune reactivity and neuroendocrine alterations related to chronic stress in spinal cord injury and stroke patients. *FASEB J* 1994; 8:A113.

Cruse JM, Keith JC, Bryant ML and Lewis RE JR. Immune systems-neuroendocrine dysregulation in spinal cord injury. *Immunol. Res.* 1996; 15:306-314.

Cruse JM, Lewis RE, Roe DL, Dilioglou S, Blaine MC, Wallace WF and Chen RS. Facilitation of immune function, healing of pressure ulcers, and nutritional status in spinal cord injury patients. *Exp. and Mol. pathol.* 2000; 68: 38-54.

De la Torre. Spinal Cord Injury. Review of basic and applied research. *Spine.* 1981 Jul-Aug; 6(4):315-335.

DeVivo MJ, Black JK and Stover SL. Causes of death during the first 12 years after spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* March 1993; 74:248-254.

Douglas AW and Blalock E. Association between the neuroendocrine and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57:137-150.

Faden AI, Roger P and Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann. Neurol.* 1988; 23:623-626.

Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA and Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* 1985; 135(2): 755s-765s.

Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA and Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunological reviews* 1987; 100:225-260.

Ghoshal D, Sinha A, Sinha S and Bhattachary P. Immunosuppressive effect of vestibulo-cerebellar lesion in rats. *Neurosci lett* 1998; 257(2):89-92.

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

Grijalva I, Guizar-Sahagún G, Hernández JL, Rivera BE and Madrazo I. Incidence of spinal cord injury in patients of Instituto del Seguro Social of metropolitan zone of México city in 1995. *Enviado a Spinal Cord.*

Guttmann L. Spinal shock and reflex behaviour in man paraplegia 1970, 8:100-116

Guyton AC. *Fisiología humana*. Nueva editorial Interamericana, 6a ed. México D.F 1987.

Habib M. *Bases neurológicas de las conductas*. Ed. Masson. Barcelona España 1994.

Hall ED. Free radicals in central nervous system injury. Free radical damage and its control, Elsevier science; 1994: 217-228.

Ham AW y Cormack DH. *Tratado de histología*. Ed. Interamericana, 8a ed. México D.F 1985.

Harvey C, Wilson SE, Greene CG, Berkowitz M. and Stripling TE. New estimates of the direct costs of traumatic spinal cord injuries: results of a nationwide survey. *Paraplegia* 1992; 30:834-850

Ibarra LG, Donati SR, Contreras RV. Lesiones traumáticas de la médula espinal. Estudio epidemiológico. *Cirugia Med. Urg.* 1990; 15:51-55.

Ibarra A, Martínez S, Reyes J, Meza-Lucas A, Mandujano A, Grijalva Y, Madrazo Y and Correa D. Search for an IgG response against neural antigens in experimental spinal cord injury. *Neuroscience* 2000; 96(1):3-5.

Kliesch WF, Cruse JM, Lewis RE, Bishop GR, Brachin B and Lampton JA. Restoration of depressed immune function in spinal cord injury patients receiving rehabilitation therapy. *Paraplegia* Feb. 1996;34(2): 82-90.

Klokker M, Mohr T, Kjaer M, Galbo H and Pedersen BK. The natural killer response to exercise in spinal cord injured individuals. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1998; 79 (1): 106-109.

Kohm AP. and Sanders VM. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG production following Norepinephrine depletion *in vivo*. *J. Immunol.* 1999; 162: 5299-5308.

Ley General de Salud, leyes y códigos de México. Título séptimo. De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Ed. Porrúa. 1995.

Lockhart RD, Hamilton GF y Fyfe FW. *Anatomía humana*. Ed. Interamericana. México D.F 1965.

Lyons M. Immune function in spinal cord-injured males. *J. Neurosci. Nurs.* 1987; 19(1): 18-23.

Madden KS, Felten SY., Felten DL, Sundareshan PR and Livnat S. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity *in vivo* and *in vitro* following chemical sympathectomy. *Brain. Behav. Immunol.* 1989; 3:72-89.

Madden KS, Felten SY, Felten DL, Hardy CA and Livnat S (a). Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration *in vivo* by chemical sympathectomy. *J. Neuroimmunol.* 1994;49:67-75.

Madden KS, Moynihan JA, Brenner GJ, Felten SY, Felten DL and Livnat S ( b ). Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B

cell proliferation and differentiation *in vitro* following chemical sympathectomy. J. Neuroimmunol. 1994;49:77-87.

Madden KS, Sanders VM and Felten DL. Catecholamine influence and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1995; 35:417-448.

Mckinley WO, Johns JS and Musgrove JJ. Clinical presentations, medical complications, and functional outcomes of individuals with gunshot wound-induced spinal cord injury. Am. J. Phys Med. Rehabil. 1999 Mar-Apr; 78(2): 102-107.

Montgomerie JZ. Infections in patients with spinal cord injuries. Clin. Infect. Dis. 1997; 25(6): 1285-1290.

Moreno JR. Respuesta immune y mecanismos de autoinmunidad. Noriega editores. México D.F 1980.

Nash MS. Immune responses to nervous system decentralization and exercise in quadriplegia. Med. Sci. Sports Exercise 1994; 62(2): 164-171.

Okada M, Guo SY, Sunagawa H and Hisamitsu T. Denervation of the cervical sympathetic nerve inhibited the splenic natural killer cell activity by modulation of the splenic sympathetic nerve activities in rats. Masui 1999 Jul; 48(7): 787-790.

Panter SS, Yum SW and Faden AI Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. Ann. Neurol. 1990; 27: 96-99.

Panuncio AL, De la Peña S, Gualco G and Reissenweber N. Adrenergic innervation in reactive human lymph nodes. J. Anat. 1999; 194(pt 1): 143-146.

Paxinos G. The rat nervous system. Academic press. Second edition. U.S.A 1995.

Price C, Makintubee S, Herndon W and Istre GR. Epidemiology of traumatic spinal cord injury and acute hospitalization and rehabilitation charges for spinal cord injuries in Oklahoma, 1988-1990. Am. J. Epidemiol. 1994; 139:37-47.

Rish BL, Dilustro JF, Salazar AM, Schwab KA and Brown HR. Spinal cord injury: a 25-year morbidity and mortality study. *Mil. Med.* 1997; 162(2): 141-148.

Roitt Y, Brostoff J y Male D. *Inmunología*. Ed. Harcourt Brace, 4a ed. Madrid España 1994.

Segal JL, Gonzales E, Yousefi S, Jamshidipour L, and Brunnemann SR. Circulating levels of IL-2R, ICAM-1, and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1997; 78:44-47.

Stites DP. *Inmunología básica y clínica*. Ed. El manual moderno. 8a. ed. México D.F. 1996.

Stocker R and Burgi U. Respiratory problems after injuries of the cervical spine. *Schweiz. Med. Wochenschr* 1998; 128(39): 1462-1466.

Sugarman B, Brown D and Musher D ( a ). Fever and infection in spinal cord injury patients. *JAMA* 1982; 248:66-70.

Sugarman B, Brown D, and Musher D ( b ). Infectious complications in patients with spinal cord injury. *JAMA* 1982; 248: 83-84.

Tang Y, Shankar R, Gamelli R, and Jones S. Dynamic norepinephrine alterations in bone marrow: evidence of functional innervation. *J. Neuroimmunol* 1999; 96(2): 182-189.

Tator CH and Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* 1991; 75:15-26.

Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain. Pathology* 1995; 5:407-413.

Testut L y Latarjet A. *Compendio de anatomía descriptiva*. Ed. Ciencia y cultura latinoamericana. México D.F.1997.

Tortora GJ. Principios de Anatomía y fisiología. Ed. Harla. México D.F 1984.

Travlos A, Anton HA and Wing PC. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. Arch. Phys. Med. Rehabil. 1994; 75:293-296.

Valadez J. Neuroanatomía funcional. Laboratorio Universitario de Neuroanatomía funcional. INN y UNAM Marzo 1998.

Waxman SG. Neuroanatomía correlativa. Ed. Interamericana, 10a ed. México D.F. 1997.

Whiteneck GG, Charlifue SW, Frankel HL, Fraser BM, Gardner BP, Krishnan KR, Gerhart KA, Menter RR, Nuseibeh Y, Short DJ and Silver JR. Mortality, morbidity and psychosocial outcomes of persons spinal cord injured more than 20 years ago. Paraplegia 1992; 30:617-630.

Williams PL and Warwick R. Anatomía Tomo II. Ed. Churchill Livingstone. Madrid España 1992.

Woiciechowsky C, Schoning B, Daberkow N, Asche K, Lanksch WR, Docke WD and Volk HD. Brain IL-1 beta increases neutrophil and decreases lymphocyte counts through stimulation of neuroimmune pathways. Neurobiol. Dis. 1999 Jun; 6(3): 200-208.

Yanguo H, Cechetto DF and Weaver LC. Spinal cord regulation of sympathetic activity in intact and spinal rats. Am. J. Physiol. 1994; 266(35): H1485-H1493.

Young W, Yen V and Blight A. A extracelular calcium ionic activity in experimental spinal cord contusion. Brain Res. 1982; 253:105-113