

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

"EFECTO DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA POR
COMPRESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL
TORÁCICA SOBRE EL REFLEJO
MONOSINÁPTICO ESPINAL Y EL
PERIFÉRICO DE HOFFMANN EN LA RATA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CELIA REYES LEGORRETA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

DRA. BERTHA SEGURA ALEGRÍA

DR. JOSÉ MARÍA FARIAS SÁNCHEZ

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2010



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de febrero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **REYES LEGORRETA CELIA** con número de cuenta **86344146** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA POR COMPRESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL TORACICA SOBRE EL REFLEJO MONOSINAPTICO ESPINAL Y EL PERIFERICO DE HOFFMANN EN LA RATA"**.

Realizada bajo la dirección de la: **DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN**

Presidente:	DR. JOSE BARGAS DÍAZ
Vocal:	DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal:	DRA. BERTHA SEGURA ALEGRÍA
Vocal:	DR. JOSÉ MARIA FARIAS SÁNCHEZ
Secretario:	DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN
Suplente:	DR. BENJAMIN FLORAN GARDUÑO
Suplente	DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 07 de abril de 2010.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular al Posgrado en Ciencias Biológicas.

Para la realización del trabajo se contó con el apoyo de una beca otorgada por CONACYT, además de las facilidades proporcionadas por la Facultad de Medicina, UNAM. La parte histológica de este proyecto se llevó a cabo en los laboratorios Sensorial I y II del Departamento de Fisiología a cargo de la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio 11 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN a cargo del Dr. Ismael Jiménez Estrada.

Asimismo se contó con el apoyo del Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, en el Laboratorio de Fisiología Neuromuscular, Torre de Investigación a cargo del Dr. Alberto E. Nuño Licona para los efectos de este trabajo.

El trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán y la co-dirección del Dr. Ismael Jiménez Estrada.

El comité tutorial estuvo conformado por:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

Dr. José Bargas Díaz.

Dr. Gabriel Guizar Sahagún.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por la confianza que siempre me brindó y por la dirección en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada le agradezco por todo el tiempo dedicado durante mi estancia en su laboratorio y por la confianza y apoyo otorgado desde el primer día que entré a formar parte de su grupo de trabajo. Sin su co-tutoría no podría haber sido posible concluir este proceso.

A la Dra. Bertha Segura Alegría por su apoyo constante e incondicional.

Al Dr. Alberto E. Nuño Licona por brindarme las facilidades de tiempo sin restricciones en la elaboración de este trabajo.

Al Químico José Carlos Guadarrama Olmos por compartir sus conocimientos y tiempo en el apoyo técnico y cuidados de los animales para la ejecución de los experimentos y poder contar con su amistad.

Al Ingeniero Ricardo Arroyo Rivera con cariño, le agradezco su apoyo constante, su confianza y paciencia brindada sin restricciones.

Al Ingeniero Efrén Alatorre Miguel por su apoyo y asesoría estadística durante el presente trabajo, por sus comentarios y por el tiempo y amistad brindada.

Al Biólogo Dagoberto por el apoyo brindado en la parte histológica de este trabajo así como por su amistad.

A la Prof. de Lenguas Extranjeras Ma. Josefina Bolado por sus valiosas sugerencias y correcciones al manuscrito.

A la Pasante en Contaduría Magda Herrera, a la Sra. Virginia Barrios y al Sr. Luis Alberto Maya, por el apoyo y tiempo brindado para llegar a la obtención de este trabajo.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado en la revisión del manuscrito y sus valiosas aportaciones para enriquecer el trabajo: Dr. Jose Bargas Díaz, Dr. Ismael Jiménez Estrada, Dra. Bertha Segura Alegría, Dr. José María Farías Sánchez, Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dr. Benjamín Florán Garduño, Dra. Margarita Martínez Gómez.

A todas aquellas personas de las cuales recibí palabras de ánimo a lo largo de la elaboración de este trabajo.

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO

A mis Padres: **Gregorio y Celia** con todo mi cariño porque me enseñaron a no tratar de lograr todo de una sola vez ya que la vida puede tener momentos difíciles y no es necesario añadir frustraciones a la lista, me enseñaron a avanzar dando pasos de uno en uno y tratar de lograr una meta a la vez, de esa manera descubrí lo que es un verdadero logro. Gracias por el apoyo incondicional en todas mis decisiones.

A mis Hermanos: Gregorio, Reyna, José Luis, Julio y Elizabeth por el inmenso cariño, comprensión y confianza que me han brindado.

A mis sobrinos: Gabriela, Roberto, Mariana, Adriana, Jonathan, Maribel, Claudia y Elizabeth así como a mis sobrinos nietos Paco y Alison porque me dan la energía requerida para seguir adelante siempre sonriendo al futuro.

A mis amigas Clementina Miguel, Mayté Cervantes, Angélica Flores, Aidee Morales y Eréndira del Ángel por su invaluable amistad y por levantar mi ánimo cuando más lo he necesitado.

A mi amiga Carmen Vilchis† que aunque ya no se encuentra entre nosotros está en mi corazón y sé que comparte este logro conmigo.

A mis amigas Antonieta Vázquez y Lucía Carreto por la amistad que nos ha unido durante todos estos años.

A mis amigas Blanca y Alicia por el placer de haberlas conocido y contar con su amistad.

A Salvador Hernández por su apoyo en todo este proceso.

A mis amigos José Juan Ramírez, José Carlos de la Fuente, Víctor Rodríguez, Francisco Estrada porque siempre he recibido una palabra de aliento y apoyo, demostrando su amistad incondicional.

A mis Amigos: Gina Lorandi, Martha Martínez, Guillermina Buendía, Rocío Martínez, Ricardo Arroyo, Efrén Alatorre, Rogelio Paniagua, Oscar Velasco, Carlos Cruz, Verónica Sánchez, Antonio Hernández, Efrén Sánchez, José Jesús Guzmán, por ser parte de éste logro y porque siempre me han brindando su amistad.

A todos aquellos amigos los cuales no son mencionados pero no por ello son menos importantes.

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
ANATOMIA FUNCIONAL DE LA MÉDULA ESPINAL	5
LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL	13
PARAPLEJIA Y TETRAPLEJIA	14
CUADRO CLÍNICO	15
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LAS LESIONES TRAUMÁTICAS DE LA MÉDULA ESPINAL	16
MODELOS POR CONTUSIÓN	17
MODELOS POR COMPRESIÓN	19
MODELOS POR SECCIÓN	21
MODELOS POR LESIÓN VASCULAR	22
TRASTORNOS PRODUCIDOS POR LESIONES ESPINALES	23
TRASTORNOS DE LA FUNCIÓN MOTORA	23
TRASTORNOS DE LA SENSIBILIDAD	24
TRASTORNOS VEGETATIVOS	24
CARACTERÍSTICAS DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA	25
DAÑO PRIMARIO Y SECUNDARIO	25
ANTECEDENTES	39
PROBLEMA	43
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS GENERALES	43

OBJETIVOS PARTICULARES	43
PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS	44
PROCEDIMIENTOS GENERALES	44
PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR LA LESIÓN ESPINAL	
POR COMPRESIÓN	45
EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA MOTORA	47
REGISTRO DE LA ACTIVIDAD REFLEJA	52
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
PERFUSIÓN	55
HISTOLOGÍA	56
RESULTADOS	57
CARACTERIZACIÓN DE LA LESIÓN POR COMPRESIÓN DE LA	
MÉDULA ESPINAL TORÁCICA	57
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES GENERALES	79
ANEXOS	81
ANEXO 1. ARTÍCULO	81
ANEXO 2. ESCALA BBB	86
ANEXO 3. MÉTODO DE VIOLETA DE CRESILO PARA	
SUSTANCIA DE NISSL	87
ANEXO 4. TABLAS DE RESULTADOS.	88
4.1. PRUEBA BBB	88
4.2. MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA O DE EQUILIBRIO	88
4.3. ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA	89

4.4. REFLEJO MONOSINÁPTICO Y REFLEJO H	90
4.5. COEFICIENTE DE VARIACIÓN	90
4.6. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	91
BIBLIOGRAFIA	92

RESUMEN

Uno de los traumatismos más frecuentes que se atienden en la clínica es la lesión de la médula espinal a nivel torácico. Los efectos que ella produce han sido estudiados desde muy diversos puntos de vista, entre los que se encuentran, el morfológico, el conductual y el electrofisiológico. Sin embargo poco se conoce sobre el efecto que produce una lesión torácica por compresión sobre la actividad refleja de la médula espinal.

El presente trabajo tiene como objetivo el establecer las posibles alteraciones que producen lesiones por compresión de la médula espinal a nivel torácico, sobre la amplitud del reflejo monosináptico (RMS) y el reflejo de Hoffman (reflejo H), registrados simultáneamente en la rata.

Para evaluar el efecto de la lesión espinal torácica por compresión en rata, analizamos las respuestas electroneurográficas y electromiográficas provocadas por la estimulación selectiva del nervio plantar lateral y registradas en el mismo nervio y en el músculo plantar lateral, respectivamente. Asimismo, determinamos el grado de la lesión traumática mediante el análisis histológico de la médula espinal torácica y el comportamiento motor de distintos grupos de animales control y experimentales.

Se utilizaron ratas Wistar adultas (peso: 180-200g); en 7 grupos (n=5): a) Control; b) 3 grupos con falsa lesión y con distintos períodos post-operación (3, 15 y 30 días) y c) 3 grupos experimentales y analizados en distintos días post-lesión (3, 15 y 30 días), las cuales fueron anestesiadas con Ketamina (150 mg/kg) previamente a la sesión experimental (ya sea para la lesión o para el registro electrofisiológico).

La lesión por compresión de la médula espinal se realizó mediante la técnica del catéter de Fogarty, la cual se considera produce lesiones espinales con mayor grado de certidumbre en la rata (Martin et al., 1996). Se emplearon tres métodos de evaluación de la actividad motora de la rata (Metz et al., 2000) para establecer el grado de la lesión espinal desde el punto de vista del comportamiento motor de los animales, siendo estos: a) Método de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB; Basso et al., 1995), b) Método de la barra fija o de equilibrio (Hicks y D'Amato, 1975) y c) Método del análisis cinemático de la marcha sin restricciones (Rossignol, 1996; Luque, et al. 2007). En la fase de registro electrofisiológico, se expuso el nervio plantar lateral de la extremidad posterior izquierda y se le aplicaron pulsos de corriente de intensidad supra-máxima (3 veces umbral) mediante un par de electrodos finos de plata (uno cada 8 segundos). Se utilizó otro par de electrodos para registrar el potencial de acción compuesto (PAC) y del RMS en el mismo nervio plantar lateral, mientras que las respuestas electromiográficas onda M y reflejo H fueron registradas

con un par de electrodos finos insertados en el músculo plantar lateral (entre el 4° y 5° dígitos de la pata posterior).

Los experimentos realizados en el grupo de animales con lesión por compresión de la médula espinal, muestran una ligera recuperación en las pruebas de campo abierto (BBB), así como en el análisis de las barras de equilibrio a los 15 y 30 días posteriores a la lesión con respecto al grupo control. En cuanto al análisis de la caminata, nuestros resultados indican que los animales lesionados de 15 y 30 días recuperan su capacidad ambulatoria, siendo ésta muy similar a la del grupo control, a pesar de que se manifiesta histológicamente una clara lesión en la médula espinal. Los animales con trauma por compresión a los 3 días post-lesión pierden toda actividad motora en comparación con los grupos control, tal como muestran los tres métodos utilizados.

A los 3 días post-lesión, la estimulación del nervio plantar lateral produjo RMS cuya amplitud promedio manifestó una clara facilitación ($144\pm 17\%$) mientras que el reflejo H presentó una depresión en su amplitud ($53\pm 17\%$), con respecto a los mismos reflejos pero registrados en los animales control. En cambio, los RMS y H registrados en animales con 15 y 30 días post-lesión presentaron una significativa facilitación en su amplitud (RMS: $317\pm 30\%$ y $161\pm 21\%$ RH: $190\pm 50\%$ y $400\pm 19\%$, respectivamente), presentando hiperreflexia con respecto a los registrados en los grupos de animales control y de falsa lesión.

Aunado a lo anterior, los reflejos MS y H variaban considerablemente de amplitud de estímulo a estímulo. Sin embargo, las fluctuaciones de amplitud del RMS no mostraron correlación lineal con las fluctuaciones de amplitud del reflejo H registradas simultáneamente, lo cual sugiere que ambos reflejos están sujetos a mecanismos de variabilidad diferentes, a pesar de que ambos eventos son manifestaciones de la actividad del mismo conjunto de neuronas motoras en la médula espinal.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se propone que el aumento en la amplitud del reflejo monosináptico es el resultado de un incremento en la excitabilidad de las motoneuronas del músculo plantar lateral, el cual a su vez podría estar asociado a una reducción en la entrada sináptica inhibitoria, segmental o descendente, que incide sobre tales motoneuronas espinales, mientras que los cambios en la amplitud del reflejo H podrían ser resultado de varios procesos, tanto espinales como periféricos (por ejemplo: alteraciones en los mecanismos de liberación en la unión neuromuscular).

SUMMARY

One of the most frequent traumatisms that are treated in the clinic is the thoracic level lesion of the spinal cord. The effects that it causes have been studied from very diverse points of view, including the morphological, behavioral, biochemical, molecular and electrophysiological ones, among others. However, little is known about the effect that produces a thoracic lesion by compression upon the reflex activity of the spinal cord.

The aim of the present work is to establish the possible alterations evoked by a severe lesion by compression at the spinal thoracic level on the amplitude of the monosynaptic (MSR) and H reflexes simultaneously recorded in the rat.

To evaluate the effect of the spinal thoracic lesion by compression in rat, we analyzed the electroneurographic and electromyographic responses provoked by the selective stimulation of the plantar lateral nerve and recorded in the same nerve and in the plantar lateral muscle, respectively. Also, we determined the magnitude of the traumatic lesion by means of histological analysis of the spinal thoracic region affected (T8) and the motor activity of experimental and control animals.

Mature Wistar rats (weight: 180-200g) were randomly distributed in 7 groups (n=5 per group): a) one group Control; b) 3 sham groups, with different post-operation periods of time (3, 15 and 30 days) and c) 3 experimental or lesioned groups, with different post-lesion times each (3, 15 and 30 days). Before the experimental session, either for lesioning or for electrophysiological recording, the animals were anesthetized with ketamine (150 mg / kg).

The lesion by compression of the spinal cord was carried out by means of the Fogarty catheter technique, which is considered to produce spinal lesions in the rat with a higher degree of certainty (Martin et al., 1996). Also, we use of three methods of evaluation of the motor activity of the rat (Metz et al., 2000) to establish the degree of the spinal lesion from the standpoint of the animals' motor behavior: a) by means of the Basso, Beattie and Bresnahan method (BBB; Basso et al., 1995); b) by the method of the fixed or balance bar (Hicks and D'Amato, 1975); and, c) by the Kinematic analysis of gait without restrictions (Rossignol, 1996; Luque et al. 2007). Subsequently to the motor tests, the rats were anesthetized and the lateral plantar nerve was exposed and stimulated with pulses of electrical current of supramaximal intensity (3 times threshold), applied one every 8 seconds and delivery through a couple of fine silver wire electrodes, Another couple of electrodes was used to record the compound action potential (CAP) and the MSR potential in the same nerve (lateral plantar),

while the electromyographical responses, M wave and H reflex were recorded with a couple of fine electrodes inserted in the lateral plantar muscle (between the 4th and 5th digits of rear paws).

In regard of control and sham groups, the animals with trauma by compression lose all motor activity at the third post-injury day, as demonstrated by the three motor behavior methods used. However, rats with 15 and 30 post-lesion days showed a slight, but consistent, recovery of motor activity as determined either by the BBB and equilibrium bars methods. At these post-lesion days, injured animals recover their ambulatory capacity similar to that of the control and sham groups although a clear lesion is manifested histologically in the thoracic spinal cord.

At 3 post-lesion day, single stimulus pulses applied to the lateral plantar nerve produced MSR whose average amplitude showed a clear facilitation ($144 \pm 17\%$) while the H-reflex presented some depression in its amplitude ($53 \pm 17\%$) with respect to the reflexes of the control animals. In contrast, MSR and H reflexes recorded in animals with 15 and 30 post-lesion days showed a significant facilitation in amplitude (MSR: $317 \pm 30\%$ and $161 \pm 21\%$ RH: $190 \pm 50\%$ and $400 \pm 19\%$, respectively), presenting hyperreflexia, with respect to those recorded in control and sham rats. Moreover, MSR and H-reflexes fluctuate considerably in amplitude from stimulus to stimulus. However, MSR amplitude fluctuations showed no linear correlation with the amplitude fluctuations of the H-reflex, suggesting that both reflexes are subjected to different variability mechanisms, although both events are a manifestation of the activity of the same set of motor neurons.

From the results obtained in this study, we propose that the facilitation in the amplitude of the monosynaptic reflex is the result from an increase in the excitability of the lateral plantar spinal motoneurons, which in turn could be associated to a reduction in the segmental or descending synaptic inhibitory input to motor neurons, while changes in H reflex amplitude could result from a combination of several processes, occurring at spinal and peripheral levels (e.g., changes in transmitter release mechanisms at the neuromuscular junction).

INTRODUCCIÓN

Las lesiones neurológicas, y en especial los traumatismos medulares ejemplifican, en buena medida, la impotencia y la frustración del hombre ante la incapacidad de restaurar tanto la libertad de movimiento como la de sensación pérdidas tras una lesión. Las secuelas producidas por éstas, son en momentos inamovibles y perdurables hasta el final de la vida del paciente, sin que éste tenga posibilidad de mejora. Es por ello que, desde la ciencia y otras disciplinas afines se lucha para mejorar la calidad de vida del paciente con lesión medular, ya sea por la rehabilitación e inserción social, o por la búsqueda de terapias que permitan la regeneración del sistema nervioso, de tal forma que devuelvan al paciente la autonomía perdida tras la lesión.

ANATOMIA FUNCIONAL DE LA MEDULA ESPINAL

A lo largo de todo su eje longitudinal, la médula espinal mantiene una organización segmentaria, donde cada segmento mantiene un patrón estructural parecido. De este modo, de cada segmento espinal surgen bilateralmente un par de fascículos nerviosos (raíces espinales) que conectan las estructuras del cuerpo con las neuronas espinales. Los axones sensoriales penetran en la médula espinal por las raíces dorsales, mientras que los axones motores y autónomos parten de las raíces ventrales para inervar la musculatura y los órganos internos del cuerpo. Esta conectividad hace que la médula espinal constituya el mayor circuito nervioso del cuerpo, a través del cual las señales motoras y sensoriales conectan recíprocamente las estructuras del encéfalo con el resto del cuerpo

Para poder realizar con éxito su función, la médula espinal requiere en primer lugar de una alta especialización morfológica y fisiológica de las células que la componen, y de una precisa ordenación histológica de éstas. Por este motivo, la médula está organizada en forma

de tractos descendentes y ascendentes compuestos por axones íntimamente entremezclados en una malla de células gliales (Suzuki y Raisman, 1992). Una sección transversal de la médula espinal muestra un área central, formada por la sustancia gris donde se ubican los cuerpos celulares de las neuronas espinales (Fig. 1).

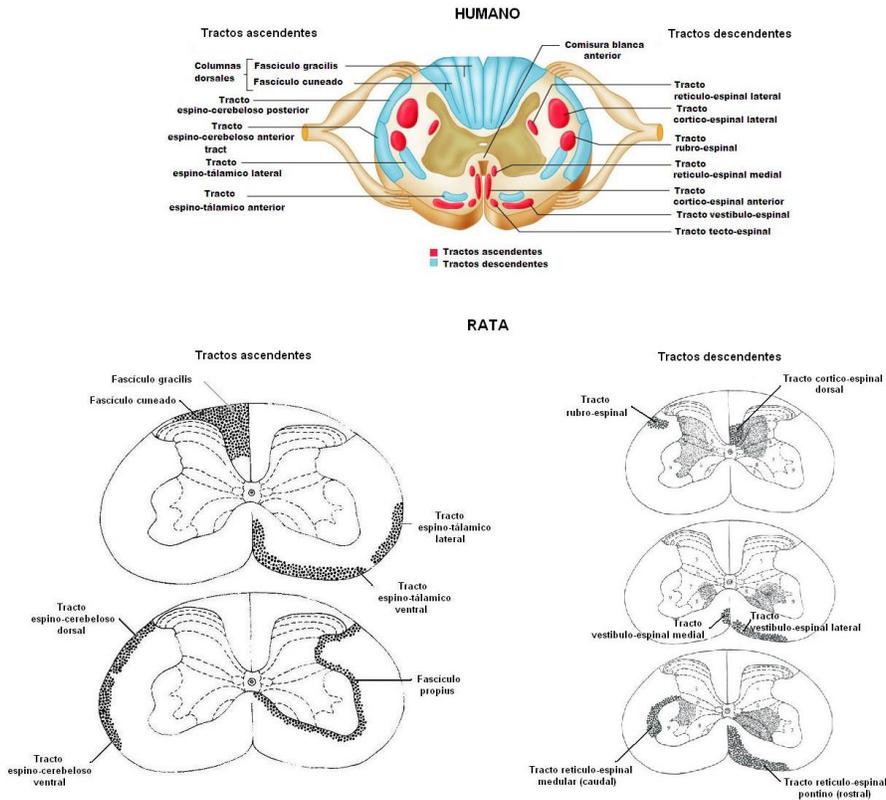


Figura 1. Tractos ascendentes y descendentes en la médula espinal del humano y de la rata (modificado de Watson y Harvey, 2009).

En las astas dorsales se localizan los núcleos de neuronas que intervienen en el relevo y procesamiento sensorial, en las regiones intermedias se encuentran las neuronas del sistema nervioso autónomo, mientras que en las astas ventrales se ubican las interneuronas y las columnas de motoneuronas, que son la última estación de control de los comandos motores. La sustancia gris está tangencialmente rodeada de sustancia blanca, la cual está compuesta por haces de fibras nerviosas, organizadas formando tractos espinales,

que conectan las neuronas espinales con los núcleos neuronales del tronco y de la corteza cerebral (Fig. 1).

Los tractos ascendentes espinales están agrupados según su ubicación en el parénquima medular. Así, mientras que por el cordón ventrolateral ascienden los axones que cruzan la línea media a nivel de la comisura anterior y finalizan en diversos territorios encefálicos contralaterales, los axones que ascienden ipsilateralmente por el cordón posterior finalizan mayoritariamente en el bulbo raquídeo (Fig. 1 y 2).

Las vías del cordón posterior contienen aferencias primarias de las raíces dorsales y axones de neuronas espinales. Las primeras forman la vía directa de los cordones posteriores que acaban en los núcleos gracilis y cuneado (Fig. 1). Desde aquí se proyectan axones al tálamo, en donde hacen relevo para finalizar en la corteza somatosensorial (Fig. 2). Por esta vía se transmite información propioceptiva, así como la implicada en procesamientos complejos como la discriminación táctil entre dos puntos, la vibración o la intensidad de la presión. Las fibras que proceden de las neuronas propio-espinales forman la vía postsináptica del cordón posterior, y sus axones hacen contacto sináptico con los núcleos del tálamo. Por esta vía se procesa información propioceptiva y táctil (Armengol 1999, Kelly 1985, Martin 1998, Tracey 1995). De acuerdo a su área de terminación, los tractos en el cordón ventrolateral se agrupan en tres sistemas: los espino-talámicos, que desembocan en el tálamo, los espino-reticulares que finalizan en la formación reticular y los espino-cerebelosos que terminan en el cerebelo y en núcleos relacionados con él (Fig. 2).

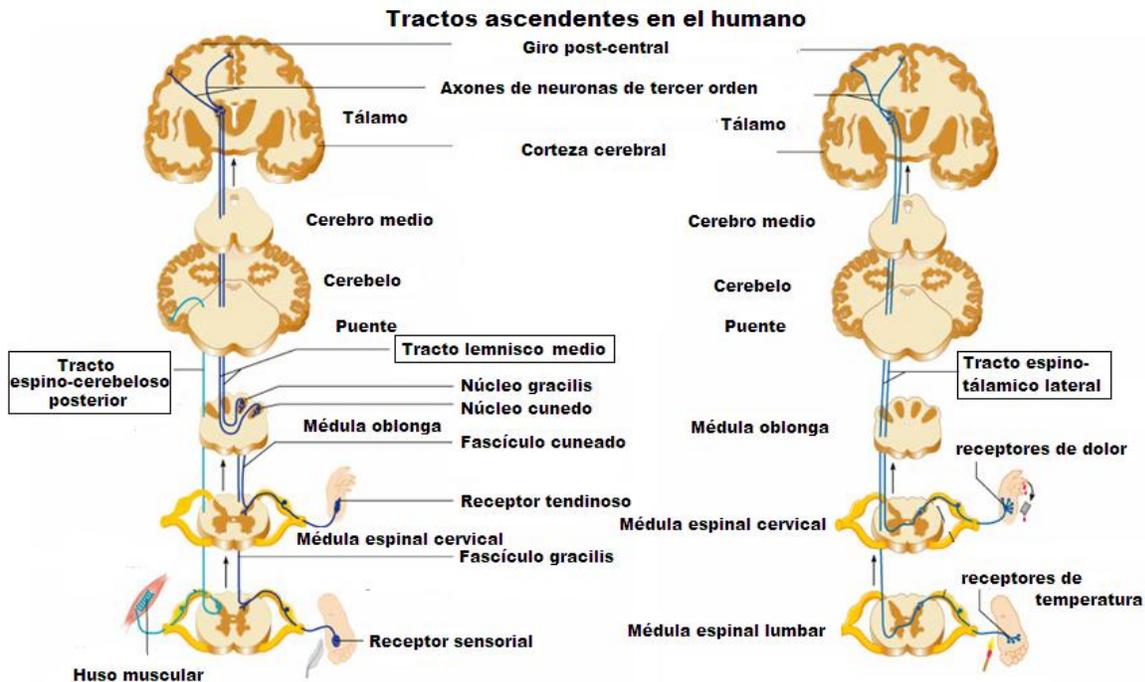


Figura 2. Principales tractos ascendentes en el Sistema Nervioso del humano

Los dos primeros tractos conducen sensibilidad termoalgésica, táctil y de presión, mientras que los últimos transmiten información propioceptiva.

Los tractos descendentes filogenéticamente más antiguos constituyen el sistema descendente medial, el cual está compuesto por neuronas del tronco del encéfalo que proyectan sus axones ipsilateralmente por los funículos ventrales y ventrolaterales para efectuar sinápsis con las interneuronas y motoneuronas espinales situadas en la porción más medial de las astas ventrales. A este sistema pertenecen los tractos vestibuloespinal, reticuloespinal y tectoespinal (Fig. 3 A y B para el humano), los cuales ejercen distintas acciones sinápticas sobre las motoneuronas espinales.

Los haces rubro-espinal y retículo-espinal (proveniente de la médula oblonga) excitan las motoneuronas flexoras e inhiben las motoneuronas extensoras, mientras que los haces retículo-espinal pontino y los vestibulo-espinales excitan las motoneuronas extensoras e inhiben las motoneuronas flexoras (Schmidt, 1983).

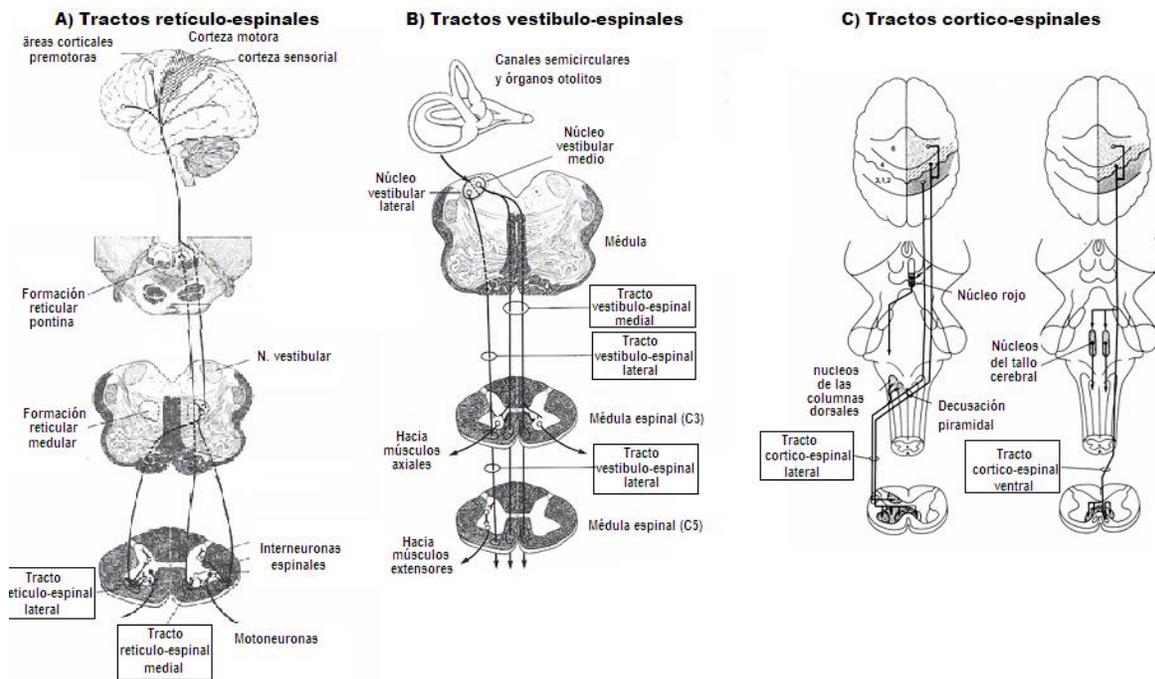


Figura 3. Diagramas de los tractos descendentes (A) retículo-espinales, (B) vestibulo-espinales y (C) cortico-espinales en el Sistema Nervioso del humano.

El tracto tectoespinal se origina en los mamíferos de células en el colículo superior y proyectan a la médula espinal cervical (Nyberg-Hansen, 1964). Este tracto se encuentra involucrado primariamente en el control de los movimientos de la cabeza y del cuello.

La delicada y organizada interacción de las acciones sinápticas de los tractos descendentes sobre las interneuronas y motoneuronas espinales da como resultado el mantenimiento básico de la postura y el equilibrio en los individuos.

En cambio, el control fino de los movimientos, sobre todo el de los dígitos de las extremidades, está regulado por los tractos filogenéticamente más modernos que son el haz rubroespinal y los haces corticoespinales (Fig. 3 B), los cuales forman el sistema lateral (Kuypers, 1981). El tracto rubroespinal está formado por los axones de las neuronas del núcleo rojo del tronco encefálico, los cuales decusan y descienden contra lateralmente por el funículo lateral para hacer sinápsis directa o indirectamente con las motoneuronas más

lateralizadas de las astas ventrales. En cambio, el tracto corticoespinal se encuentra compuesto por los axones proyectados por las células piramidales de la V capa de la corteza motora. Una rama de éstos decusa en el tronco del encéfalo y desciende por la parte más dorsal del funículo lateral para realizar sinapsis con los núcleos motores espinales, mientras que, una porción más pequeña desciende ipsilateralmente por el cordón ventral de la médula espinal en el humano (Fig. 1A y Fig. 3C). Aunque esta distribución estructural es compartida por todos los mamíferos, existen pequeñas diferencias anatómicas características de cada grupo. La más notoria es, por ejemplo, que a diferencia de los humanos, en los roedores el tracto corticoespinal desciende por la parte más ventral del funículo dorsal (Bret al., 1997; Fig. 4).

A pesar de que la estructura y función de los circuitos espinales son similares en los diferentes grupos de animales, la propia historia natural de cada grupo, ha forjado diferencias importantes entre ellos. En este sentido, a lo largo de la evolución, los seres vivos han ido modificando y perfeccionando las propiedades de los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC), adecuándolos de la mejor manera posible a las exigencias y al control del medio ambiente donde viven. Dado que el hábitat de los grupos zoológicos más antiguos fue el medio marino, no necesitaron del desarrollo de complejas extremidades para la ejecución de los movimientos, por lo que el control motor se limitó a movimientos sencillos, modulados fácilmente por los núcleos del tronco del encéfalo. En cambio, la colonización del medio terrestre, y la subsiguiente aparición de las extremidades, requirió del desarrollo de nuevas estructuras encefálicas que pudieran integrar eficazmente los nuevos comandos motores necesarios para la locomoción, y ésta fue la causa de la aparición del sistema descendente lateral, básicamente del tracto rubro espinal. La evolución siguió su curso, y los animales terrestres desarrollaron maniobras motoras más complejas, que requirieron un

procesamiento sensori-motor más refinado. Por este motivo, la corteza cerebral y las estructuras emparentadas con ella adquirieron mayor relevancia. El aumento de la superficie neural y de las conexiones sinápticas permitió la elaboración de comandos más complicados y de un aumento en el control fino de las extremidades (Holstege, 1995). Lo anterior se ve reflejado en el incremento de la proyección de los tractos cortico-espinales en distintos grupos filogenéticos de vertebrados terrestres. En los roedores (por ejemplo: la zarigüeya o la rata), la proyección del haz cortico-espinal discurre por las columnas dorsales, por debajo de los fascículos gracilis y cuneado, mientras que en los felinos (como el gato), el tracto cortico-espinal es poco profuso y se localiza en el cuadrante dorsolateral de la médula espinal (Fig. 4). En cambio, el haz cortico-espinal en los primates (Mono Rhesus, Chimpance y hombre) es muy profuso y abarca la mayor parte de los cordones laterales de la médula espinal (Fig. 4).

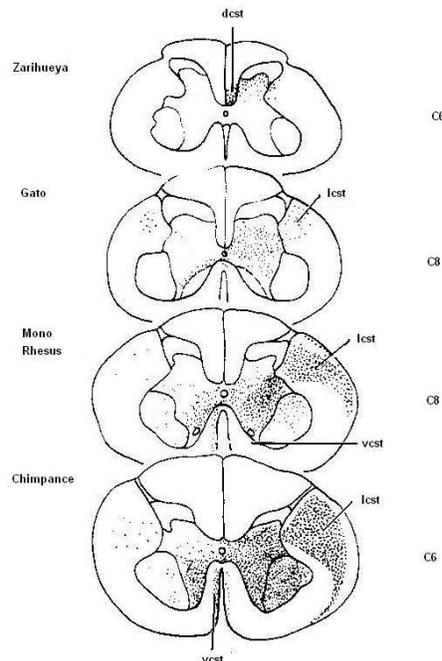


Figura 4. Tractos cortico-espinales en la médula espinal de distintas especies de vertebrados terrestres (modificado de Watson y Harvey, 2009).

Es por ello que, en las especies animales más avanzadas, como los primates o los humanos, recaiga sobre la corteza motora y el tracto corticoespinal un papel imprescindible para la locomoción y la generación de movimientos voluntarios, mucho más relevante que el de cualquier otro núcleo y tracto espinal motor. Prueba de ello es que lesiones leves del tracto corticoespinal provocan paraplejia o tetraplejia (Nathan, 1994).

En los mamíferos más antiguos, el control de la locomoción recae en estructuras del tronco cerebral (correspondientes a la región mesencefálica locomotora), por lo que lesiones del tracto corticoespinal o rubroespinal provocan déficits motores ligeros (Schucht et al., 2002), mientras que la paraplejia o tetraplejia se consigue mediante la afectación de las vías del sistema medial.

Además, las vías descendentes de los roedores y especies animales emparentadas presentan una gran plasticidad, debido a que si se provocan lesiones espinales en las que tan sólo se preserva un 5% del parénquima ventral medular, los animales mantienen sus habilidades locomotoras (Fehlings y Tator, 1995). En cambio, la capacidad de recuperación y/o mantenimiento de las funciones motoras después de una lesión espinal en mamíferos más modernos se ve notoriamente reducida, siendo en los primates donde se presentan mayores déficits motores ante traumatismos espinales (Majczynski y Slawinska, 2007).

Por último, hay que remarcar que la visión actual de la médula espinal ha dejado de ser la de una compleja red de soporte para el desarrollo de reflejos involuntarios y para la transmisión de información, sino que se entiende como un conjunto de núcleos y vías nerviosas que, aunque anatómicamente no estén localizados en el encéfalo, desempeñan funciones complejas destinadas al diseño, control y modulación sensori-motora (Bizzi et al., 2000, Wolpaw y Tennissen, 2001, Raintenau y Schwab, 2001). Por lo anterior, es de resaltar que cualquier manipulación o traumatismo que presente la médula espinal causará

alteraciones de consideración en la actividad neuronal de la misma, así como en la realización de diversas pautas motoras, tales como el mantenimiento de la postura, el equilibrio y la locomoción, entre otras.

LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

La lesión traumática de la médula espinal es un problema de salud pública y constituye uno de los problemas más importantes en Rehabilitación. En la mayoría de los casos afecta a la población joven, en edad económicamente activa (de 20 a 35 años), causando profundos efectos económicos, físicos y emocionales, por las secuelas permanentes y discapacidades, que obliga a los que la sufren a cambiar radicalmente de vida, aparte del costo asistencial y social que produce.

Las causas son diversas: las lesiones traumáticas constituyen entre el 70% y el 81.5% y su impacto se ha visto incrementado en los últimos años debido a la incidencia creciente de lesión medular como consecuencia de accidentes automovilísticos (Mazaira, et. al. 1997), alcanzando esta causa el 52.4% de todas las lesiones medulares (Mazaira, et. al. 1997), sin dejar a un lado las lesiones relacionadas con actos de violencia, que a menudo, involucran armas de fuego y armas blancas; accidentes deportivos; caídas y accidentes laborales. Entre las causas no traumáticas, se encuentran las de origen tumoral, infecciosa o por accidentes vasculares.

Los datos sobre incidencia de lesión medular son muy variables, dependiendo del país y del autor que los reporte. En Estados Unidos se ha calculado entre 10,000 y 12,000 casos nuevos de lesión medular al año (Fehlings y Tator, 1999), entre 30 y 32.1 por millón de habitantes (DeVivo, et. al. 1980; Kraus, et. al. 1975), y si se cuentan las víctimas que mueren antes de llegar al hospital la cifra alcanza hasta el 43 o 55 casos por millón de habitantes

(Surkin, et. al. 2000). En Europa, la incidencia oscila entre 10 y 20 por millón de habitantes (Mazaira, et. al. 1997). En México se ha informado que la incidencia anual de traumatismos medulares en el Distrito Federal es de aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes (Pardini, 1998; Salud Pública Méx, 2007).

En cuanto a la edad, es más frecuente en varones jóvenes de entre 15 y 20 años de edad, siendo la edad media 29.7 años y la mediana 25 años (Mazaira, et. al. 1997; Stover y Fine, 1986; 1987).

PARAPLEJIA Y TETRAPLEJIA

La Lesión medular consiste en la separación total o parcial de una parte del cordón espinal del resto del Sistema Nervioso Central (SNC). La porción de médula aislada puede funcionar de modo independiente y responder de manera refleja a los estímulos que le llegan.

La *American Spinal Injury Association (ASIA)* define **Paraplejia** como “término que se refiere al déficit o pérdida de función motora y/o sensitiva en los segmentos torácicos, lumbares o sacros de la médula espinal (pero no cervicales), secundarios al daño de los elementos neurales del canal raquídeo. En la paraplejia, la función de los brazos está preservada, pero dependiendo del nivel de lesión, el tronco, piernas y órganos pélvicos estarán implicados. El término también se refiere a las lesiones de cola de caballo y cono medular, pero no a lesiones del plexo lumbosacro o de nervios periféricos fuera del canal neural” (ASIA, American Spinal Injury Association, 1992).

También se define a la **Tetraplejia** como “la pérdida de función motora y /o sensitiva en los segmentos cervicales de la médula espinal, que ocasiona un déficit funcional en los brazos, tronco, piernas y órganos pélvicos. No incluye lesiones del plexo braquial ni de los nervios periféricos fuera del canal medular”.

Etiología de la lesión medular.

Las causas de la lesión medular son las siguientes:

- a) Congénitas: Mielomeningocele.
- b) Infecciosas: Mielitis víricas o bacterianas.
- c) Inflamatorias: Esclerosis en placas.
- d) Vasculares: Trombosis arterial o hemorragia.
- e) TumORAles: Metástasis vertebro-medulares, glioblastoma, ependimoma, etc.
- f) Traumáticas: contusión, compresión, sección total o parcial. Son las más frecuentes.

CUADRO CLINICO

Clínicamente y de manera tradicional, se han clasificado a las lesiones espinales de acuerdo al nivel segmental en donde se ocurren. A partir de evidencia clínica, relativa a la ausencia de funciones motoras y/o sensoriales, de la magnitud de la lesión en el plano transversal, de la extensión de la lesión en sentido longitudinal y la velocidad a la que ésta se produzca, las lesiones se agrupan de acuerdo a:

1) **Altura de la lesión:** Cuanto más alta sea la lesión, mayor número de metámeras estarán afectadas y más grave será el cuadro clínico. Si se afecta la médula cervical se llama tetraparesia o tetraplejia, si es la médula dorsal o lumbar se llama paraparesia, paraplejia o lesiones de cola de caballo.

2) Intensidad de la lesión en el plano transversal:

- Lesión completa. No hay funcionalidad por debajo del nivel de la lesión. Los movimientos voluntarios así como la sensibilidad no son posibles. Las lesiones completas son siempre bilaterales, es decir, ambos lados del cuerpo se ven afectados del mismo modo.

- Lesión incompleta. El paciente con lesión incompleta podría tener algo de sensibilidad cutánea por debajo del nivel de la lesión. Las lesiones incompletas son variables, una persona con este tipo de lesión podría ser capaz de mover más un miembro que otro, sentir algunas partes del cuerpo que no pueden mover o quizás, podrían tener más funcionalidad en una parte del cuerpo que en otras.

3) **Extensión de la lesión en sentido longitudinal**. La sección medular nunca es limpia como si estuviera causada por un bisturí, sino que tiene una forma irregular, más o menos fusiforme. Los segmentos medulares que la presentan están destruidos o necróticos y no presentan actividad refleja al estar lesionada la neurona motora inferior y las vías aferentes del asta posterior.

4) **Velocidad a la que se produce la lesión**. Puede modificarse la fase del “choque espinal” que no aparece en lesiones lentas y progresivas. (Guttmann, 1969).

La columna vertebral recibe la influencia de cuatro vectores de fuerza, los cuales son: flexión, extensión, rotación y compresión (Schwab y Bartholdi, 1996). En la mayoría de los casos, la lesión de la columna vertebral ocurre por una combinación de las fuerzas actuantes, por ejemplo, la combinación de rotación y flexión o extensión. Tales lesiones son particularmente frecuentes en la región cervical (Ikata et. al., 1989; Sybert, 1990). El patrón específico de la patología de la médula espinal resulta de los diferentes mecanismos o fuerzas, además del nivel anatómico específico en donde éstas se aplican.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LAS LESIONES TRAUMÁTICAS DE LA MÉDULA ESPINAL.

El conocimiento de la fisiopatología medular, así como el de las posibles terapias promotoras de la neuroprotección y regeneración de las neuronas centrales, se debe en gran medida al desarrollo de modelos experimentales con animales de laboratorio, que mimetizan

los efectos agudos y a largo plazo del traumatismo medular humano, así como la plasticidad de la médula espinal.

No obstante, el diseño de un modelo experimental de lesión medular en animales que sean clínicamente relevantes es difícil. En gran parte se debe a que a lo largo de la evolución de la lesión intervienen un gran número de factores, y es muy complejo tenerlos todos plenamente controlados (Martinez y Marcillo, 1995). En consecuencia, factores como la anestesia, la laminectomía vertebral, la especie experimental, el procedimiento quirúrgico o las fuerzas generadoras de la lesión pueden hacer variar enormemente la respuesta del animal y dificultar la exploración de los resultados a humanos.

A pesar de estas dificultades, existen diversos modelos experimentales de lesión traumática que se clasifican y diferencian en función de la naturaleza causante de la lesión. De este modo, nos encontramos con modelos por contusión, donde un peso genera una fuerza compresiva aguda sobre la médula espinal; modelos por compresión, donde la fuerza es aplicada durante un cierto periodo de tiempo y modelos por sección o hemisección, donde se secciona parcial o totalmente el área transversal de la médula espinal, y también lesiones vasculares donde se desencadenan los procesos post-traumáticos de isquemia tisular.

MODELOS POR CONTUSIÓN

Las fracturas de los cuerpos vertebrales o la luxación de las vértebras conducen a la concusión, contusión o laceración de la médula espinal. En el sentido más estricto del término, una concusión es un estado de depresión funcional transitorio de la médula sin daños anatómicos, mientras que la contusión involucra cambios anatómicos definitivos y la probabilidad de déficit permanente (Schwab y Bartholdi, 1996).

La mayoría de las lesiones en la médula espinal humana resultan de contusión aguda debido al desplazamiento del hueso o del disco de las vértebras durante una dislocación por

fractura o fractura por impacto de la columna vertebral (Bohlman y Ducker, 1992; Hughes, 1974; Kakulas y Taylor, 1992)

Las lesiones por compresión aguda o contusión, son aquellas en las que se aplica una fuerza sobre la médula espinal durante un instante de tiempo, provocando la alteración mecánica del tejido nervioso, seguida de déficits morfológicos y funcionales.

El uso de modelos de compresión en el estudio de lesiones de la médula espinal se remonta al inicio del siglo pasado, cuando Allen (1911) introdujo el primer modelo experimental que producía una lesión cuantificable y reproducible. Ésta consistía en dejar caer una masa, de peso conocido, a través de un tubo de longitud conocida, sobre la médula torácica expuesta del animal (Allen, 1911). A este modelo se le llamó “weight-drop” o caída de peso. La severidad de la lesión producida podía ser fácilmente cuantificada por medio de la variación del peso o de la altura desde donde se liberara.

Desde su invención, la técnica de la caída de peso ha sido criticada, modificada y mejorada reiteradamente por numerosos investigadores, y es en la actualidad el procedimiento de contusión más utilizado. En modificaciones posteriores se acopló un dispositivo sobre la médula espinal (Freeman-Wright, 1953) y posteriormente se aplicaron sensores electrónicos que permitían calcular la energía liberada por el peso al caer (Molt, et.al. 1978). Subsecuentemente se utilizaron materiales magnéticos que evitaban el rebote del proyectil y la secuencia de repetidas compresiones después de la principal (Ford, et al; 1983). En la actualidad, la mayoría de laboratorios utilizan el modelo de contusión estandarizado por la Ohio State University (Bresnahan et al. 1987) o por la New York University (Basso et al. 1996a). El primero consiste en dejar caer un peso desde una altura determinada por el interior de un cilindro. Tras la caída, el peso comprime directamente la médula espinal expuesta. Por medio del empleo de un aparato de medida se calcula indirectamente la velocidad y la compresión ejercida sobre la médula espinal, lo que permite

cuantificar el grado de lesión (Gruner, 1992). El segundo modelo se basa en el recurso de un dispositivo electromecánico transductor de fuerza colocado sobre la superficie de la médula espinal expuesta. Cuando el experimentador da la señal, el dispositivo se desplaza unos milímetros por debajo de la posición inicial, produciendo una contusión instantánea de la médula espinal. En este modelo no hay una caída de peso sino que se gradúa el desplazamiento del transductor (Stokes, 1992).

Los modelos de contusión son en la actualidad los más utilizados ya que, entre varios motivos fueron escogidos para desarrollar los programas del Nacional Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) (Basso et al; 1996b) El impacto del proyectil sobre la médula espinal genera una cavidad necrótica central que se extiende tanto radialmente como a lo largo del eje rostrocaudal. Esta cavidad está envuelta por tejido gliótico, y en su interior se encuentran tanto restos celulares como leucocitos (Bresnahan et al; 1987). Estudios recientes han confirmado que la lesión ejercida por el modelo de contusión es la que más se asemeja los traumatismos medulares en humanos (Metz et al; 2000). Si embargo no está exento de críticas, sobretodo por ser un modelo que presenta una gran variabilidad entre animales, y porque durante mucho tiempo se han cuestionado si la lesión que producía era puramente debida a la distorsión tisular o si además desataba las lesiones secundarias medulares (Chehrazi et al; 1989).

MODELOS POR COMPRESIÓN

La compresión medular resulta de un trauma leve, moderado o agudo que ocurre de manera instantánea por opresión o aplastamiento de la médula espinal, y en el cual se presenta una pérdida incompleta y transitoria de las funciones medulares.

Los modelos de compresión son aquellos en los que se aplica una fuerza sobre la médula espinal de forma continua o persistente a lo largo de un intervalo de tiempo. El

modelo original fue descrito por Tarlov (1953) y Martin y colaboradores (1992) para la rata, el cual se basa en las lesiones por compresión producidas al inflar un microbalón (Cateter Fogarty), con presión y volumen controlados, en el espacio epidural a intervalos de tiempo conocidos. En general, las lesiones por compresión con globo en animales experimentales favorecen la comparación con lesiones espinales en el humano, aunque periodos largos de la compresión pueden resultar en una recuperación funcional limitada y un extenso daño anatómico. (Carlson et al, 2003).

En 1978 Rivlin y Tator describen el “modelo por compresión de fragmento”. En este modelo se comprime la médula espinal mediante un clip de aneurisma, modificado para periodos de tiempo variables o de la fuerza aplicada por el clip (Rivlin y Tator 1978, Joshi y Fehlings 2002a, 2002b). Se considera que la fuerza compresiva aplicada al cordón espinal por este método es el modelo más representativo de la lesión humana ya que el ajuste de la fuerza de cierre del clip y la duración de la compresión produce diferentes grados de daño tisular (Fehlings y Tator, 1995). También se han desarrollado modelos en los que se mantiene un peso durante un determinado periodo de tiempo sobre la médula espinal expuesta (Gledhill, 1973).

Los modelos de compresión, tanto el clip de aneurisma como los balones inflables, presentan dos inconvenientes principales. En primer lugar, ambos métodos requieren un abordaje quirúrgico más complejo de la médula espinal que únicamente la laminectomía, ya sea para introducir los balones en el interior del canal vertebral o para colocar parte del clip compresor en la zona ventral de la médula espinal, y en segundo lugar, por el desconocimiento de la presión real ejercida sobre la médula, ya que parte de la presión es amortiguada por las propias paredes de la columna vertebral (Taoka y Okajima, 1998).

MODELOS POR SECCIÓN

- Sección completa

En algunos casos, los traumas severos como marcadas dislocaciones por fractura, producidos por cuerpos extraños que atraviesan el canal vertebral, resultan en laceración o sección de la médula espinal. La sección espinal es común en la clínica humana, como consecuencia de accidentes y agresiones. Al seccionar la médula espinal se pierden transitoriamente los reflejos segmentarios (“choque espinal”) y el tono muscular, tanto del músculo estriado como del liso. La duración del choque espinal es diferente en las distintas especies animales y está relacionada con el grado de desarrollo de los hemisferios cerebrales; por ejemplo, el choque espinal dura unos minutos en la rana y varios meses en el humano. En este último, el choque espinal se caracteriza principalmente por parálisis flácida, arreflexia, incapacidad para evacuar tanto la vejiga como el colon e hipotensión. (Bach y Rita, 1993).

Las lesiones por sección permiten realizar la disrupción de tractos espinales concretos, generando una lesión nítida y bien localizada. Como en la mayoría de las lesiones experimentales, se requiere de un procedimiento previo que consiste en la exposición de la médula espinal mediante cirugía (laminectomía) para posteriormente producir la sección espinal con una cuchilla, bisturí o tijeras.

Para la sección de la médula espinal se han desarrollado algunos procedimientos alternativos, tal como el uso del rayo láser, el cual permite la sección de la médula espinal sin necesidad de realizar laminectomía vertebral alguna. En este caso, la energía del láser es capaz de atravesar el tejido óseo y muscular y dañar exclusivamente el parénquima medular, siendo la sección más nítida que la producida con bisturí (de la Torre, 1984).

- **Sección incompleta**

El daño medular parcial, también conocido como hemisección medular, ocurre con menor frecuencia que otros tipos de lesión medular. En este se presenta el daño de la mitad de la médula con respecto a la otra mitad, presentándose una notable parálisis motora, así como la pérdida de la sensación de posición y de la propiocepción ipsilateral, y contralateralmente, la pérdida de la sensibilidad térmica y dolorosa. Este tipo de lesión es la que tiene un mejor pronóstico para los pacientes, ya que éstos recuperarían hasta un 90% de la marcha y el control de sus esfínteres.

MODELOS POR LESIÓN VASCULAR

A diferencia de los modelos de contusión, compresión o sección, las lesiones vasculares no producen una distorsión mecánica del tejido medular. Es por ello que las lesiones puramente isquémicas producen cambios bioquímicos, morfológicos y funcionales diferentes a los producidos por lesiones mecánicas. Existen diversos procedimientos para generar la isquemia medular: se puede conseguir por medio de la obstrucción de la vena posterior, por la inyección de polímeros, por la obstrucción de la aorta torácica con clips de aneurisma o por la obstrucción de los capilares medulares por medio de agentes coagulantes. En esta última aproximación se engloban las lesiones fotoquímicas, desarrolladas originalmente por Watson y colaboradores, primero en el cerebro y después en la médula espinal (Watson et al; 1985, 1986, Prado et al; 1987).

Conjuntamente con cualquiera de estos métodos de lesión se han utilizado diversas escalas para evaluar en el humano o en diversos animales la recuperación conductual (sensibilidad y movilidad), como es el caso de la escala de ASIA (American Spinal Injury Association, 1996) para el humano, la cual evalúa: nivel neurológico, nivel sensitivo, nivel motor (lados izquierdo y derecho) y zonas de preservación parcial, mientras que en animales

el puntaje de la escala BBB de locomoción en campo abierto (Basso et al, 1995; ver anexo 2) está siendo ampliamente utilizada, en conjunto con otros métodos (Barra estrecha, Cinemática de la marcha, etc.) para evaluar la recuperación de la función motora (Metz et al., 2000).

TRASTORNOS PRODUCIDOS POR LESIONES ESPINALES

Los trastornos que se producen tras una lesión medular dependen de las estructuras medulares afectadas: trastornos motores (parálisis flácida y espástica), de la sensibilidad (disestesias y parestesias), trastornos vegetativos (vesicales, gastrointestinales, sexuales, vasomotores) y de termorregulación.

TRASTORNOS DE LA FUNCIÓN MOTORA

Los trastornos de la función motora dependen de la lesión de las vías descendentes (piramidales o extrapiramidales) o de las motoneuronas y dan lugar a una parálisis muscular. Aunque ambas lesiones pueden coincidir, la parálisis muscular puede ser de dos tipos:

A. Parálisis Flácida. Los músculos inervados por las metámeras en las que se han destruido las motoneuronas muestran desde el principio los signos clásicos de las parálisis de neurona motora periférica (flacidez, arreflexia, atrofia y los signos eléctricos típicos de denervación), la cual conduce posteriormente a una atrofia por desuso.

B. Parálisis Espástica. Los músculos inervados por la porción medular que está por debajo de la lesión y por tanto separada de los centros superiores se pueden contraer de forma refleja ante diversos estímulos aunque estas contracciones no son voluntarias. Se podría considerar que no existe atrofia por desnervación (sólo atrofia por desuso) debido a que las

motoneuronas de la cuales dependen los músculos, trófica y funcionalmente, aún se encuentran presentes.

TRASTORNOS DE LA SENSIBILIDAD

En la lesión medular completa y por debajo de la lesión, se produce la abolición de la sensibilidad en todas sus modalidades, al quedar interrumpidas todas las vías ascendentes o sensitivas que conducen los impulsos aferentes desde la periferia hasta el tálamo y la corteza.

A la médula aislada le pueden llegar diversos estímulos por las raíces posteriores, que pueden provocar respuestas variadas, no conscientes debido a que no llegan a la corteza cerebral. No obstante, se presentan algunos mecanismos de compensación de la sensibilidad propioceptiva, tales como aquellos empleados por determinados músculos, cuya inervación metamérica es alta, quedando por arriba de la lesión, pero cuyas inserciones se extienden por debajo del nivel metamérico de ésta.

TRASTORNOS VEGETATIVOS

Al producirse una lesión medular, se afecta también el sistema nervioso vegetativo, por destrucción de los centros vegetativos medulares o de los haces que los regulan, procedentes de los centros supraespinales. Por ello se afectan todos los órganos cuyo funcionamiento depende del sistema nervioso vegetativo. Los trastornos más importantes y más relevantes para el lesionado medular son los de las funciones vesical, gastrointestinal, sexual, del control vasomotor y de la termorregulación.

CARACTERÍSTICAS DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA

A partir de estudios experimentales y de observaciones clínicas se ha establecido una secuencia dinámica en el desarrollo de la lesión medular, en la que se pueden distinguir dos fases concomitantes y consecutivas en el tiempo. El propio traumatismo sobre la médula espinal constituye la lesión primaria. Esta fase es la responsable de producir la lesión. Se caracteriza por ser un proceso accidental y no modulable, y el daño que produce es la consecuencia inmediata de su acción. A partir de la afectación tisular producida por la lesión primaria se desarrolla la lesión secundaria, durante la cual se desata un conjunto de sucesos bioquímicos que conllevan la expansión de la lesión y a un aumento de la afectación tisular y funcional (Tator y Fehlings, 1991). Además, investigaciones recientes indican que los déficit producidos por una lesión son mayoritariamente generados por los mecanismos de la lesión secundaria. A diferencia de la lesión primaria, se ha evidenciado que estos eventos moleculares que la componen son farmacológicamente modulables, por lo que cualquier actuación que reduzca su desarrollo repercutirá en una disminución de la severidad de la lesión (Schwab y Bartholdi, 1996).

DAÑO PRIMARIO Y SECUNDARIO

Producido el trauma en la médula espinal, algunas neuronas mueren y otras inician un proceso de degeneración (Selzer ME, 1998). Ante estas pérdidas, el Sistema Nervioso intenta realizar cambios plásticos, cuyo objetivo son los de mantener o reemplazar una función; éstos cambios son de índole fisiológica, anatómica y/o conductual, no son independientes sino que se construyen uno sobre el otro (Selzer, 1998). La lesión medular provoca cambios moleculares y celulares que conducen en muchas circunstancias a un daño neurológico permanente, que se traducen en alteraciones de sus funciones.

Dos eventos se suceden para la producción de dicha lesión: el daño primario y el secundario, ambos eventos tienen una misma consecuencia final, la muerte de neuronas y de células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) (Selzer, 1998; Amar y Levy, 1999).

- Lesión primaria

El daño primario es producido por la cinemática del traumatismo directo, donde se ponen en juego fuerzas de compresión y tracción (McDonald JW, Sadowsky C. 2002). Los desplazamientos óseos y/o ligamentarios dentro del canal medular, como productos del impacto traumático, generan un daño compresivo provocando edema y hemorragias (Fig. 5).

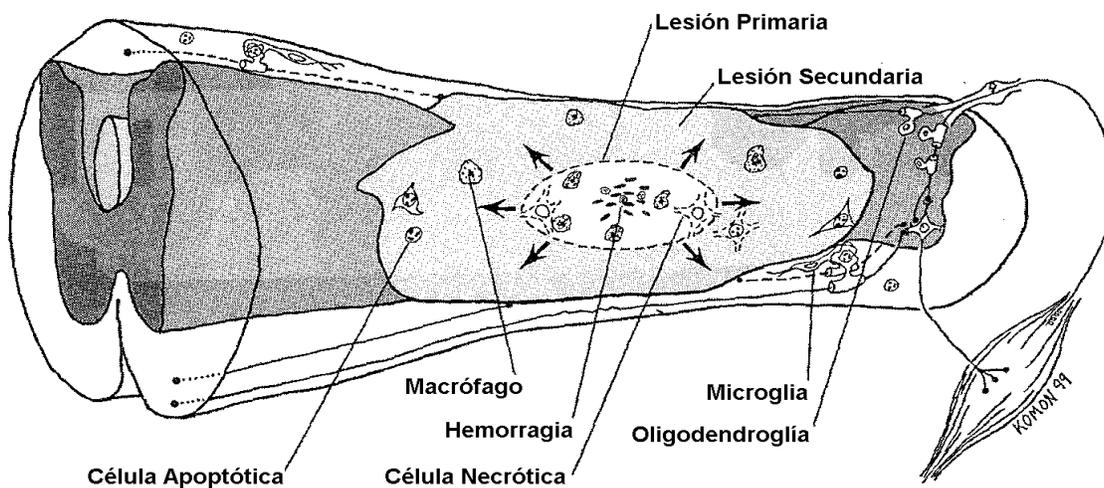


Figura 5. Lesiones primaria y secundaria producidas por traumatismos medulares (ver texto)

La presencia de fuerzas distractoras en flexión, extensión y rotación vertebral, con o sin luxación, pueden resultar en el alargamiento y/o corte de elementos neurales y vasculares, generando daño neurológico, no sólo durante el traumatismo inicial, sino también crónicamente, secundario a deformaciones persistentes (Amar y Levy, 1999; Sandler y Tator, 1976) por inestabilidad mecánica, generadora de tensiones dentro de los tractos axonales y de constricción de los vasos sanguíneos intramedulares (Hayes, et. al. 1991).

El trauma mecánico, de magnitud variable, se expresa en una lesión tisular que incluye a componentes neurales centrales y periféricos, vasos sanguíneos, disrupción axonal y ruptura de membranas celulares con liberación de electrolitos, metabolitos y lisosomas de los tejidos dañados, es un proceso pasivo que se produce en cascada y es inmediato al trauma inicial (Selzer, 1998; Amar y Levy, 1999; McDonald y Sadowsky, 2002). A los pocos minutos, se suceden microhemorragias por ruptura de las vénulas postcapilares, o de las arteriolas sulcales, y se extienden axial y radialmente a las pocas horas (McDonald y Sadowsky, 2002; Anthes, et. al, 1996; Sandler y Tator, 1976).

De inmediato la médula espinal tiende a ocupar todo el diámetro del canal espinal, abultando y comprimiendo el sitio de la lesión provocando edema y aumento de la presión intersticial (McDonald y Sadowsky, 2002).

El aumento de la presión intersticial disminuye aún más el flujo sanguíneo medular, generando hipoxia peri-lesional, creando una zona de penumbra. En la zona de penumbra las neuronas comprometidas podrán ser rescatadas, dependiendo del tiempo de exposición a la isquemia, con medidas que mejoren la perfusión. Si el daño es poco severo, el sangrado cesará en pocos minutos, a partir de lo cual comenzará la acción de los macrófagos, conformándose una cicatriz glial (Selzer, 1998; Amar y Levy, 1999; Anthes, et. al, 1996; Sandler y Tator, 1976).

Casi simultáneamente sobreviene el choque neurogénico medular, muchas veces complicado con choque hipovolémico general, agravando la isquemia tisular. El choque neurogénico está relacionado a un brusco bloqueo de la conducción nerviosa, debido a la salida de iones K^+ de la célula, producto de la inestabilidad de su membrana. La restauración del equilibrio electrolítico con fluidos y estabilizadores de membrana (metilprednisolona, gangliósidos GM1) atenuarán las consecuencias del mismo.

La isquemia generada por la liberación de tóxicos químicos y electrolitos provenientes de la disrupción de las membranas neurales da comienzo al daño secundario que complica al daño mecánico inicial, involucrando letalmente a las células vecinas intactas (McDonald JW, Sadowsky C, 2002).

- **Lesión secundaria**

Los efectos inmediatos de la necrosis tisular producida por la lesión primaria desencadenan un conjunto de mecanismos bioquímicos y fisiológicos que se engloban bajo el nombre de lesión secundaria (Fig. 5). Estos mecanismos incluyen: el choque neurogénico, estados de isquemia, edema, perfusión, excitotoxicidad, apoptosis, desequilibrio electrolítico, alteración de la función mitocondrial, reacción inflamatoria, reactividad glial y procesos relacionados con el aumento de Ca^{++} intracelular, que en último término desembocan en la afectación neuronal y aumento del daño producido tras la lesión primaria (Tator y Fehlings, 1991).

La afectación de la médula espinal genera una fase transitoria de choque espinal donde las funciones y los reflejos espinales están temporalmente abolidos (Sherrington, 1906). La causa de esta pérdida funcional reside en el desequilibrio electrolítico transitorio generado por la lesión, en donde los iones K^+ dejan, durante un corto periodo de tiempo, de concentrarse masivamente en el espacio intracelular, para hacerlo extracelularmente, provocando el bloqueo de la conducción de potenciales de acción (Young y Koreh, 1986). Paralelamente, y quizás en consecuencia de la pérdida funcional, se desarrolla el choque neurogénico, donde la abolición de la actividad neuronal desencadena la desaparición de reflejos simpáticos, imposibilitando la rápida compensación de la pérdida de volumen sanguíneo que se produce por la hemorragia. Como resultado, se produce la disfunción de los centros vasomotores del tronco encefálico, con el subsiguiente desequilibrio

vasoconstrictor-vasodilatador de arteriolas y vénulas, y la afectación de la función cardíaca. Tal hipo-constricción, conjuntamente con las alteraciones de la circulación, conducen a un déficit del flujo sanguíneo tisular agravando la situación isquémica producida por la lesión (Guha y Tator, 1988).

Subsecuentemente, el descenso de oxígeno tisular desencadena una compleja cadena de procesos metabólicos que conducen a la muerte neuronal. En primer lugar, la anorexia incrementa las reacciones anaeróbicas de la célula en detrimento de las aeróbicas. Como consecuencia de lo anterior, se produce ácido láctico, responsable de acidificar el medio celular y una depleción de los niveles de ATP celulares, lo que provoca que las bombas iónicas dependientes de ATP dejen de funcionar, produciendo la despolarización de las neuronas. Por otra parte, la liberación masiva de glutamato y el desacople simultáneo de las bombas de glutamato de los astrocitos (Rossi et al., 2000), inducen la acumulación de grandes cantidades de ese neurotransmisor en el espacio extracelular, facilitando su unión a los receptores AMPA, kainato y NMDA de neuronas próximas. La activación de tales receptores conlleva la entrada masiva de cationes, mayoritariamente Na^+ y Ca^{++} al interior neuronal, desatando un conjunto de reacciones perniciosas para la viabilidad celular (Choi, 1999). Estos procesos de muerte neuronal inducida por la liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios se reúnen bajo el término de excitotoxicidad (Olney, 1978).

El aumento de electrolitos en el interior celular causa el aumento del volumen y la acidosis celular, lo que desemboca en la formación de edema citotóxico y en la inactivación de un gran número de bombas transportadoras de iones. Esta disfunción conducirá al aumento de Ca^{++} citoplasmático, afectando al metabolismo celular y cuyas consecuencias serán la vulnerabilidad o muerte celular (Agrawal et al., 1997). Desde hace varias décadas, se sostiene la hipótesis de que el aumento del Ca^{++} intracelular es el paso previo a la muerte

celular, y que muchos de los procesos degenerativos, independientemente de su naturaleza, convergen en este estadio. De hecho, el aumento en la concentración del Ca^{++} intracelular se ha denominado como el final común de las vías tóxicas para la célula (Schanne et al., 1979), ya que la elevada concentración de Ca^{++} intracelular generada por el traumatismo contribuye activamente, por medio de diversos mecanismos, al desarrollo de la lesión secundaria.

Así mismo, el aumento de Ca^{++} intracelular interfiere con la función mitocondrial. Su elevada concentración citoplasmática agrava la disfunción respiratoria inicialmente afectada por la situación de isquemia tisular (Fiskum, 2000). La afectación de la respiración mitocondrial conduce a la producción de radicales libres, los cuales son átomos o moléculas que poseen un electrón no apareado en el último orbital atómico, lo que les confiere una alta reactividad en reacciones de oxidación y reducción. Ejemplos de radicales libres son el ión superóxido (O_2^-) y los radicales hidroxilo (OH^\cdot). Su presencia en pequeñas cantidades es normal en la célula ya que es un producto de la respiración mitocondrial. En estados fisiológicos, su concentración está altamente regulada por la presencia de proteínas amortiguadoras o antioxidantes mitocondriales. Ejemplos de éstas son la calbindina, la calmodulina y la parvalbúmina, entre otras (Miller, 1995). En cambio, su concentración incrementada como resultado de una lesión, les hacen ser altamente tóxicos, dado que reaccionan y degradan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, lo que a su vez conduce a la muerte celular (Pellegrini-Giampetro et al., 1990).

Por otra parte, el incremento de Ca^{++} intracelular activa una serie de proteasas y lipasas citoplasmáticas, tales como por ejemplo: la fosfolipasa A2, las lipooxigenasas, las ciclooxigenasas y especialmente la calpaína, responsables de la degradación de los componentes estructurales de la célula. La calpaína es una proteína que juega un papel

fisiológico en la remodelación y reestructuración del citoesqueleto y de la membrana celular. Diferentes estudios han evidenciado que la sobre-expresión de esta proteína conduce a la destrucción del citoesqueleto neuronal (Siman y Noszek, 1988). Además, el aumento de Ca^{++} activa endonucleasas Ca^{++} dependientes, dando lugar a la degradación de ácidos nucleicos y a la subsiguiente necrosis o apoptosis celular (Ojcius et al., 1991). Asimismo, la activación de las lipooxigenasas, fosfolipasas y ciclooxigenasas conllevan a la síntesis de tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales contribuyen en la agregación plaquetaria, agravando la situación vasoespásmica, así como intervienen en los procesos de iniciación de la reacción inflamatoria. Paralelamente, al dañar la membrana lipídica también generan radicales libres que intervienen en la peroxidación lipídica (Hsu et al., 1985).

También se sabe que altas concentraciones intracelulares de iones Ca^{++} aumentan los niveles de óxido nítrico (NO) citosólico. Varios tipos celulares en el SNC sintetizan el NO: En las neuronas, el NO cumple un papel en los procesos de plasticidad sináptica, mientras que en las células endoteliales modula la vaso-dilatación, y en la microglía/macrófagos desempeña una función inmune. En las neuronas y en las células endoteliales la síntesis de NO está mediada por el óxido nítrico sintasa tipo 1, que es un enzima de expresión constitutiva y cuya actividad depende de la calmodulina, que es un cofactor Ca^{++} dependiente (Bredt y Snyder, 1990). En situación fisiológica la síntesis de NO está muy bien regulada y el NO producido no es por sí sólo neurotóxico. Sin embargo, después de una lesión espinal, al producirse un aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular, se multiplica la producción del NO, y éste a altas concentraciones reacciona con diversos compuestos celulares, dando lugar a elementos tóxicos. En este sentido, el NO reacciona con el súper óxido para dar lugar al peroxinitrito (ONOO), compuesto que es altamente tóxico para la célula ya que oxida al DNA y a los lípidos de la membrana (Lipton, et al., 1993).

En cambio, en los macrófagos y las células de microglía, la síntesis de NO se encuentra mediada por la acción de la óxido nítrico sintasa inducible (tipo II), cuya actividad es independiente del Ca^{++} . Algunas citoquinas, como el interferón gamma, son capaces de activar esa enzima (Xie et al., 1994). La síntesis inducible de NO está asociada a traumatismos y lesiones inmunológicas, y su alta concentración provoca la peroxidación de las membranas celulares, así como a la apoptosis de las células en la zona de lesión (Satake et al., 2000).

Otro de los fenómenos asociados con el incremento en el Ca^{++} intracelular, es la entrada de la célula al proceso de apoptosis. Éste es un proceso degenerativo característico, por medio del cual la célula activa un programa genético que desemboca en la muerte celular. A diferencia de la necrosis, la célula apoptótica sufre la degradación de la estructura celular por medio de proteasas intracelulares, que digieren los orgánulos citoplasmáticos, sin alterar la membrana celular. Finalmente, la célula es fagocitada por los macrófagos, evitando así la liberación de productos de la degradación al espacio extracelular que desencadenarían la respuesta inmunitaria (Mattson, 2000). Tras una lesión traumática del SNC, la célula puede entrar en apoptosis por medio de dos vías, a través de la vía intrínseca, independiente de receptores celulares, o a través de la vía extrínseca, por medio de la unión de ligandos a receptores celulares específicos. La primera vía es el resultado del aumento de Ca^{++} intracelular, que produce la disfunción de las mitocondrias, las cuales liberan al citosol citocromo C, que inicia la vía de activación de las caspasas, para que finalmente las caspasas 3 y 6, proteasas citosólicas, degraden las estructuras celulares (Budd et al., 2000). En cambio, la vía extrínseca requiere de señales extracelulares para su desarrollo. Por ejemplo, la unión de TNF- α al receptor Fas desata la maquinaria enzimática que concluye con la activación de la caspasa-3 que es la proteína efectora de la degradación estructural de

la célula (Eldadah et al., 2000). Otro mecanismo es el mediado por el NO sintetizado por la microglía que concluye en la misma vía degradativa (Satake et al., 2000).

Además de la degeneración resultante del aumento de Ca^{++} citoplasmático, la acidosis y el edema formado por la lesión aumentan la expansión del daño tisular. El aumento de la acidosis celular promueve la formación de radicales libres agrava el daño al DNA (Siesjo et al., 1996) y dificulta la regulación de la concentración de Ca^{++} (Werth et al., 1994). El edema tisular provoca la compresión y por tanto disfunción neuronal así como la alteración de la composición del líquido extracelular (Balentine, 1985).

Paralelamente al desarrollo de estos fenómenos moleculares, tras una lesión traumática de la médula espinal se origina una respuesta inmunitaria y pro-inflamatoria que está potenciada por la afectación de las células endoteliales de la zona de lesión. Estas células endoteliales lesionadas aumentan su permeabilidad tanto a moléculas plasmáticas como a elementos de la sangre. Asimismo, liberan citoquinas proinflamatorias, tales como IL1, TNF- α y IFN- γ , y factores quimio-atrayentes, como las quimiocinas, que inducen al reclutamiento de células sanguíneas. En paralelo, expresan en su cara luminal moléculas de adhesión celular (por.ejemplo: la ICAM-1 y la VCAM-1), sobre las que interaccionaran los correspondientes receptores de los neutrófilos y monocitos (LFA-1 y VLA 4 respectivamente), facilitando así la diapédesis de estas células y su entrada al parénquima medular. Asimismo, las propias células endoteliales en conjunción con las células gliales reactivas generan un gradiente quimioatrayente que también favorece la infiltración de los leucocitos al interior del parénquima medular (Merrili y Benveniste, 1996). Esta infiltración de elementos sanguíneos sigue un patrón bifásico. Los neutrófilos son las primeras células en migrar a la zona afectada, donde son detectables a las pocas horas después de haberse producido la lesión, y alcanzan el pico de máxima infiltración antes de las primeras 24 horas (Carison et al.,

1998). Una vez en la zona lesionada, los neutrófilos se activan e inician la fagocitosis de los restos celulares, pero también generan radicales libres de oxígeno como consecuencia de un aumento de la respiración celular, que al ser liberados al espacio extracelular causan la peroxidación lipídica de la membrana de células vecinas. Por otra parte, los neutrófilos infiltrados también secretan citoquinas promotoras de la reactivación de los astrocitos y de la microglía generando un ambiente inflamatorio. La segunda oleada de células infiltrantes son los monocitos que una vez dentro del parénquima medular se transforman en macrófagos-microglía, ayudando así a la fagocitosis de los restos celulares. De nuevo, como resultado del aumento del catabolismo celular se liberan especies reactivas del oxígeno, nocivos para la viabilidad de las células vecinas (Merrill y Jonakait, 1995).

Además de la infiltración de elementos formes y humorales de la sangre tras la lesión medular, y con el propósito de proteger y reparar el daño producido en el parénquima medular, los astrocitos y la microglía sufren cambios morfo-funcionales. No obstante, paralelamente a este proceso restaurador, secretan un gran número de citoquinas que, directa o indirectamente, inducirán cambios en el endotelio, favoreciendo el reclutamiento de células inmunitarias hacia el parénquima medular lesionado. Igualmente, las células microgliales residentes se convierten en células presentadoras de antígeno y promueven los procesos de auto inmunidad y de degeneración tisular (Benveniste, 1992). Es por ello que la reactividad glial juega un papel dual, en gran medida condicionado por el ambiente celular donde se ha desarrollado la lesión, actuando como reparadora y al mismo tiempo promotora de la degeneración del tejido nervioso lesionado. El papel desarrollado por los oligodendrocitos en los procesos de la reactividad glial es muy leve, más bien se caracterizan por su elevada vulnerabilidad a los fenómenos de apoptosis y de estrés oxidativo, que a su participación de procesos potenciadores de la degeneración neural (Crowe et al., 1997). No

obstante, los oligodendrocitos juegan un papel crucial en la inhibición del crecimiento axonal, ya que la degradación de la mielina, sintetizada por ellos, genera un conjunto de señales inhibitorias de la elongación de los axones regenerativos.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC, y juegan un papel imprescindible en el mantenimiento de la homeóstasis tisular, tanto en la regulación del funcionamiento neuronal como el de la barrera hematoencefálica (Norenberg, 1998). Al producirse una lesión traumática de la médula espinal, en los astrocitos se cambia el patrón de expresión de una larga lista de genes, lo que desemboca en el desarrollo de la astrogliosis (Eddlestone y Mucke, 1993). Éste es un proceso que se inicia a las pocas horas de haberse producido la lesión y que perdura durante meses o incluso años. Algunos de los cambios más relevantes que se observan en las células gliales es el aumento en el número de mitocondrias, del retículo endoplasmático rugoso y la sobre-expresión de proteínas estructurales del citoesqueleto, en especial de la GFAP (Petito et al., 1992). El papel del aumento del tamaño celular es doble, por una parte rellenar los espacios huecos generados por la muerte celular, y sobretodo, formar la denominada cicatriz glial. Ésta constituye una densa red celular que sella los bordes de la lesión, de tal forma que limita la cavidad necrótica formada, aislando las células neurales supervivientes y estabilizando el parénquima neural preservado. La cicatriz glial está compuesta principalmente por astrocitos reactivos o bien sus prolongaciones citoplasmáticas, por microglía y oligodendrocitos, además de células mesodérmicas como los fibroblastos y células endoteliales y, presumiblemente, por células madre (Fawcett y Asher, 1999). Junto con los cambios morfológicos que estas poblaciones celulares sufren, la formación de la cicatriz va seguida de cambios en la composición de la matriz extracelular que las envuelve. Los astrocitos participan en la síntesis y secreción de

los componentes de la matriz, produciendo glicoproteínas como la tenascina C, la laminina, y la fibronectina, de proteínas como el colágeno IV y de proteoglicanos (Stichel et al., 1998).

A pesar de la función neuroprotectora que desempeña, la cicatriz glial, supone uno de los impedimentos más fuertes para la regeneración axonal (Davies et al., 1999). Desde 1928, Ramón y Cajal describe esta propiedad, al observar cómo los axones regenerativos se colapsaban o bien retrocedían al entrar en contacto con tal cicatriz (Ramón y Cajal, 1928). Esta impermeabilidad se debe a la presencia de moléculas inhibitorias, tanto en la superficie de las membranas celulares como en los componentes de la matriz extracelular. En este sentido, la familia de los proteoglicanos adquiere especial relevancia, ya que en diversos estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado ser potentes bloqueadores del crecimiento axonal (Bovolenta et al., 1997, Davies et al., 1999, Zuo et al., 1998).

Además de generar la cicatriz glial y los componentes repulsivos de la misma, algunos autores sugieren que los astrocitos juegan un papel preponderante en la amplificación y potenciación de la respuesta inflamatoria. Es ampliamente aceptado que en numerosas enfermedades del SNC, tanto degenerativas, autoinmunes o traumáticas, los astrocitos producen y secretan un amplio abanico de citoquinas y quemoquinas (Benveniste, 1993). Así, los astrocitos expresan y liberan IL-1, IL-6 e IL-10, MCP-1 e IP-10, GM-CSF, TNF- α , TGF- β , y RANTES, que inducen la activación de linfocitos TH-1, la infiltración de monocitos sanguíneos, la activación de la microglía residente, así como el desarrollo de la astrogliosis (Dong y Benveniste, 2001). En cambio, no existe unanimidad de criterios respecto al papel de los astrocitos como células que presentan antígenos, ya que hay autores que afirman que los astrocitos expresan todos los receptores y moléculas asociadas, tales como la MHC-II, B7 y CD40 (Tan et al., 1998, Soos et al., 1999), pero otros consideran lo contrario (Aloisi et al., 1998).

Tras la lesión medular, la microglía residente también se transforma, pasando de un estado quiescente a uno reactivo. En su estado quiescente, es característico que la microglía presente un cuerpo celular pequeño, con escasas vesículas endocíticas y con pocos receptores de acción inmunológica expuestos en su membrana celular. Además, presentan largas y tortuosas ramificaciones que les confieren una morfología estrellada. Por el contrario, la microglía reactiva prolifera, migra a la zona de lesión y adopta una morfología ameboide, parecida a la de los macrófagos, y activa su maquinaria enzimática para la síntesis y expresión de receptores y mediadores de la respuesta inflamatoria (Streit et al., 1999). La función de la microglía reactiva consiste en la eliminación de restos celulares y de la restauración de la estructura neural. Paralelamente al desarrollo de estos procesos, la microglía reactiva se encuentra involucrada con procesos de inflamación, de citotoxicidad y de presentación de antígeno a las células T, que agravan el estado lesivo medular. La microglía reactiva puede ejercer un papel citotóxico de dos maneras distintas. La primera es por medio del desarrollo de la actividad fagocítica. Mediante la síntesis de receptores de superficie, reconoce a antígenos celulares foráneos y a través del contacto célula-célula, fagocita a las células extrañas. La segunda vía citotóxica consiste en la síntesis y liberación de factores, entre los que se encuentran radicales libres, enzimas proteolíticos, citoquinas proinflamatorias y productos del metabolismo del ácido araquidónico que directa o indirectamente potencian los procesos de inflamación y de degeneración celular (Banati et al., 1993). Por ejemplo, la microglía secreta la enzima proteolítica catepsina B/L, la cual se ha demostrado que degrada proteínas de la matriz extracelular, así como proteínas de la mielina (Banati et al., 1993). Secreta citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α que han demostrado ejercer un papel lesivo sobre los oligodendrocitos medulares (Dickson et al., 1991). Sintetiza factores como el CSF de macrófagos y granulocitos que les permiten regular tanto su proliferación como diferenciación (Giulian y Ingeman, 1988). Finalmente, la microglía

adquiere un papel destacado en los procesos de excitotoxicidad, ya que se ha evidenciado que estas células sintetizan y liberan grandes cantidades de glutamato (Meldrum y Garthwaite, 1990), al tiempo que favorecen la liberación de este neurotransmisor por otras células por medio de la formación de grandes cantidades de radicales libres (Kettenrnan, 1990).

En resumen, después de producirse una lesión en la médula espinal se presenta una baja capacidad de regeneración espontánea de las fibras nerviosas, debido principalmente a la presencia de diversos factores inhibitorios de la regeneración que son sintetizados después del trauma, así como al inadecuado balance en la producción de diversos factores tróficos y al desarrollo de complejos eventos neuroquímicos autodestructivos que provocan daño irreversible del tejido nervioso, tales como:

- a) Pérdida de la regulación iónica, que lleva a la suspensión del impulso nervioso y a la formación de edema (Lemke et. al, 1987; Young y Koreh, 1986).
- b) Incremento del calcio libre intracelular, el cual activa diversas proteasas y fosfolipasas, que a su vez destruyen los componentes celulares, entre ellos la mielina, con lo cual se favorece el proceso desmielinizante (Balentine JD; 1988).
- c) Liberación de grandes cantidades de glutamato y aspartato, originando una intensa sobreexcitación de las neuronas viables, fenómeno conocido como excitotoxicidad (Faden AI, Simon RP, 1988).
- d) Finalmente, el estrés oxidante, estado donde se pierde el balance entre la generación de radicales libres y la capacidad de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) para contrarrestarlos (Braugher y Hall, 1992; Siegel, 1998).

ANTECEDENTES

El uso de técnicas no invasivas, como el registro del reflejo de Hoffman para el análisis de las respuestas neurofisiológicas en el humano, ha sido fundamental para el avance en la comprensión, diagnosis y tratamiento de una gran variedad de enfermedades neurológicas (Kushnir, et al, 2001; Novikova, 1985; Danner, et al. 1981; Oepen y Hillesheimer, 1981; Higashi, et al, 2001; Gordon y Wilbourn, 2001; Meunier, et al., 1996; Delwaide, et al., 2000; Kuruoglu y Oh, 1994), psiquiátricas (Goode, et al., 1979), metabólicas (Mansouri, et al., 2001; Kolev y Milanov, 2000; Mazzini, et al., 1997), infecciosas (Bhaskar, et al., 1997), como de aquellas derivadas de accidentes por caídas, automovilísticos, o deportivos (Van-Beek, 1986; Little y Halar, 1985; Knikou y Conway, 2001). Asimismo, debido a que el registro del reflejo H es considerado como un índice de la excitabilidad de las motoneuronas espinales, ello ha permitido el estudio experimental de la función espinal en diversas condiciones, ya sea en reposo (Dimitrijevic, et al., 1978; Guissard, et al 2001; Handcock, et al., 2001; Goulart, et al., 2000), durante la ejecución de un movimiento determinado (Sullivan, 1980; Trimble y Koceja, 2001; Manca, et al., 1998) o durante la locomoción (Trimble, et al, 2001; Chen, et al., 2001; Zehr, et al., 2001; Hiraoka, 2001; Andersen y Sinkjaer, 1999). Particularmente, el registro del reflejo H ha probado su enorme utilidad en el desarrollo de procedimientos de rehabilitación, experimentales y/o clínicos, para reducir o mitigar las alteraciones provocadas por lesiones espinales, tanto en el humano (Allison y Abraham, 2001; Dishman y Bulbulian, 2001; Remy-Neris, et al., 2000; Funase y Miles, 1999; Qiao, et al., 1997; Simpson, et al., 1996; Raffaéle et al., 1992) como en animales experimentales (Stanley, 1981; Chen, et al., 2000; Chen, et al., 2001; Lu, et al., 2001; Cliffer, et al., 1998; Skinner, et al., 1997; Skinner, et al., 1996; Perot y Almeida-Silveira, 1994; Meirck et al 1976).

Sin embargo, los resultados obtenidos sobre los efectos que producen las lesiones espinales sobre la respuesta refleja (monosináptica y H) de la médula espinal a nivel lumbar, muestran diversas inconsistencias experimentales entre sí, lo que en algunas ocasiones podrían cuestionar la validez de las mismas. Lo anterior podría deberse a varias causas, una de ellas está relacionada con el tipo de lesión que se infringe a la médula espinal, esto es, por compresión o por sección parcial o total (afectando a determinados tractos o vías supra-, o propio-espinales), así como del nivel espinal en donde ésta ocurra (cervical, torácico o lumbar).

Hultborn y Malmsten en 1983 mostraron en el gato que la hemisección lateral de la médula espinal, en niveles torácicos bajos (T12) o lumbares altos (L2), provoca un incremento significativo en la amplitud de los reflejos monosinápticos y polisinápticos (hiperreflexia), registrados en raíces ventrales ipsilaterales a la lesión espinal y generados por la estimulación de nervios motores y sensoriales, respectivamente, en comparación con los reflejos generados en raíces ventrales del lado contralateral de la lesión. Tal efecto fue observado en los animales lesionados entre 2 y 515 días post-lesión. Sin embargo, en el mismo estudio los autores observaron que los animales lesionados presentaban respuestas conductuales motoras que eran totalmente diferentes a lo que se hubiese esperado en animales con hiperreflexia. Esto es, entre el primer y segundo día post-lesión los animales mostraron parálisis flácida del miembro localizado en el mismo lado (ipsilateral) que la lesión espinal. Después de 2 o 3 días, los animales lesionados comenzaban a utilizar el miembro del lado lesionado en algunos movimientos durante la marcha, pero en períodos de tiempo muy breves y mostrando una notoria incapacidad para realizar movimientos apropiados (por lo general caminaban sobre la punta de los dedos de la pata) y ésta no era empleada para la propulsión del miembro. A partir del día 4 al día 21 post-lesión los animales adquirían gradualmente mayor destreza locomotora y después de la segunda semana los gatos

caminaban de manera correcta. Posteriormente, entre la tercera y cuarta semana post-lesión los animales ya podían correr, saltar y escalar. A partir del segundo mes, los gatos manifestaban una considerable mejoría en su desempeño locomotor. Hultborn y Malmsten (1983) consideraron que sus observaciones conductuales resultaban de “conexiones indirectas”, provenientes del lado contralateral no lesionado, que de alguna manera prevenían los síntomas de hiperreflexia o espasticidad, observados en los reflejos de raíz ventral registrados en el lado ipsilateral de la lesión. Resultados muy similares a los anteriormente descritos fueron reportados en la rata por Malmsten en 1983.

Por otra parte, Thompson y colaboradores (1992) mostraron que en la rata una semana después de la contusión medular (a nivel torácico medio), la excitabilidad refleja lumbar (determinada ésta a partir de la pendiente obtenida en la relación reflejo H/onda M, registrada en músculos plantares de la pata del animal, y el porcentaje de la salva aferente) se encontraba significativamente disminuida con respecto a los animales control. A los 28 y 60 días post-lesión, estos autores observaron la recuperación de las respuestas reflejas. Thompson y colaboradores (1992) consideraron que la reducción inicial de la excitabilidad refleja lumbar era el resultado de una marcada alteración en la actividad “de fondo” de las entradas inhibitorias y excitatorias que inciden sobre las motoneuronas espinales, como consecuencia de la contusión espinal.

Debido a lo anterior, cabría suponer que la notable incongruencia entre las observaciones realizadas en los estudios señalados, podría deberse a que éstos fueron realizados en distintas especies de animales y con protocolos de investigación diferentes. Llama la atención que el análisis de las respuestas reflejas, de raíz ventral y H, muestren resultados completamente distintos entre sí, por lo que se dificulta la apropiada interpretación de los mismos. Es por ello que en el presente trabajo de tesis se plantea el registro de los reflejos monosináptico y H de manera simultánea en la rata, lo cual permitiría determinar en

forma más apropiada el efecto que generan las lesiones espinales sobre las respuestas reflejas de la médula espinal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconocen cuáles serían las alteraciones que produce la lesión traumática por compresión en la médula espinal, a nivel de la octava vértebra torácica, sobre el reflejo monosináptico y el reflejo de Hoffmann en la rata.

HIPÓTESIS

La compresión espinal a nivel torácico producirá cambios de magnitud similar en la amplitud de los reflejos monosináptico y H, registrados en paralelo, en la rata.

OBJETIVO GENERAL

Establecer las posibles alteraciones producidas por la lesión traumática por compresión de la médula espinal, a nivel torácico, sobre la amplitud del RMS y el RH, registrados simultáneamente en la vía refleja del músculo plantar lateral de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Registrar en los animales control y experimentales de manera simultánea, las respuestas electroneurográficas (Potencial de acción compuesto –PAC- y reflejo monosináptico –RMS-) y electromiográficas (Onda M –OM- y reflejo de Hoffmann –RH-).
2. Determinar la amplitud del RMS y del RH, registrados en las ratas control, con lesión falsa y con lesión medular.
3. Utilizar técnicas histológicas que permitan determinar las zonas de la médula espinal dañadas por la lesión por compresión.

PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Las observaciones experimentales que comprenden este estudio fueron realizadas con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV, IPN (Protocolo 0267-05). Lotes de ratas macho adultas de la cepa Wistar, con un peso corporal entre 200 y 250 g. fueron mantenidos en un cuarto acondicionado para ello en las instalaciones del Bioterio general de la institución (a cargo del Dr. Ismael Jiménez E.), bajo condiciones constantes de temperatura y humedad y con períodos de luz-oscuridad constantes (12/12 hrs.) y libre acceso a agua y alimento. Se manejaron siete grupos de animales: un grupo control (no lesionado; n=5), constituido por ratas machos íntegros, a las que se les evaluó la actividad motora (escala de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB; 1995), el mantenimiento del equilibrio (barras estrechas) y el ambulante (análisis cinemático de la marcha sin restricciones; ver más adelante), así como se les registro la actividad refleja a nivel espinal (reflejo monosináptico, RMS) y periférico (reflejo de Hoffmann; RH). También se emplearon animales a los que se les practico una falsa lesión ("Sham", n=5 por día post-lesión) a los que se les analizó la conducta motora y los reflejos espinales a los 3, 15 y 30 días post-lesión y 3 grupos de ratas con lesión traumática por compresión a nivel torácico de la médula espinal (n=5 por día post-lesión) a los que se les realizaron las mismas observaciones conductuales y electrofisiológicas en las fechas señaladas (ver esquema adjunto).

**RATAS MACHO
ADULTAS
CEPA WISTAR
Peso 200 a 250g
n = 5 por gpo.**

GRUPO CONTROL	3 GRUPOS SHAM FALSA LESIÓN (3o, 15o, 30o DÍAS)	3 GRUPOS LESIONADOS (3o, 15o, 30o DÍA)
ACTIVIDAD MOTORA: 1. MÉTODO BBB. 2. MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA. 3. ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA.	ACTIVIDAD MOTORA: 1. MÉTODO BBB. 2. MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA. 3. ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA.	LESIÓN POR COMPRESIÓN ACTIVIDAD MOTORA: 1. MÉTODO BBB. 2. MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA. 3. ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA.
REGISTRO DE LA ACTIVIDAD REFLEJA.	REGISTRO DE LA ACTIVIDAD REFLEJA.	REGISTRO DE LA ACTIVIDAD REFLEJA.
	CORTES HISTOLÓGICOS DE LA MÉDULA ESPINAL	CORTES HISTOLÓGICOS DE LA MÉDULA ESPINAL

PROCEDIMIENTO PARA PROVOCAR LA LESIÓN ESPINAL POR COMPRESIÓN.

En su momento, cada una de las ratas de los grupos experimentales y con falsa lesión se anestesió mediante la aplicación intraperitoneal de hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal). Cada animal fue colocado en un aparato estereotáxico (tipo Horsley y Clark) para mantener fija la cabeza del animal y las extremidades fueron atadas firmemente a la mesa de disección para mantener inmóvil al animal. Inmediatamente después se realizó una incisión dorso-longitudinal en la espalda del animal, hasta exponer las láminas de los segmentos torácicos 8 a 10. Subsecuentemente se les practico una pequeña laminectomía bilateral, de aproximadamente 3 mm de diámetro en el segmento T-9, para exponer la superficie de la médula espinal. Cerca del orificio en T-9 se colocó una guía semi-rígida de acero inoxidable (Fig. M1) por donde se hizo pasar un catéter de Fogarty (2 French x 60 cm. Ethimed; Fig. M2) el cual se introdujo en sentido caudal hacia la vértebra T-8 a través del espacio epidural; de esa manera el catéter desinflado queda en posición dorsal del segmento T-8 de la médula espinal. Inmediatamente después se insufla el globo del catéter con una solución salina (20µl) y se deja en el sitio durante 5 minutos para provocar la compresión de la médula

espinal. Al pasar ese lapso de tiempo, se desinfla y retira el catéter de Fogarty. Después de realizar ese procedimiento, se colocaron en su sitio los tejidos separados (músculos y tejido conectivo) y se cose la piel con sutura absorbible. Finalmente, se le inyectan al animal 2 ml de una solución con varios antibióticos (Formicina 5 millones UI, Penicilina G y Procaina, 6 millones UI) y se rocía el área de la lesión con Furazolidona (polvo aerosol de 400ml) para evitar infecciones bacterianas. Posteriormente, los animales lesionados se colocan en cajas de acrílico individuales, y en los primeros cinco días posteriores a la lesión, se les proporciona una solución de 2 ml de formicina disuelta en 250 ml de agua, para continuar con la prevención infecciosa vía oral. Todos los días se les revisaba su condición física general y se les inducía manualmente la evacuación de la orina y los excrementos.



Figura M1: Dispositivo para la lesión espinal.

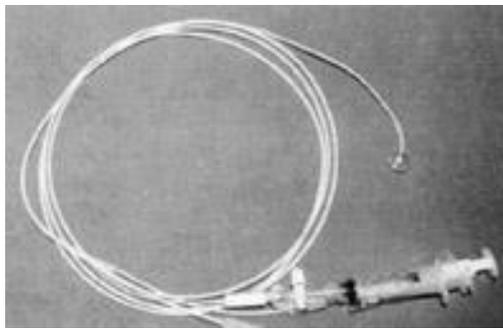


Figura M2. Catéter de Fogarty.

En el caso de los animales con falsa lesión, se les practicó una laminectomía bilateral en el segmento T9, por donde se les introdujo el catéter de Fogarty sin insuflar, dejándolo así durante 5 minutos en el segmento T8. Pasado ese tiempo se retira el catéter y se continúa con los procedimientos arriba mencionados para la recuperación de los animales.

EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA MOTORA.

Para tener una idea del grado de lesión, falsa o por compresión, de la médula espinal antes del registro electrofisiológico de las respuestas reflejas, se procedió a evaluar la conducta motora de los distintos grupos de animales mediante tres pruebas diferentes:

A) PRUEBA BBB.

La escala motora de Basso, Bresnahan y Beattie (BBB; Basso et al., 1995) (Ver Anexo 2) es una de las pruebas de campo abierto más utilizadas en la actualidad para evaluar el déficit funcional provocado por un trauma medular, así como su posible recuperación (Kubasak et al., 2008).

Antes de aplicar la prueba BBB se vaciaron las vejigas de los animales (ello se realizó debido a que el movimiento de las patas traseras a veces va acompañado de la contracción espontánea de la vejiga y de la expulsión de orina). La prueba BBB consiste en colocar a cada animal en una caja circular (1m de diámetro x 1 m de altura de la pared; Fig. M3) y permitirle el libre movimiento por toda el área de la caja, durante 5 minutos. La actividad motora de los animales fue video grabada con una videocámara comercial (JVC, mod. GR-D73U) y analizada independientemente por tres observadores (Dra. Berta Segura, FES Iztacala, Técnico José Carlos Guadarrama, Depto. de Fisiología, CINVESTAV y M. en C. Celia Reyes, Fac. Medicina). Los observadores calificaron los movimientos de las patas traseras de los animales y asignaron el valor o puntaje que sugiere la escala BBB.



Figura M3. Fotografía del campo abierto utilizado en el presente estudio para evaluar la conducta motora de la rata con el método BBB (Anexo 2).

La escala BBB señala el desempeño motor de las extremidades posteriores desde el grado 0 que va de una parálisis flácida total hasta el grado 21 presentando una marcha normal (Anexo 2), considerando:

- ❖ Amplitud del movimiento del tobillo, rodilla y cadera.
- ❖ Colocación plantar y soporte del peso por la pelvis.
- ❖ Frecuencia de pasos y coordinación entre patas traseras y delanteras.
- ❖ Alineación de la pata al dar el paso.
- ❖ Separación de los dedos.
- ❖ Posición de la cola.

B) MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA O DE EQUILIBRIO.

En el presente estudio se llevo a cabo la prueba de la Barra Estrecha o de Equilibrio siguiendo las indicaciones de Hicks y D' Amato (1975). Este método fue desarrollado por tales investigadores para evaluar la habilidad y destreza de los animales para atravesar tres barras de diferente anchura y forma.

La prueba consiste en que los animales deben atravesar tres barras de madera de un metro de largo y elevadas a 30 cm de la superficie, dos de ellas son planas y rectangulares, con una anchura de 2.3 cm y de 1.2 cm, respectivamente, mientras que la tercera es una barra cilíndrica, con el borde redondeado, de 2.5 cm de diámetro. En el caso de la barra rectangular plana de 2.3 cm los animales caminan con las patas separadas, mientras que con la barra de 1.2 cm caminan colocando las patas una enfrente de la otra. En cambio, en la barra cilíndrica los animales se desplazan con las patas prensando la barra (Figura M4).



Figura M4. Barras estrechas utilizadas para evaluar el equilibrio de la rata.

Las barras están divididas con líneas de tinta indeleble colocadas cada 25 cm y para valorar la habilidad de los animales para atravesar las barras se utilizó la siguiente puntuación: 0 puntos.- Incapacidad total del animal para caminar sobre la barra; 0.5 puntos.- Atraviesa un cuarto de la barra; 1 punto.- Atraviesa la mitad de la barra; 1.5 puntos.- El animal llega a $\frac{3}{4}$ de la barra y 2.0 puntos.- Camina la totalidad de la barra

Las sesiones fueron video grabadas y analizadas por distintos observadores (los mismos que evaluaron la prueba BBB), quienes asignaron por separado los valores correspondientes a cada animal de los distintos grupos control y experimentales.

C) ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA.

El análisis cinemático del ambulante permite cuantificar la secuencia de movimientos que ejecutan las extremidades posteriores de los animales durante una serie continua de zancadas.

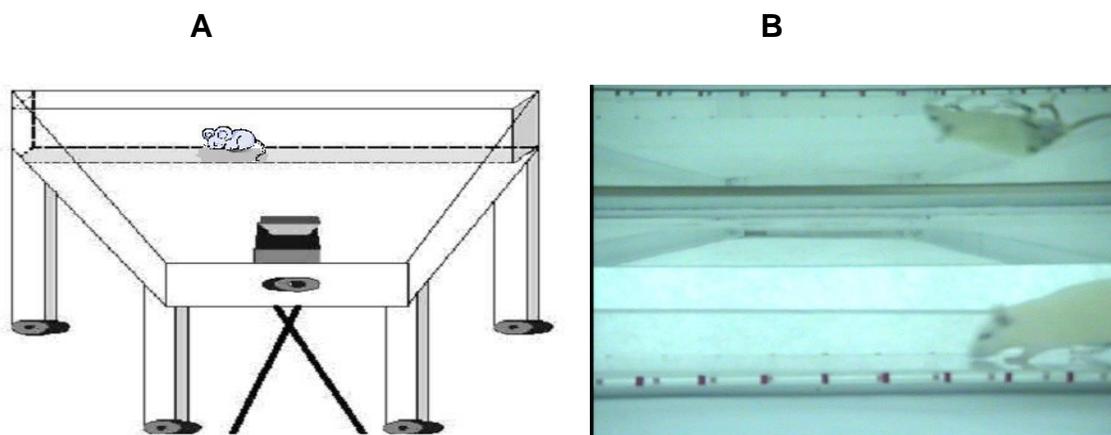


Figura M5. Ilustración del escenario (A) y de la pasarela (B) por donde caminaban los animales control y experimentales.

Para el análisis de la actividad ambulatoria, se rasura la mitad posterior del cuerpo de los animales, incluyendo las patas, derecha e izquierda, y se les coloca una marca de tinta (con plumón indeleble) sobre la piel de la cintura pélvica (en la cabeza del hueso ileo), cadera (unión del femúr y el ileo), la rodilla, el tobillo y el primer metatarso de cada pata. Subsecuentemente, los animales se introdujeron cada uno por separado, a una pasarela construida con paredes de acrílico transparente, en donde se video grabó su desplazamiento con una videocámara comercial (Sony) (Fig. M5). Para el análisis cinemático de la marcha se seleccionó el segmento de video grabación en el que el animal mostró una caminata estable, sin ningún tipo de distracción o detención, en el que diera cuando menos 4 zancadas de manera continúa.

FASES DE LAS ZANCADAS

SUBFASES DE LAS ZANCADAS (Philippson, 1905, Rossignol, 1996)

F= FLEXIÓN
E1= EXTENSIÓN DE LAS
ARTICULACIONES
DURANTE LA FASE DE
BALANCEO.
E2+E3= EXTENSIÓN DE
LAS ARTICULACIONES
DURANTE LA FASE DE
SOPORTE.

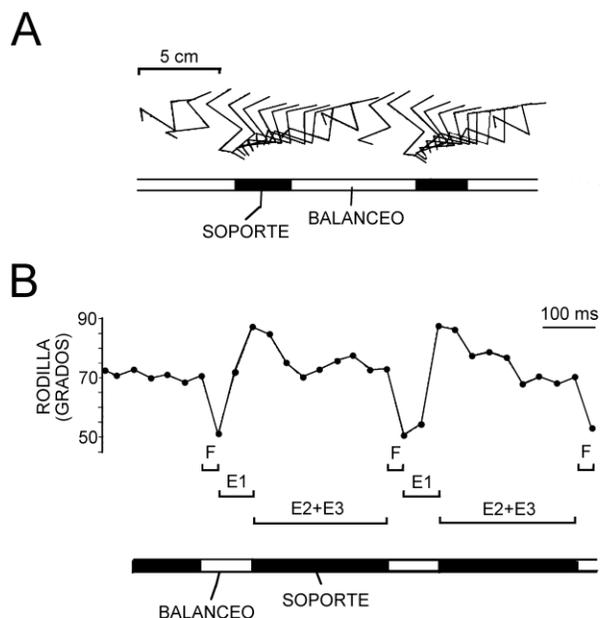


Fig. M6 Análisis cinemático de la marcha. En A se muestra el diagrama de líneas de los movimientos que realiza el animal durante una secuencia de zancadas. En B se ilustran los cambios en el ángulo de la articulación de la rodilla durante la secuencia de la marcha mostrada en A.

Al finalizar la video grabación, los animales fueron colocados de nuevo en su caja y la video grabación seleccionada fue digitalizada con el programa Pinnacle Studio V. 7 (Pinnacle Systems, Inc.), el cual permite obtener fotografías digitales de cada cuadro de la grabación (30 cuadros/segundo). De cada una de las fotografías se determinaron las coordenadas geométricas de las marcas colocadas en las articulaciones de los animales mediante el programa Image J (Scion Corporation; NIH). Las coordenadas así obtenidas se introdujeron a un programa computacional, diseñado ex profeso en el laboratorio, que une a cada una de las marcas de tinta con líneas continuas y las exhibe como un diagrama de líneas (Fig. M6A), lo que permite tener la secuencia total de movimientos de las patas de los animales durante la ejecución de varias zancadas. El programa también calcula los ángulos de las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo durante el desplazamiento de las extremidades (Fig. M6B).

A partir de la secuencia de movimientos de las extremidades se determinaron la longitud, la duración y la velocidad de las zancadas de las patas posteriores, así como los cambios angulares de las articulaciones y la duración de las fases de flexión (F) y extensión (E1, E2 y E3) que componen el ciclo de la zancada (Rossignol, 1996; Fig. M6).

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD REFLEJA.

Al terminar la evaluación de la actividad motora de las ratas control, con falsa lesión y lesionadas, se realizó la fase experimental para el registro electrofisiológico *in vivo* de los reflejos espinales, monosináptico y de Hoffmann, para lo cual los animales fueron anestesiados con una aplicación intraperitoneal de ketamina (120 mg/kg de peso) y xilazina (2 mg/kg de peso). El nivel de la anestesia se mantuvo constante a lo largo del experimento mediante la administración de la mitad de la dosis inicial de anestesia cada hora. Es importante mencionar que seleccionamos a la ketamina como anestésico debido a que este compuesto provoca una mínima depresión del reflejo monosináptico (Lodge y Anis, 1984; Tang y Schroeder, 1973).

Subsecuentemente, la rata fue sujeta a una tabla de corcho por medio de alfileres inoxidable insertados en las extremidades anteriores, mientras que las posteriores fueron sujetadas con cinta adhesiva para evitar en lo posible movimientos bruscos del animal.

La identificación y disección del nervio plantar de la extremidad inferior izquierda de la rata, se efectuó siguiendo las indicaciones anatómicas de Popesko (1992), dejando el nervio *in situ*, mientras que el resto de los nervios fueron seccionados distalmente. La disección de los nervios fue realizada tratando de dejar intacta, en lo posible, la integridad de los vasos sanguíneos y del tejido muscular de la pata del animal.

Para provocar las distintas respuestas electroneurográficas y electromiográficas en los animales empleados en este estudio, tanto controles como experimentales, se colocó un par

de electrodos de plata en forma de gancho en el nervio plantar lateral, a través de los cuales se aplicaron pulsos únicos de voltaje, de intensidad graduada, cada 8 segundos mediante un generador Digitimer (modelo D 4030), para evitar que los estímulos coincidieran temporalmente con el período refractario de la activación de las motoneuronas.

La actividad electroneurográfica del nervio plantar (potencial de acción compuesto - PAC- y el reflejo monosináptico -RMS-; Fig. M5) fue registrada mediante otro par de electrodos de gancho colocados distalmente en el mismo nervio plantar lateral y conectados a un preamplificador Grass modelo P511, el cual estaba conectado a una interfase Sony digital, a un osciloscopio digital (Gould DSO 1624) y a una computadora, en donde los registros fueron almacenados para su posterior análisis.

La actividad electromiográfica (Onda M y reflejo H; Fig. M7) fue registrada en el músculo plantar lateral, localizado en la región plantar de la pata de la extremidad posterior izquierda, para ello se insertó un par de electrodos de aguja entre los dedos 4° y 5° de la pata (Fig. M7). Los electrodos de registro fueron conectados a otro preamplificador (Grass P511) y la señal electromiográfica obtenida fue transferida a la interfase digital, al osciloscopio y la computadora para su posterior análisis.

La intensidad del estímulo aplicado se determinó a partir de la intensidad mínima necesaria (umbral; T), para generar un potencial de acción compuesto (PAC) apenas perceptible en el nervio plantar. Subsecuentemente se incremento gradualmente la intensidad del estímulo hasta alcanzar la máxima amplitud de las respuestas (intensidad supramáxima).

REGISTRO DE LAS RESPUESTAS REFLEJAS

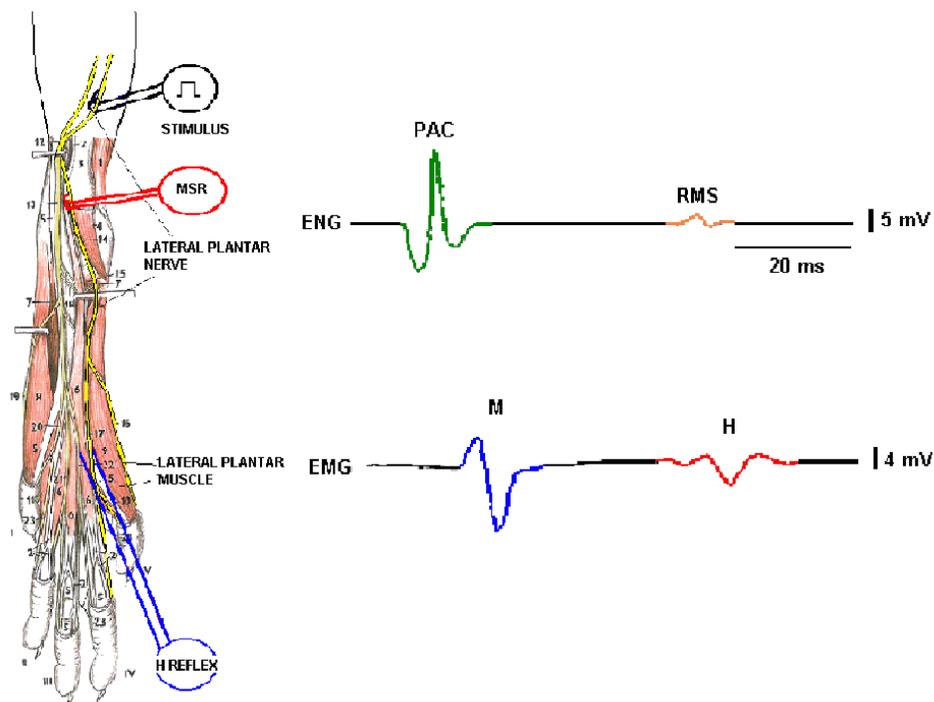


Figura M7. Representación esquemática del sistema de estimulación y del registro electrofisiológico, utilizado para analizar los reflejos H y monosináptico de la ratona a los 3, 15 y 30 días post-lesión.

Hecho lo anterior, se determinó la amplitud de cada uno de los registros electroneurográficos y electromiográficos (considerando el factor de amplificación empleado en cada uno de ellos) a partir de la medida directa de los trazos en el osciloscopio o mediante cursores contenidos en el programa de computo utilizado para el análisis de los registros, diseñado *ex profeso* para ello en el laboratorio del Dr. Jiménez.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se calculó el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (D.E.) y el error estándar (E.E.) de la amplitud al pico, de cada una de las respuestas electroneurográficas y electromiográficas registradas, así como el coeficiente de variación de Pearson para cada una de ellas ($CV = D.E./\bar{X}$) y el coeficiente de correlación (r) entre la amplitud del RMS y la del RH (Zar, 1974).

Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (Zar, 1974) para establecer las posibles diferencias entre grupos.

PERFUSIÓN.

A los animales se les practicó una toracotomía amplia, se les expuso la cavidad torácica y se le insertó una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón. Con unas tijeras de punta fina se realizó una incisión en la aurícula derecha del corazón para dar salida al líquido de perfusión. A través de la cánula y de un sistema de mangueras, frascos y llaves de paso (colocados a una altura de 1.5 m), los animales fueron perfundidos por gravedad con 40 ml de una solución de Krebs y 40 ml de una solución de paraformaldehído al 4%, hasta observar el cese de contracciones musculares y la presencia de rigidez corporal. Posteriormente, se extrajo un segmento de la región torácica de la médula espinal que comprendiese un centímetro rostral y uno caudal a la lesión en el segmento T8, el cual se colocó en un frasco con una solución de PBS, para asegurar la fijación, posteriormente se pasa a una solución de PBS + sacarosa al 30% para conservarla hasta el momento de realizar el análisis histológico del tejido.

HISTOLOGÍA.

El segmento de médula extraído fue colocado en un bloque de agar y se seccionó con un vibratomo, con el que se obtuvieron cortes de 50 μ de grosor. Dichos cortes fueron depositados en secuencia, conforme se iban obteniéndose, dentro de un recipiente con solución de PBS, para posteriormente colocarlos en un portaobjetos y proceder a la tinción con el método de violeta de cresilo para sustancia de Nissl (Ver Anexo 3). Las secciones espinales que muestran la lesión traumática, fueron fotografiadas con una cámara digital, para identificar las zonas lesionadas. Con las fotografías se determinó, la magnitud y los posibles tractos y vías espinales traumatizadas (véase la figura R1 en la sección de Resultados).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA LESIÓN POR COMPRESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL TORÁCICA.

Para establecer la magnitud de la lesión por compresión de la médula espinal torácica se emplearon dos enfoques, uno de índole histológico en el que se determinaron las regiones lesionadas por la compresión de la médula espinal mediante cortes histológicos y otro de tipo conductual, en el que se caracterizaron las alteraciones de la conducta motora de los animales previamente al registro electrofisiológico de la actividad refleja.

A)

B) ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES PRODUCIDAS POR LA COMPRESIÓN EXPERIMENTAL DE LA MÉDULA ESPINAL TORÁCICA.

Para determinar los tractos y vías afectadas por la compresión a nivel del 8º segmento torácico (mediante la insuflación controlada del catéter de Fogarty), se realizaron cortes histológicos de la región espinal que presentaba mayor grado de lesión. Los cortes histológicos ilustrados en A y B de la figura R1 muestran el grado de alteración tisular que presentaban las médulas espinales lesionadas, a los 3, 15 y 30 días post-lesión (se ilustran 2 médulas por período post-lesión). Los diagramas en C de la figura R1, ilustran de manera esquemática las áreas lesionadas (área en gris) de 5 médulas por período post-lesión. En la mayoría de los casos, la compresión espinal produjo un daño tisular intenso en regiones dorsales de la sustancia gris y blanca de la médula espinal torácica, el cual comprende áreas que corresponden a las columnas dorsales y parte de las columnas laterales, así como de ambos cuernos dorsales y la región intermedia de la médula espinal (Fig. R1).

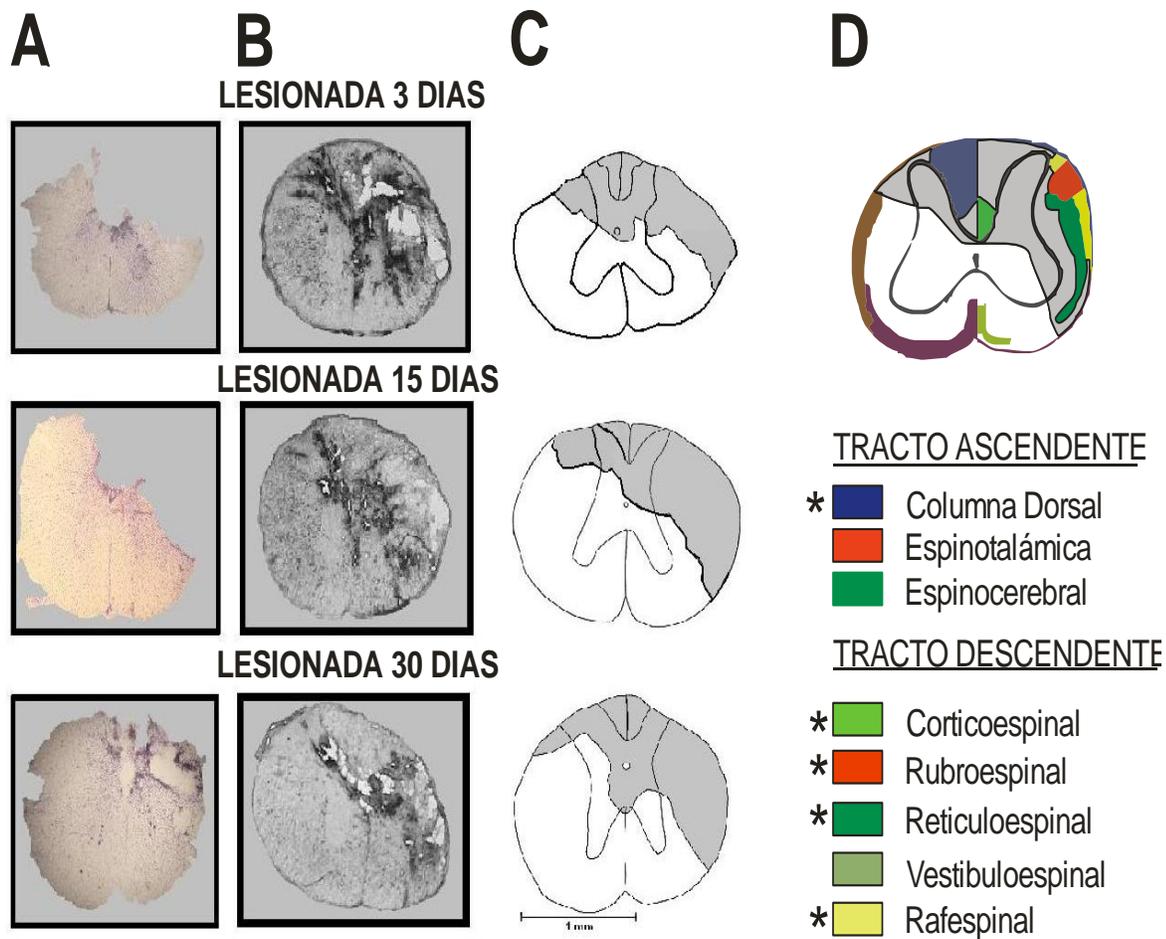


Figura R1. A y B: Cortes transversales de la médula espinal de distintos animales, a nivel del 8º segmento torácico, en donde se muestran los daños causados por la compresión traumática de la médula a los 3, 15 y 30 días post-lesión. C: Diagramas que ilustran, de manera resumida, las regiones espinales lesionadas por compresión a los 3, 15 y 30 días post-lesión (n=5 animales por día).

De la misma manera, la lesión de las columnas dorso-laterales del lado izquierdo de la médula espinal afecta notoriamente la trayectoria de varios tractos descendentes, tales como el haz cortico-espinal, así como los haces rubroespinal y reticuloespinal, sin verse afectado el haz rafé-espinal

Por otra parte, la lesión bilateral de los cuernos dorsales y de la región intermedia de la sustancia gris espinal afecta considerablemente a diversos sistemas propioespinales, algunos de los cuales participan en la regulación de la actividad de diversos grupos de interneuronas, localizados en segmentos caudales a la lesión y que participan, como centros de relevo, en la transmisión de información hacia centros supraespinales, como es el caso

del tracto espino-cerebeloso (Noble y Wrathall, 1985) o bien que participan en la regulación de la actividad neuronal basal de la médula espinal (Manjarrez, 2000).

B) EFECTO DE LA COMPRESIÓN ESPINAL SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE LA RATA.

1. PRUEBA BBB

Según la escala de la prueba BBB (Anexo 2), una puntuación de 0 corresponde a la ausencia total de movimiento voluntario y una puntuación de 21 indica locomoción normal. Cuando un animal presenta una puntuación de 14 indica la correcta colocación plantar, soporte de su peso y coordinación completa entre sus patas delanteras y traseras. La tabla R1 (Anexo 4) y la grafica de la figura R2 muestran los valores promedio (\pm E.E.) de la actividad locomotora observada en los grupos de animales control, falsa lesión (Sham) y lesionados. Los resultados obtenidos muestran que el grupo de falsa lesión con 3 días post-operación alcanzan una puntuación promedio de 19.5 ± 0.22 , los del grupo de 15 días post-operación tuvieron 19.8 ± 0.33 puntos, mientras que los animales del grupo 30 días post-lesión alcanzaron 20 ± 0.35 puntos de la escala BBB. Estos animales presentaron una alta capacidad de recuperación locomotora, mostrando una marcha plantar consistente y coordinada, en la cual las patas tenían una posición paralela al cuerpo del animal, tanto en el contacto inicial y en el despegue y con estabilidad del tronco y la cola consistentemente elevada.

Tras una lesión medular por compresión, las ratas son capaces de moverse libremente por el campo abierto sin necesidad de utilizar las patas traseras, e impulsando sus cuerpos con las patas delanteras, como es el caso de los animales con 3 días post-lesión (puntaje 0). A los 15 días post-lesión, los animales alcanzaron un puntaje de 6.2 ± 1.8 , presentando movimientos importantes en dos articulaciones de las extremidades posteriores (rodilla y

tobillo) y un movimiento ligero en la tercera (cadera). En cambio, los animales con 30 días post-lesión, presentaron una marcha plantar con soporte de peso consistente y una coordinación, ocasional, entre los miembros delanteros y traseros, alcanzando un puntaje promedio de 12 ± 1.5 . Conviene señalar que en los 3 grupos de animales lesionados (con 3, 15 y 30 días post-lesión), es factible observar con claridad que no presentan una correcta colocación plantar, así como un inadecuado soporte del peso corporal y escasa coordinación entre las patas delanteras y traseras, por lo que presentan un déficit funcional con poca capacidad de recuperación locomotora posterior al trauma medular.

Consistente a lo anterior, los grupos con falsa lesión de 3, 15 y 30 días no presentan diferencias significativas en su actividad motora en campo abierto con respecto a los animales control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$; Fig. R2). En cambio, los animales con lesiones por compresión presentan claras diferencias en su conducta motora con los animales control o con falsa lesión.

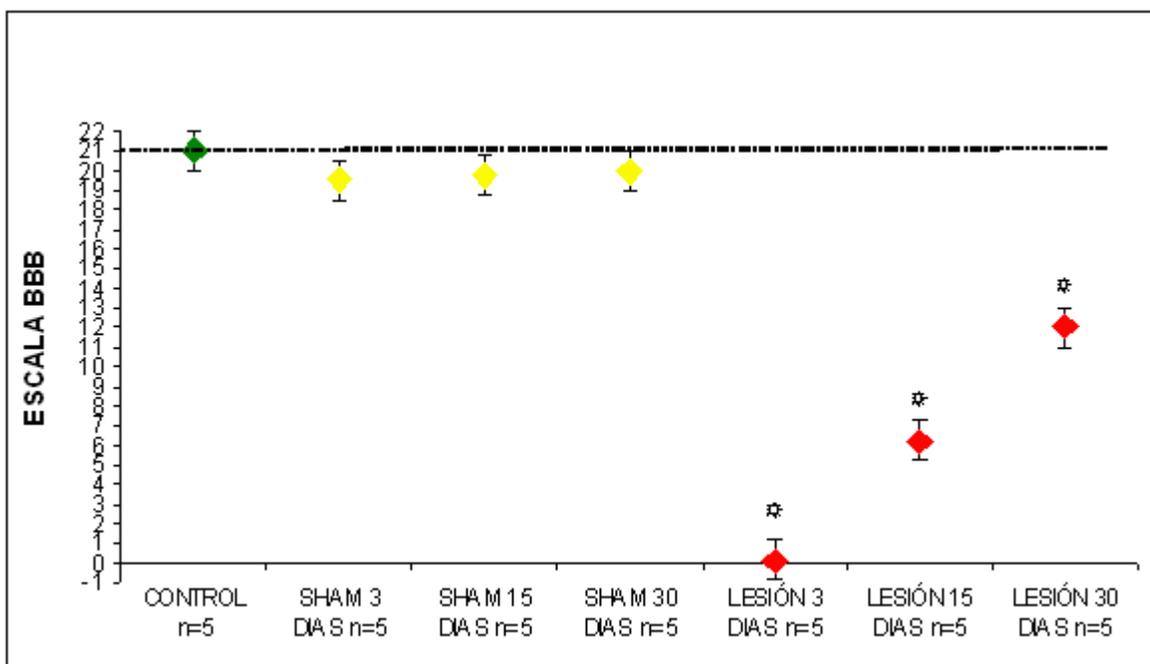


Figura R2. Desempeño motor de las extremidades posteriores de ratas control, con falsa lesión (a los 3, 15 y 30 días post-operación) y lesionadas por compresión del 8º segmento de la médula espinal torácica (a los 3, 15 y 30 días post-lesión), de acuerdo a la escala BBB (ver Tabla R1, anexo 4). Asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo lesionado con respecto al grupo control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$)

El grupo de 3 días post-lesión presenta una notoria parálisis flácida total, la cual contrasta significativamente de la actividad motora de las ratas control (Kruskal Wallis, $p>0.5$; Fig. R2). El grupo lesionado de 15 días presenta una ligera recuperación en su movilidad, pero significativamente inferior a la de los animales control (Kruskal Wallis, $p>0.5$; Fig. R2). En cuanto al grupo de animales con 30 días post-lesión, éstos muestran mayor grado de recuperación motora que la del grupo de 15 días post-lesión pero su actividad motora aun presenta una diferencia significativa en relación a la del grupo control y con falsa lesión (Kruskal Wallis, $p>0.5$; Fig. R2 y Tabla R1 del anexo 4).

2. MÉTODO DE LA BARRA ESTRECHA O DE EQUILIBRIO:

La tabla R2 (Anexo 4) y la gráfica de la figura R3 indican los valores porcentuales promedio de la destreza que muestran los animales de los grupos control, con falsa lesión y lesionados por compresión de la médula espinal torácica, para atravesar las distintas barras de equilibrio en estudio (ver la sección de Métodos)

Las ratas intactas no tuvieron problema alguno para atravesar la totalidad de la barra rectangular gruesa (barra 1), presentando un adecuado soporte y balanceo del peso así como una colocación exacta de las patas anteriores y posteriores (una al lado de la otra) sobre la barra. La barra rectangular estrecha (barra 2), los animales control la atravesaron hasta el $70\pm 26\%$, mientras que atravesaron el $90\pm 11\%$ de la barra cilíndrica (barra 3). En ambas barras, los animales presentaron un andar normal y buen soporte del peso corporal, pero algunos de ellos no tuvieron la capacidad suficiente para colocar de manera apropiada las plantas de las patas anteriores o posteriores (una tras la otra) sobre las barras, lo que en ocasiones causaba que se tropezaran entre sí y se producía la caída del animal.

El grupo con falsa lesión con 3 días post-lesión pudieron recorrer solo el $55\pm 33\%$ de la barra 1, el 75 ± 21 de la barra 2 y el del $90\pm 11\%$ de la barra 3. En cambio, el grupo de falsa lesión con 15 días recorrió el $90\pm 11\%$ de la barra 1, el $55\pm 33\%$ de la barra 2 y el $85\pm 12\%$ de la barra 3. Los animales del grupo con falsa lesión y 30 días post-lesión recorrieron el $65\pm 27\%$ de la barra 1, el $56\pm 28\%$ de la barra 2 y el $94\pm 7\%$ de la barra 3. En estos grupos de animales se observó que a pesar de que caminaban de manera continua sobre las barras, en ciertos momentos perdían la habilidad para balancear su cuerpo así como para colocar adecuadamente sus patas sobre las barras, produciendo su caída.

En el grupo con lesión medular por compresión de 3 días, se observa un recorrido nulo en las 3 barras, ya que las extremidades posteriores de estos animales presentan una incapacidad total para realizar movimientos ambulatorios sobre las barras. El grupo de animales lesionados, con 15 días post-lesión, tuvo un desempeño del $44\pm 49\%$ en la barra 1, $19\pm 33\%$ en la barra 2 y $38\pm 12\%$ en la barra 3.

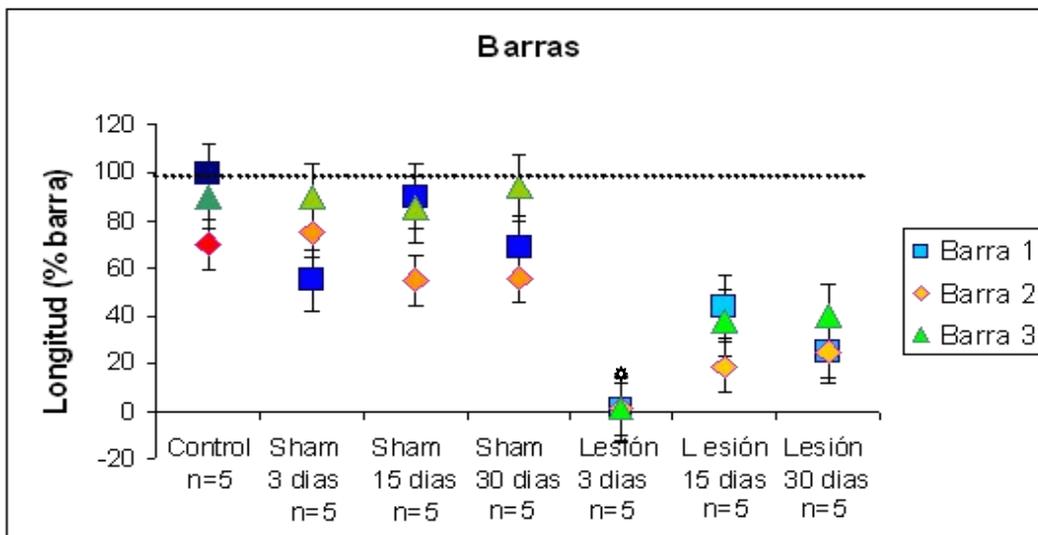


Figura R3. Porcentaje del recorrido de los distintos grupos de ratas control, con falsa lesión y con lesión traumática por compresión de la médula espinal torácica (T8) a través de diferentes barras de equilibrio (ver sección de Métodos). El asterisco indica diferencia significativa entre el grupo lesionado con respecto al grupo control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$).

En cambio, el grupo lesionado con 30 días post-lesión presento un recorrido del $25\pm 0\%$ de la barra 1, $25\pm 0\%$ de la barra 2 y $40\pm 38\%$ de la barra 3 (tabla R2 del anexo 4). Los animales con lesión medular que pudieron recorrer parte de las barras de equilibrio, lo hicieron gracias a que podrían soportar parcialmente de su peso corporal con la ayuda de los miembros anteriores.

En general, las barras que los diferentes grupos animales tuvieron mayores dificultades para recorrer fueron las rectangulares (barras 1 y 2), mientras que la barra cilíndrica (barra 3) fue la más fácil, lo que probablemente era debido a que los animales prácticamente se abrazaban de la barra.

Los valores alcanzados por los 3 grupos de falsa lesión (3, 15 y 30 días post-operación) así como los de los grupos de animales lesionados con 15 y 30 días post-lesión) en las tres barras de equilibrio no presentan diferencias significativas entre sí, así como con el grupo control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$; Fig. R4). En cuanto al grupo lesionado de 3 días, sus valores presentan diferencias significativas con respecto al grupo control en las tres barras recorridas (Kruskal Wallis, $p < 0.5$. Fig. R4).

3. ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA

Para establecer las alteraciones motoras que produce la lesión espinal traumática por compresión, en el presente estudio se determinaron algunos de los parámetros cinemáticos de la marcha sin restricciones de las ratas control, con falsa lesión y con lesión espinal. Los parámetros analizados fueron la duración, la longitud y la velocidad de las zancadas.

Como se puede apreciar en los diagramas de líneas de la Figura R4, las extremidades posteriores (solo se ilustra la extremidad izquierda) de los animales control (Fig. R4 A) y con falsa lesión (con 3, 15 y 30 días post-operación; Fig. R4 B) ejecutan una secuencia continua de movimientos durante las fases de balanceo (cuando mantienen la pata separada del piso)

y de soporte (con la pata tocando el piso) durante cada una de las zancadas. En cambio, las ratas del grupo lesionado con tres días post-lesión no presentan secuencia alguna de movimientos (Figura R4 C). Sin embargo, a los 15 y 30 días post-lesión los animales lesionados por compresión presentan secuencias de movimientos en sus extremidades posteriores que son similares a los de las ratas control y con falsa lesión (Fig. R4 C).

En cuanto a los parámetros cinemáticos de la marcha sin restricciones de los animales, no se presentaron diferencias significativas (Kruskal Wallis, $p < 0.5$) en la duración, longitud y velocidad de las zancadas ejecutadas por los grupos control, con falsa lesión (3, 15 y 30 días post-operación) y lesionados (15 y 30 días post-lesión) (Tabla R3, anexo 4 y Fig. R5).

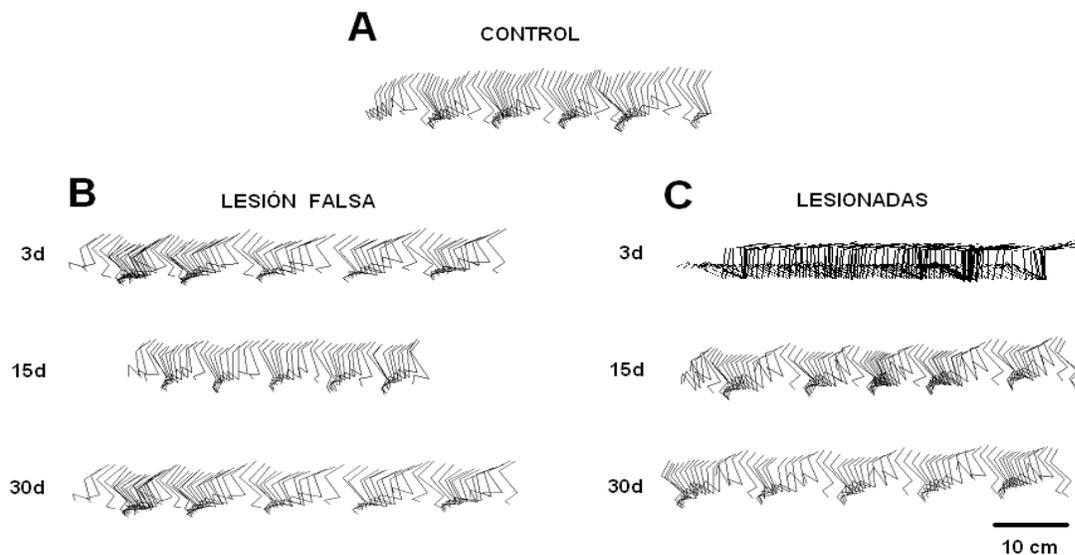


Figura R4. Diagramas de líneas que ilustran los movimientos de ratas control (A), con falsa lesión pero con distintos días post-operatorios (B) y con lesión espinal traumática por compresión a los 3 15 y 30 días post-lesión.

Siendo las ratas lesionadas con 3 días post-lesión los que manifestaron una notoria ausencia de movimientos locomotores y por ende, diferencias significativas en los parámetros cinemáticos de la marcha con respecto a los demás grupos de animales (Kruskal Wallis, $p < 0.5$).

Es importante señalar que las extremidades de los animales del grupo lesionado con 3 días post-lesión, no presentaban movimiento alguno y se desplazaban arrastrándose, valiéndose de sus extremidades anteriores, en cambio, los animales con 15 y 30 días post-lesión presentan una notable recuperación en sus parámetros cinemáticos y en los movimientos de las extremidades (Fig. R5), lo cual coincide con observaciones previas reportadas por Bareyre y colaboradores (2004) y por Barriere y colaboradores (2004).

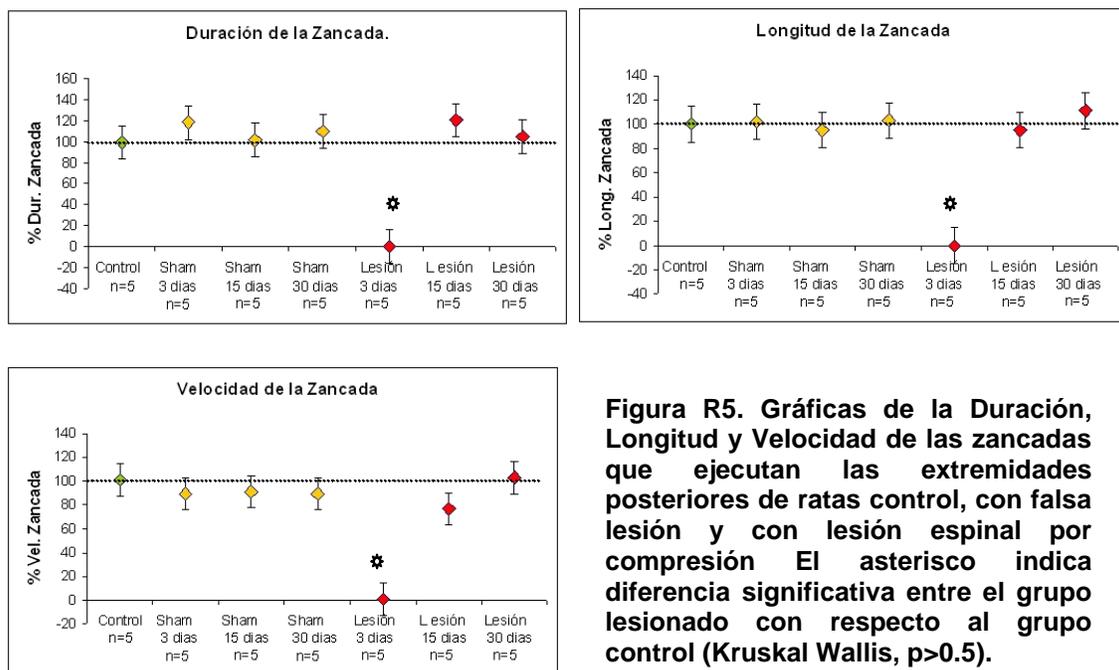


Figura R5. Gráficas de la Duración, Longitud y Velocidad de las zancadas que ejecutan las extremidades posteriores de ratas control, con falsa lesión y con lesión espinal por compresión. El asterisco indica diferencia significativa entre el grupo lesionado con respecto al grupo control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$).

C) EFECTO DE LA COMPRESIÓN ESPINAL TORÁCICA SOBRE EL REFLEJO MONOSINÁPTICO (RMS) Y EL DE HOFFMANN (RH) DE LA RATA.

La respuesta eléctrica (electroneurograma; ENG) producida por la estimulación eléctrica (1 pulso de 0.5 ms e intensidad supramáxima) del nervio plantar lateral y registrada en el mismo nervio plantar lateral presenta dos componentes, el primero con una latencia de 0.3-0.8 ms, que corresponde al potencial de acción compuesto (PAC) generado por la

excitación de axones aferentes y eferentes presentes en el nervio motor (Fig. R6). También se presenta un segundo potencial, de mayor latencia (2-3 ms), que corresponde al reflejo monosináptico (RMS), el cual es la respuesta refleja producida por la excitación de las motoneuronas espinales y que a su vez es generada por la estimulación de las fibras aferentes (Fig. R6; Stanley et al. 1981; Reyes et al. 2007, Ver Anexo 1).

De igual manera, la respuesta eléctrica que registrada en los músculos plantares (electromiograma; EMG) de la pata de los animales, presenta dos componentes, el primero de latencia corta (2-4 ms) denominado onda M (Fig. R6), que corresponde a la activación directa de las fibras musculares por axones motores y en su generación no participa ningún circuito espinal, y un segundo componente, de latencia más larga (8-12 ms), conocido como reflejo H, el cual resulta de la activación refleja de las motoneuronas espinales y cuyos axones eferentes inducen la activación de las fibras musculares (Magladery and McDougal, 1950, Mazzochio et. al. 1995; Gozariu et. al. 1998; Reyes et al. 2007; Fig. R6).

En la Figura R7 se ilustra la gráfica de la amplitud promedio de las respuestas RMS y RH obtenidas en los grupos de ratas control, con falsa lesión (3, 15 y 30 días post-operación) y con lesión traumática por compresión (3, 15 y 30 días post-lesión). Como se puede apreciar en esta figura, tanto el RMS como el RH de los animales con falsa lesión presentan menor amplitud (RMS: 49-87% y RH: 24-89% de depresión) que las respuestas registradas en los animales control. Por el contrario, el RMS de los animales con lesión espinal mostró una facilitación en su amplitud de $144 \pm 17\%$ aproximadamente a los 3 días post-lesión, la cual se incremento notablemente en el día 15 post-lesión, en donde se alcanzo una facilitación de más del $317 \pm 30\%$ aproximadamente, para decaer de magnitud a los 30 días post-lesión (aproximadamente a un $161 \pm 21\%$ de facilitación con respecto a los animales control; Fig. R7).

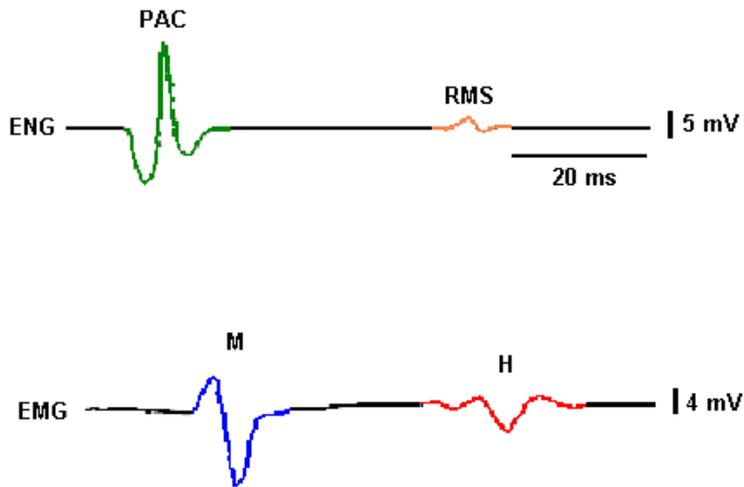


Figura R6. Respuestas electroneurografica (ENG) y electromiografica (EMG) producidas por estímulos únicos aplicados al nervio plantar lateral y registrados en paralelo en el mismo nervio y en el músculo correspondiente. Onda M=M; reflejo de Hoffmann (H); Potencial de acción compuesto =PAC y reflejo monosináptico (RMS).

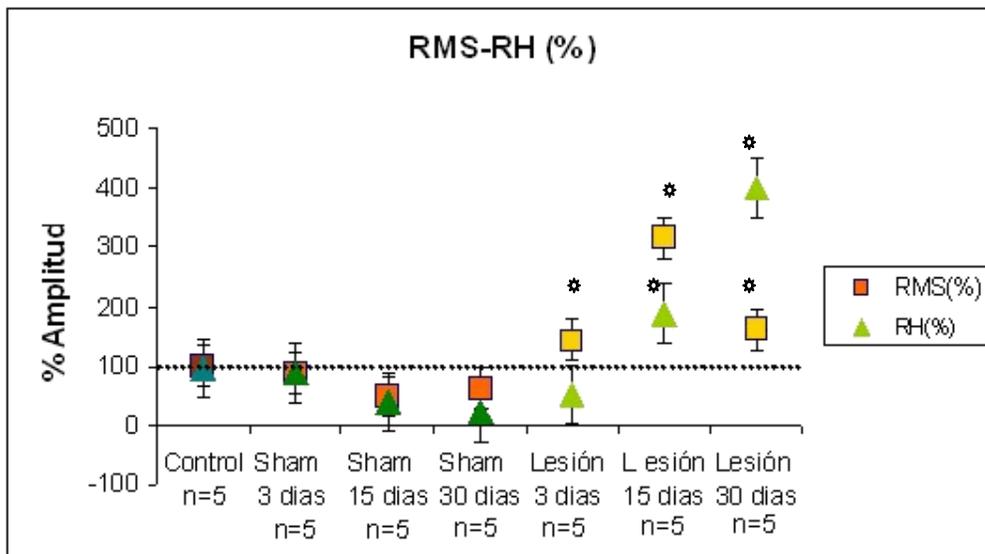


Figura R7. Amplitud promedio del RMS y del RH registrados en los animales de los grupos control, falsa lesión (3, 15 y 30 días post-operación) y con lesión traumática de la médula espinal torácica (3, 15 y 30 días post-lesión). Asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos lesionados con respecto al grupo control (Kruskal Wallis, $p > 0.5$).

En cambio, el RH de los animales lesionados a los 3 días post-lesión muestra una importante depresión en su amplitud (hasta un $53 \pm 17\%$ con respecto al valor de amplitud control), sin embargo a los 15 días post-lesión se presenta una importante facilitación de la

amplitud del RH (de aproximadamente el $190\pm 50\%$; Fig. R7), la cual se incrementa notablemente a los 30 días post-lesión (alrededor del $400\pm 19\%$ de facilitación; Fig. R7).

Puesto que los cambios observados en la amplitud del RMS y del RH en los animales lesionados no ocurren en paralelo (ver Fig. R7), resulta posible suponer que ambos reflejos son eventos independientes entre sí. Para explorar la posibilidad anterior, en el presente estudio se calculó el coeficiente de variación de cada reflejo para establecer si ambas respuestas varían de amplitud de la misma manera.

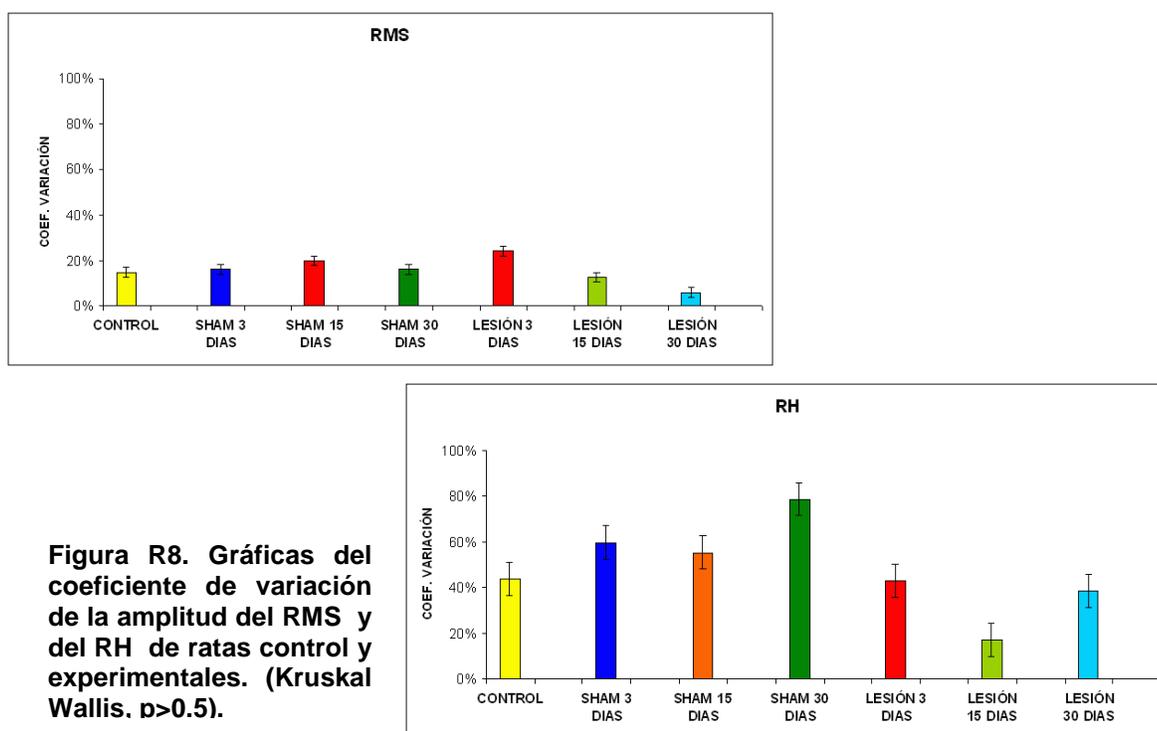


Figura R8. Gráficas del coeficiente de variación de la amplitud del RMS y del RH de ratas control y experimentales. (Kruskal Wallis. $p>0.5$).

El coeficiente de variación promedio en porcentaje (%) del RMS para cada uno de los grupos de animales control y experimentales alcanzan valores de entre el 6 al 24% (ver Fig. R8, Anexo 4) mientras que los valores correspondientes al RH son mucho mayores (entre el 17 al 79%; Fig. R8, Anexo 4), siendo tal diferencia estadísticamente significativa (Kruskal Wallis, $p<0.5$). Estos resultados indican que el RMS varía de amplitud en menor medida que el RH, en todos los animales de los grupos control, con falsa lesión y lesionados por compresión de la médula espinal.

La observación de que el RH presente mayor variabilidad en amplitud que el RMS, no es por si misma indicativa de que ambos eventos sean independientes entre sí. Para establecer si el RMS y el RH varían de amplitud de manera sincronizada, se determinó el coeficiente de correlación lineal (r) de la amplitud de ambas respuestas, registradas de manera simultánea, en los animales de los grupos control, con falsa lesión y con lesión espinal por compresión.

La grafica de la figura R9, Anexo 4, muestra los valores promedio (\pm E.E) del coeficiente de correlación lineal obtenido entre la amplitud de RMS y RH en las ratas control y experimentales (con falsa lesión y lesionadas). Como se puede apreciar en la gráfica, el coeficiente de correlación lineal obtenido en la mayoría de los grupos de animales es muy pequeño (menor a 0.1), con excepción del valor correspondiente a las ratas del grupo con falsa lesión a los 3 días post-lesión ($r=0.48$).

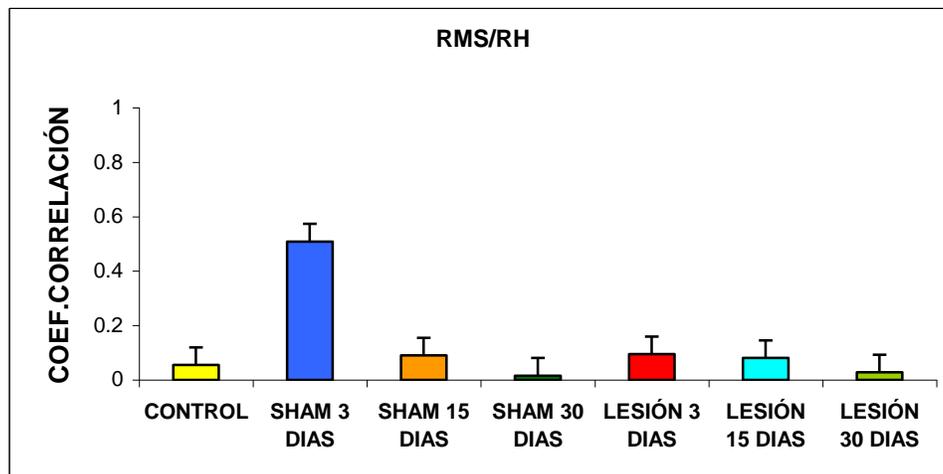


Figura R9. Coeficiente de correlación entre el reflejo monosináptico (RMS) y el reflejo de Hoffmann (RH)

Nuestros resultados permiten establecer que la variabilidad en la amplitud del RH no se encuentra asociada con la variabilidad del RMS, lo que podría sugerir que ambas respuestas son independientes entre sí (cuando menos en su variabilidad), a pesar de que son originadas por la activación de un mismo conjunto de motoneuronas espinales (del músculo plantar lateral) (ver anexo 1, Reyes et al. 2007).

DISCUSIÓN

LESIÓN MEDULAR, HISTOLOGÍA.

La compresión espinal produjo un daño tisular intenso en regiones de la sustancia gris y blanca de la médula espinal torácica, las cuales comprenden áreas que corresponden predominantemente a las columnas dorsales y relativamente poco a las columnas laterales, así como de ambos cuernos dorsales y la región intermedia de la médula espinal. Dado que las regiones lesionadas fueron similares en la mayoría de los animales experimentales (n= 15) se puede establecer que el modelo experimental del catéter de Fogarty es adecuado para lesionar por compresión a la médula espinal, ya que es reproducible y con un alto grado de confiabilidad (Metz et al., 2000). Puesto que la trayectoria de la mayoría de los axones aferentes, que provienen de receptores cutáneos y musculares, cursa por los cordones dorsales (Paxinos, 2004), llevando la información sensorial desde el sistema nervioso periférico hacia el central, es factible suponer que las lesiones espinales como las observadas en la médula espinal torácica, produzcan severas alteraciones funcionales, en particular sobre la transmisión de la información sensorial desde los segmentos espinales caudales hacia los distintos sistemas supra-espinales (por ejemplo, los tractos espino-tálamicos y espino-corticales; Paxinos, 2004).

PRUEBAS DE CONDUCTA MOTORA.

En relación a las pruebas de conducta motora seleccionadas para la evaluación de las alteraciones de los animales lesionados parecen ser las más adecuadas ya que con ellas es factible establecer apropiadamente los parámetros funcionales más importantes para el análisis de la conducta motora de la rata. De acuerdo a lo que se observó, la prueba BBB resultó ser ligeramente más confiable de los 3 métodos utilizados, ya que el puntaje de ésta

prueba es seguro, fácil y rápido de emplear y por lo tanto resulta ser muy útil para analizar la conducta locomotora de los animales con lesión medular por compresión o contusión, con la cual se pueden establecer con precisión los movimientos del cuerpo o habilidades de colocación de miembros posteriores, otra ventaja de esta prueba es que no es necesario un entrenamiento preoperatorio para su aplicación, más sin embargo esta escala es muy subjetiva en su puntaje para la determinación de la capacidad de equilibrio de los animales (Metz, 2000). Como segunda prueba que consideramos aporta mayor información para evaluar la habilidad motora de los animales es el método de la barra estrecha, el cual por medio del puntaje dado establece la agilidad y el control del equilibrio, esto es, con ella se evalúa la capacidad de las ratas para generar la fuerza y las posturas adecuadas que permitan mantener el centro de gravedad y el desplazamiento de los animales en las barras (Metz, 2000). Como último método, el análisis cinemático de la marcha sin restricciones es recomendable para analizar la secuencia temporal y espacial de los movimientos de las extremidades posteriores de los animales durante la marcha (Popovich y col. 1999; Westerga, 1990; Metz, 2000). La cinemática analiza el movimiento en términos de desplazamiento, tiempo, velocidad y aceleración. El análisis cinemático se complementa con la medición de las fuerzas asociadas al movimiento, la cinética. Durante la locomoción, la extensión de la rodilla no ocurre, ni de forma refleja, ni voluntaria, sino como parte de una cadena cinemática automática, bajo el control de unidades motoras activadas rítmicamente por pautas procedentes de redes de interneuronas espinales: el llamado generador central de pautas locomotoras (CPG, del inglés *Central Pattern Generator*). Estas redes reciben simultáneamente señales de sistemas sensoriales y del cerebelo, del tronco encefálico y de la corteza cerebral, las últimas bajo influencia de los ganglios basales. Los sistemas de control mencionados anteriormente permiten a cada organismo conferir un significado

conductual a sus movimientos automáticos. La locomoción requiere el automatismo espinal de las pautas neurales que generan las sinergias de flexión y extensión de las extremidades.

En su conjunto, los resultados obtenidos con las 3 pruebas conductuales utilizadas en el presente estudio (prueba BBB, barras de equilibrio y cinemática de la marcha) nos permiten establecer que los animales con falsa lesión tienen una conducta motora similar a la que presentan los animales control, lo cual podría sugerir que la exposición de la médula espinal por si misma no afecta notoriamente la conducta motora de la rata. Al contrario, los animales con lesión traumática espinal, a nivel del 8^o segmento torácico, presentan alteraciones de consideración en su conducta motora, las cuales van disminuyendo de magnitud a medida que se incrementa el tiempo post-lesión, lo que ocurre a pesar de que en a los 15 y 30 días post-lesión los animales presentan una importante lesión espinal (ver la sección de histología de las lesiones espinales).

De las observaciones realizadas se puede considerar que la lesión por compresión en el segmento T8 provoca alteraciones motoras de importancia en los distintos días post-lesión, con respecto a los animales control y con falsa lesión. Sin embargo, el hecho de que los animales lesionados presenten una notable recuperación motora a los 15 y 30 días post-lesión, evidenciada con las 3 pruebas de la conducta motora, a pesar de presentar una extensa lesión medular, reafirma la propuesta de varios autores de que en la zona de lesión se manifiesta un “puente neuronal funcional”, en el cual se establecen nuevas conexiones axonales y sinápticas entre grupos de neuronas que se encuentran en ambos lados de la lesión (por ejemplo, entre aquellas que conforman los Generadores de Patrones Locomotores de segmentos espinales adyacentes a la lesión) y con el lado contralateral de la lesión en la médula, de tal manera que el comando descendente locomotor pueda alcanzar

regiones espinales distales a través de vías neuronales diferentes a las que normalmente se utilizan (Barrière et. al. 2004).

Dado que los animales a los que se les realizó la evaluación motora fueron los mismos en los que se les llevaron a cabo las observaciones electrofisiológicas, podemos asegurar que en el momento de la experimentación los animales mostraban distintos grados de alteraciones motoras, dependiendo si éstos fueran del grupo control, con falsa lesión o lesionados.

Por último cabe mencionar que los resultados que se obtuvieron en la conducta motora por medio de los tres métodos son muy similares a los obtenidos en un estudio previo realizado en el laboratorio (Reyes, tesis de Maestría en Ciencias, 2003), en donde observamos que los animales lesionados por traumatismo por contusión a nivel torácico 8 presentan recuperación motora (locomoción, extensión de las patas y enderezamiento) a los 10 días post-lesión, ante una lesión por contusión, utilizando las pautas conductuales consideradas por Gale et. al. (1985). Estas observaciones en conjunto con las obtenidas en el presente estudio concuerdan con las reportadas por Barriere y colaboradores (2004) y por Majczynski y Slawinska (2007).

REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las observaciones experimentales que se obtuvieron en la presente tesis permiten proponer que la compresión experimental de la médula espinal torácica, a nivel del segmento T8 provoca a los 3 días post-lesión un efecto diferencial sobre las respuestas reflejas registradas en el nervio (reflejo monosináptico) y en los músculos (reflejo H) plantares de la rata, respectivamente. Esto es, la compresión espinal induce la facilitación del reflejo

monosináptico (144 ± 17) mientras que deprime el reflejo H ($53 \pm 17\%$). A los 15 y 30 días postlesión, tanto el RMS y el H se encuentran facilitados, aunque con distintos porcentajes de facilitación (15d: $\text{RMS}=317 \pm 30\%$ y $\text{RH}=190 \pm 50\%$ y 30d: $\text{RMS}=161 \pm 21\%$ y $\text{RH}=400 \pm 19\%$). Estas observaciones permiten suponer que la compresión espinal induce, de alguna manera, la separación de los procesos que modulan las respuestas reflejas a nivel espinal y periférico (ver más adelante).

Es ampliamente aceptado que el reflejo monosináptico, como su nombre lo indica, resulta de la activación de las vías conformadas por las fibras aferentes y las motoneuronas espinales (Stanley, 1981; Rudomín et. al. 1991), el cual es modificado en gran medida por las influencias descendentes o propio-espinales que actúan, ya sea a nivel post-sináptico sobre la motoneurona o presináptico sobre las mismas fibras aferentes (Rudomin, et al. 2000; Manjarrez, et. al. 2000; Gossard, et. al, 1999). En cambio, el reflejo H resulta de la activación sináptica de las motoneuronas y de las acciones sinápticas que éstas realicen sobre las fibras musculares, lo cual involucra la participación de cuando menos dos sinapsis interpuestas entre las fibras aferentes y los músculos (Sanes and Lichtman, 1999; Taborikova, 1968; Cheng et. al. 1998; Voigt and Sinkjaer, 1998). Esta configuración sináptica confiere la posibilidad de que la eficacia de ambas sinapsis (la aferente y la neuromuscular) se encuentren sujetas a mecanismos de modulación diferentes, los que pueden actuar por separado y de manera independiente entre sí. Esta posibilidad se ve reforzada por la observación de que las fluctuaciones en la amplitud del RMS no se encuentran correlacionadas linealmente con las fluctuaciones en la amplitud del RH (Reyes et al., 2007; Anexo 1).

Nuestros resultados también podrían indicar que el reflejo monosináptico representa con mayor fidelidad a la excitabilidad de las motoneuronas espinales, mientras que el reflejo

H es representativo de las fibras musculares activadas por la influencia sináptica de las motoneuronas (unidades motoras). Esto último, permite avizorar los posibles mecanismos involucrados en la generación de los efectos que produce una lesión espinal torácica sobre los reflejos monosinápticos y H. Por un lado, se conoce que una lesión espinal, por compresión, contusión o por sección induce la reducción de la entrada sináptica inhibitoria (segmental y/o descendente) ejercida sobre las motoneuronas espinales (Thompson, 1992) o bien por cambios en la concentración iónica extracelular que se derivan por la pérdida de líquido céfalo-raquídeo, asociada a la lesión medular, lo cual incrementaría la excitabilidad de las mismas, mientras que por el otro lado, se presenta la posibilidad de que, asociada a la lesión espinal ocurra una disminución en la eficacia sináptica de las terminales eferentes (uniones neuro-musculares) de las unidades motoras. Esto último podría estar relacionado con una posible reducción en la cantidad de neurotransmisor y factores tróficos que se liberan de la unión neuro-muscular (posiblemente por una disminución en el transporte axonal o en la síntesis del neurotransmisor o de factores tróficos), lo que a su vez podría explicar, por una parte la notoria reducción del reflejo H y por otra, la sensible disminución de la fuerza y masa muscular presentados por pacientes y animales experimentales con lesiones espinales (Schwab and Bartholdi, 1996).

En este aspecto, conviene señalar que la disminución de la amplitud del reflejo H también podría deberse a cambios en las propiedades electro-mecánicas de las fibras musculares. Recientemente han surgido evidencias experimentales que indican que, asociada a una lesión espinal, se presenta una reducción en la respuesta contráctil de los músculos, la cual posiblemente sea el resultado de alteraciones de los mecanismos encargados de la disposición de Ca^{++} intramuscular (Castro et al, 2000 A y B; Gerrits, et al. 2000) o bien, debidos a atrofia y/o a cambios en el fenotipo de las fibras musculares (Dupont-Versteegden, et al., 1998).

Cabe señalar que el reflejo H ha sido extensamente utilizado en una extensa variedad de estudios clínicos y de investigación sobre diversos padecimientos neurológicos, psiquiátricos; metabólicos, infecciosos o derivados de accidentes. Asimismo, el reflejo H ha sido empleado en distintos estudios con individuos normales, en reposo, durante la ejecución de un movimiento postural determinado o bien, en el proceso de locomoción. Particularmente, el registro del reflejo H ha probado su enorme utilidad en el desarrollo de procedimientos de rehabilitación, experimentales y/o clínicos, que han permitido reducir o mitigar las alteraciones provocadas por lesiones espinales, tanto en el humano como en los animales (como se ha comentado en la sección de Antecedentes). En este sentido, nuestras observaciones podrían sentar las bases para el diseño de procesos o procedimientos experimentales y/o clínicos que permitan disminuir por una parte, el incremento en la excitabilidad de las motoneuronas y por otra, el reducir la depresión muscular de los pacientes o animales experimentales con lesiones espinales.

Por otra parte, a partir de nuestros resultados también se podría proponer que el incremento en la excitabilidad de las motoneuronas es una respuesta adaptativa del sistema nervioso ante la ausencia de información sensorial, derivada ésta de la falta de actividad de los receptores del huso muscular o bien a la presencia de un proceso descendente desinhibitorio. Esta posibilidad adquiere fuerza si se considera que el efecto facilitador del reflejo monosináptico se observa a los 3 días post-lesión mientras que la disminución del reflejo H se sigue manifestando a los 3 días posteriores a la lesión espinal torácica. A los 15 días post-lesión tanto el reflejo monosináptico como el reflejo H manifiestan una facilitación en la respuesta, siendo ésta mayor para el reflejo monosináptico. A los 30 días post-lesión el efecto facilitador del reflejo H es mayor mientras que el reflejo monosináptico comienza a deprimirse, acercándose a los valores control. Las diferencias en la temporalidad de ocurrencia de los efectos producidos por la compresión de la médula espinal sobre el reflejo

monosináptico y el reflejo H reafirma la propuesta de que ambos reflejos están sujetos a mecanismos de modulación diferentes.

Es importante señalar que la disminución de la amplitud del reflejo H a los 3 días post-lesión ocurre en paralelo con una importante reducción de la conducta motora de los animales lesionados y la recuperación motora coincide con la facilitación del mismo reflejo. Ello concuerda con las observaciones realizadas por Thompson y colaboradores en la rata (1992) y más recientemente por Goto y Hoshino en el gato (2001) y reafirma la consideración de que el registro del reflejo H es un índice apropiado de la activación por vía nerviosa de las fibras musculares, por lo que resulta de gran utilidad para la caracterización del déficit motor evidenciado en los animales o pacientes con lesión espinal.

La caracterización e identificación de los posibles mecanismos involucrados en la generación de los reflejos espinales (monosináptico y H), cuya actividad estuviese afectada por la lesión espinal por compresión, requiere de la implementación de estudios más detallados, en los que se utilicen protocolos de investigación y procedimientos experimentales orientados hacia ese fin. Así mismo es necesario ampliar las diferencias en la temporalidad de los efectos producidos en el reflejo monosináptico como en el reflejo H ante una lesión traumática por compresión de la médula espinal torácica.

CONCLUSIONES GENERALES

1. La compresión experimental del octavo segmento torácico provoca daños tisulares de consideración en áreas dorsales e intermedias de las sustancias gris y blanca de la médula espinal.
2. La técnica del catéter de Fogarty es un modelo apropiado para provocar lesiones traumáticas por compresión en la médula espinal de la rata, ya que éstas tienen un alto grado de reproducibilidad.
3. Los experimentos realizados en el grupo de animales con lesión por compresión de la médula espinal, muestran una ligera pero importante recuperación en las pruebas de campo abierto (BBB), así como en el análisis de las barras de equilibrio a los 15 y 30 días posteriores a la lesión con respecto al grupo control. En cuanto al análisis de la caminata, nuestros resultados indican que los animales lesionados de 15 y 30 días recuperan su capacidad ambulatoria siendo esta muy similar a la del grupo control a pesar de que se manifiesta histológicamente una clara lesión en la médula espinal. Los animales con trauma por compresión a los 3 días post-lesión muestran una parálisis flácida total en los tres métodos utilizados para evaluar la actividad motora en relación al control.
4. En relación a los reflejos, a los 3 días post- lesión se observó una facilitación de la amplitud del RMS y una reducción del RH, mientras que a los 15 y 30 días, ambos

reflejos (RMS y RH) presentaron mayor amplitud que los del grupo control y con falsa lesión.

5. Nuestros resultados también indican que las fluctuaciones en la amplitud del reflejo monosináptico no muestran correlación lineal con las fluctuaciones de amplitud del reflejo H, lo cual sugiere que a pesar de que ambos eventos son manifestaciones de la actividad del mismo conjunto de motoneuronas, éstos presentan propiedades funcionales intrínsecas que las diferencian entre sí, esto es, que están sujetos a mecanismos de variabilidad diferentes.
6. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se propone que el aumento en la amplitud del reflejo monosináptico es el resultado de un incremento en la excitabilidad de las motoneuronas, el cual a su vez podría estar asociado a una reducción en la entrada sináptica inhibitoria, segmental o descendente, que incide sobre las motoneuronas espinales.
7. De igual manera, se propone que la reducción del reflejo H y de la actividad motora mostrada por los animales con lesión espinal podría resultar de alteraciones en la activación de las unidades motoras en el músculo plantar lateral, ya sea por cambios en la eficacia sináptica de las fibras eferentes (provenientes de las motoneuronas) sobre las fibras musculares, pudiendo ello estar asociado a una reducción en la liberación del neurotransmisor o de factores tróficos de la terminal nerviosa, aunado ello, a cambios en las propiedades contráctiles de las fibras musculares.



Absence of linear correlation between fluctuations in area of simultaneous recorded monosynaptic responses and Hoffmann's reflexes in the rat

Celia Reyes^c, Bertha Segura^b, Joaquina A. Reza^b, Maria Trinidad Pacheco^f, Joel Lomelí^d, José Carlos Guadarrama^a, Rosalinda Guevara^e, Ismael Jiménez^{a,*}

^a Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, Mexico

^b FES-Iztacala, UNAM, Mexico

^c INR, SSA, Mexico

^d ESM, IPN, Mexico

^e Depto. Fisiología, Fac. de Medicina, UNAM, Mexico

^f UIMEN, CMN Siglo XXI, IMSS, Mexico

Received 31 July 2006; received in revised form 3 October 2006; accepted 24 October 2006

Abstract

In this study we analyze the possible relationship between fluctuations in area of monosynaptic reflex responses (MSR) and Hoffmann's reflex (H reflexes) in the plantar closed loop pathway of the anesthetized rat. These reflexes were evoked by low-frequency stimuli applied to the sciatic nerve or lateral plantar nerve and then concurrently recorded on the distal tibial nerve or lateral plantar nerve, respectively as well as the lateral plantar muscles in the foot of the anesthetized rat. From trial to trial, H reflexes showed higher variability in area than MSR, whether the latter was recorded in the distal tibial nerve ($n=8$ experiments) or in the lateral plantar nerve ($n=5$ experiments). No linear correlation was found between changes in area of concurrently evoked MSR and H reflexes ($r_{(MSR-H,n=8)}=0.11 \pm 0.03$ and $r_{(MSR-H,n=5)}=0.08 \pm 0.09$, respectively). These findings suggest that trial-to-trial fluctuations in area of H reflexes may involve interaction of several sources of variation, among others to MSR variability (due to pre- and post-synaptic factors influencing the excitability of spinal motoneurons) in combination with those related to peripheral mechanisms, such as trial to trial activation of a different number of muscle fibers, either by the probabilistic transmitter release from neuromuscular junctions, by activation of motor units of variable size or to fluctuations in excitability of muscle fibers.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Spinal reflexes; Variability; ENG; EMG

It has been considered that monosynaptic responses (MSR) of spinal motoneurons recorded either in lumbosacral ventral roots or peripheral motor nerves as well as Hoffmann's reflex (H reflex) recorded in hindlimb muscles are a reliable representation of spinal motoneuron pool excitability [1,5,6,8–11]. Both reflexes are modulated by segmental and descending inputs [1,13] and a direct relationship between the mean amplitudes and areas of MSR and H reflexes has been reported [3].

It has long been known that successive MSRs, elicited by afferent stimuli of constant strength, show a considerable fluctuation in amplitude or area from trial-to-trial [3,6,8,13].

In addition, it has been suggested that such MSR variability is mainly originated by variations in transmitter release from Ia-afferent terminals, at the presynaptic level, and/or by fluctuations in the background interneuronal synaptic drive to motoneurons, at the postsynaptic level [4,8]. Rudomin and Madrid [13] reported that MSR variability is partly originated at the presynaptic level by activation of a particular set of spinal interneurons. They suggested that such presynaptic action could modulate the information transmitted from Ia fibers to motoneuron pools in the spinal cord. Hunt [6], and Rall and Hunt [11] demonstrated that the firing probability of individual motoneurons was partly correlated with the response amplitude of the homonymous motoneuron population. More recently, Gossard et al. [4] have shown that both pre- and post-synaptic mechanisms are involved in the generation of MSR variability. These authors suggested that fluctuations in motoneuron membrane

* Corresponding author. Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. CP 07360, Mexico. Tel.: +52 55 50613363; fax: +52 55 50613754.

E-mail address: ijimenez@fisio.cinvestav.mx (I. Jiménez).

potential, assumed to be mostly due to the activity of common last-order interneurons, is the major source of correlated variability. In this context, Manjarrez et al. [8] have shown that the fluctuation in monosynaptic reflex amplitude is originated, at least in part, from the spontaneous activity of a synchronized ensemble of spinal neurons located in the spinal dorsal horn, which exerts a synaptic drive on the spinal motoneuron pool.

The H reflex also shows a considerable variability in amplitude or area. Funase et al. [3] suggested that the source of variability of the H reflex evoked in the human soleus muscle is associated with a continuous change in excitability of the motoneuronal pool around a mean level. Much of the H reflex variability has been related to small changes in the level of activation of the motoneuronal pool during successive trials. Nozaki et al. [9] found in humans that H reflex variability was time-correlated owing to fractal characteristics and the M wave sequence had a significantly weaker time correlation. It was suggested by these authors that the fractal correlation of H-wave sequences was caused neither by the conduction through nerve fibers nor by transmission at the neuromuscular junction but, by exclusion, to synaptic connections to α -motoneurons in the spinal cord. According to the latter suggestion it might be expected that MSR and H reflexes evoked by the same pool of spinal motoneurons covaried synchronically in amplitude or area from trial-to-trial. To determine whether the variability of H reflexes is associated to the variability of MSR evoked by a unique pool of motoneurons in the spinal cord, we analyzed the changes in area of concurrently evoked MSR and H reflexes in the plantar closed loop reflex pathway of the rat. Some of these observations have been published previously in abstract form [12,14].

Guidelines contained in the NIH publications No. 80-23 (revised 1996) and the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) on Principles of Laboratory Animal Care were followed throughout this study. The experiments were performed in 13 adult male Wistar rats (225–260 g) anesthetized with an initial dose of ketamine (150 mg/Kg of weight, i.p.) and supplemented with additional doses of 75 mg/Kg, i.p. as required to maintain an adequate level of anesthesia, which was assessed routinely by verifying that the withdrawal reflex was absent after a strong pinch of the right hindlimb.

All left hindlimb nerves were sectioned with exception of the distal branch of the tibial nerve (first series of 8 experiments) or the lateral plantar nerve (second series of 5 experiments in which the medial plantar nerve was also sectioned) which were dissected and left intact with their insertion to plantar muscles ("closed loop condition"). Single voltage pulses (0.05 ms duration) were delivered from a pulse generator every 8 s to avoid rate depression of H reflex [5] during one hour ($n=450$ trials) and applied to the sciatic or proximal lateral plantar nerve through a pair of fine silver hook electrodes. The stimulus strength was gradually adjusted from the minimal voltage strength (0.43 ± 0.19 V, $1 \times T$) needed to evoke a barely discernible CAP response in the distal tibial or lateral plantar nerve.

In order to reduce the possible mechanical artifacts derived from muscle contraction, simultaneous electroneurogram (ENG) and electromyogram (EMG) recordings were per-

formed by means of fine "floating" chlorided silver electrodes either on the distal tibial nerve ($n=8$ experiments) or on the distal lateral plantar nerve ($n=5$ experiments) and in the lateral plantar muscles of the foot (between the 4th and 5th digit), respectively [2]. Both pairs of recording electrodes were connected to separate low noise, high gain pre-amplifiers (band pass filters set at 0.3 Hz in the low range and 10 KHz in the high range) which were subsequently connected to a digital oscilloscope and to a computer through a data acquisition system (ATMIO 16E2, National Instruments; 12 bits resolution). All ENG and EMG responses were digitized and stored by means of a specially designed computer program (at 100 bins of resolution and digitization rate of 3000 samples per second).

Trial by trial, latency of responses was measured with respect to the stimulus artifact by mean of one cursor located at the peak of the positive component (downward arrows in Fig. 1A) and the area of responses was determined between two cursors located at the peak of negative components of responses (upward arrows in Fig. 1A). Average (X), standard deviation (\pm S.D.) and coefficient of variation ($C.V.=S.D./X_{(area)}$) values of 450 samples were determined. Graphs illustrating the relationship between areas of MSR and H reflexes were constructed and their linear correlation coefficients ($r_{(MSR-H)}$) were calculated (Fisher Z test, $z_c=3.799$. $H_0: \rho=1$) [15].

When a sudden change or a continuous decrease in amplitude or area occurred at least in one of the ENG and EMG response potentials (suggesting a probable decay of the preparation or a mechanical displacement of recording electrodes in nerve or muscle) the recording session was concluded and the collected data was discarded. Finally, the animals were sacrificed by an overdose of anesthesia.

In a first series of experiments, single voltage pulses ($1.8 \times T$) applied to the sciatic nerve evoked ENG and EMG responses in the distal tibial nerve and lateral plantar muscles of the foot in the rat, respectively (Fig. 1A). In one representative experiment, ENG recording (upper trace in Fig. 1A) was mainly composed of two triphasic potentials, one corresponded to the propagated compound action potential (CAP) which had a peak-latency of 1.4 ms and the other to the monosynaptic reflex response (MSR) [7], which had a peak-latency of 7.0 ms. On the other hand, the EMG recording (lower trace in Fig. 1A) also showed two responses, one is the M wave with a peak-latency of 4.4 ms and the H reflex with a peak-latency of 9.4 ms. The elapsed time between CAP and MSR responses (5.6 ms) was relatively similar to that observed between the M wave and H reflex responses (5.0 ms). Similar values of the peak latencies of responses were obtained in the other 7 experiments (Table 1A). Such similarity in the time interval between responses indicate that MSR and H reflex responses are probably generated by activation of the same portion of plantar motor neurons in the spinal cord and both responses are propagated through the same peripheral pathway.

All ENG and EMG responses evoked by sciatic nerve stimulation during the same experiment of Fig. 1A, showed proportional increments in area as the stimulus strength was gradually increased (1 to $3 \times T$; Fig. 1B–E). Such increments in area are indicative of a recruitment order of gradually excited nerve or muscle fibers and the maximal area (obtained between 1.6 and

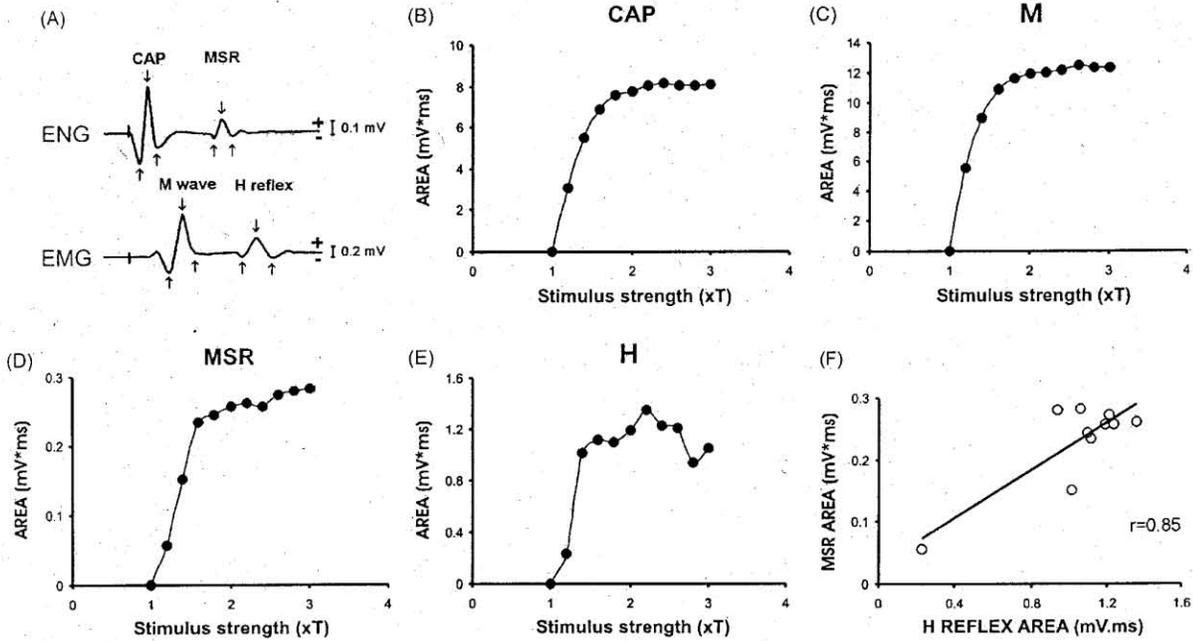


Fig. 1. Experimental paradigm and stimulus strength–response area relationship of concurrently evoked electroneurographic (ENG) and electromyographic (EMG) responses. (A) Concurrent ENG (upper trace) and EMG; (lower trace) recordings evoked in the distal tibial nerve and plantar muscles by single pulses of $1.8 \times T$ ($1 \times T=0.4$ V) applied to the sciatic nerve in one experiment, respectively. Arrows indicate the location of cursors used to determine time to peak and area of responses. (B–E) Stimulus strength ($\times T$) and response area (mV ms) relationships for compound action potential (CAP)(B), M wave (C), monosynaptic responses (MSR) (D), and H reflex (E). Each data point corresponds to the mean amplitude of 16 successive samples in one experiment. (F) The relationship between MSR and H reflex amplitude. Insert indicates the coefficient of linear correlation (r ; $z=55.15$, Fisher Z test).

$1.8 \times T$) represent activation of probably less than 50% of the spinal pool of plantar motor neurons. As illustrated in Fig. 1F, increments in area of MSR and H responses showed a linear relationship between each other, with a relatively high correlation coefficient ($r=0.83$; $z=55.15$, H_0 rejected, Fisher Z test). Similar findings were obtained in the following seven experiments and the mean value of the correlation coefficient was $r_{(\text{MSR-H})}=0.89 \pm 0.15$.

Trial-to-trial variability in area of ENG and EMG responses evoked by constant intensity stimulation applied to the sciatic

nerve ($1.8 \times T$) during 60 min ($n=450$ trials) is illustrated in Fig. 2A and B. From trial to trial all responses fluctuate in area around a mean value (CAP: 2.33 ± 0.042 mV ms; M: 0.22 ± 0.03 mV ms -not illustrated- MSR: 0.072 ± 0.004 mV ms and H: 0.34 ± 0.08 mV ms) and MSR responses (Fig. 2A) appear to occur with relatively small fluctuations in area and H reflexes seems to have larger fluctuations in area (Fig. 2B). In this experiment, the coefficient of variation of H reflex ($C.V._{(\text{H})}=0.251$) was higher than that of MSR ($C.V._{(\text{MSR})}=0.065$). In eight experiments, the mean coefficient

Table 1

Peak-latencies and areas of ENG and EMG responses evoked by (A) sciatic nerve or (B) lateral plantar nerve stimulation

	Peak-latency (ms)	Time-interval (ms)	Area (mV ms)	C.V.	$r_{(\text{MSR-H})}$
(A) Sciatic nerve stimulation					
CAP	1.3 ± 0.2		3.06 ± 1.06	0.020 ± 0.010	
MSR	6.6 ± 0.3	5.3 ± 0.4	0.096 ± 0.028	0.083 ± 0.035	0.11 ± 0.031
M	4.1 ± 0.4		4.97 ± 2.8	0.023 ± 0.009	
H	9.6 ± 0.5	5.4 ± 0.3	0.38 ± 0.17	0.354 ± 0.107	
(B) Lateral plantar nerve stimulation					
CAP	2.8 ± 0.6		0.60 ± 0.37	0.074 ± 0.030	
MSR	9.8 ± 1.0	7.1 ± 0.5	0.074 ± 0.014	0.158 ± 0.027	0.08 ± 0.09
M	3.1 ± 0.3		1.76 ± 1.19	0.152 ± 0.145	
H	10.9 ± 0.7	7.8 ± 0.7	0.31 ± 0.23	0.440 ± 0.173	

Average and standard deviation ($\bar{X} \pm S.D.$) values of peak-latency and area of ENG and EMG responses ($n=450$) evoked by (A) sciatic nerve ($n=8$ experiments) or (B) lateral plantar nerve stimulation ($n=5$ experiments) and their coefficient of variation (C.V.) and averaged correlation coefficient ($r_{(\text{MSR-H})}$; $z=50.21$, Fisher Z test) between MSR and H reflex responses are indicated. CAP, compound action potential; MSR, monosynaptic reflex response; M, direct M wave; H, Hoffmann's reflex.

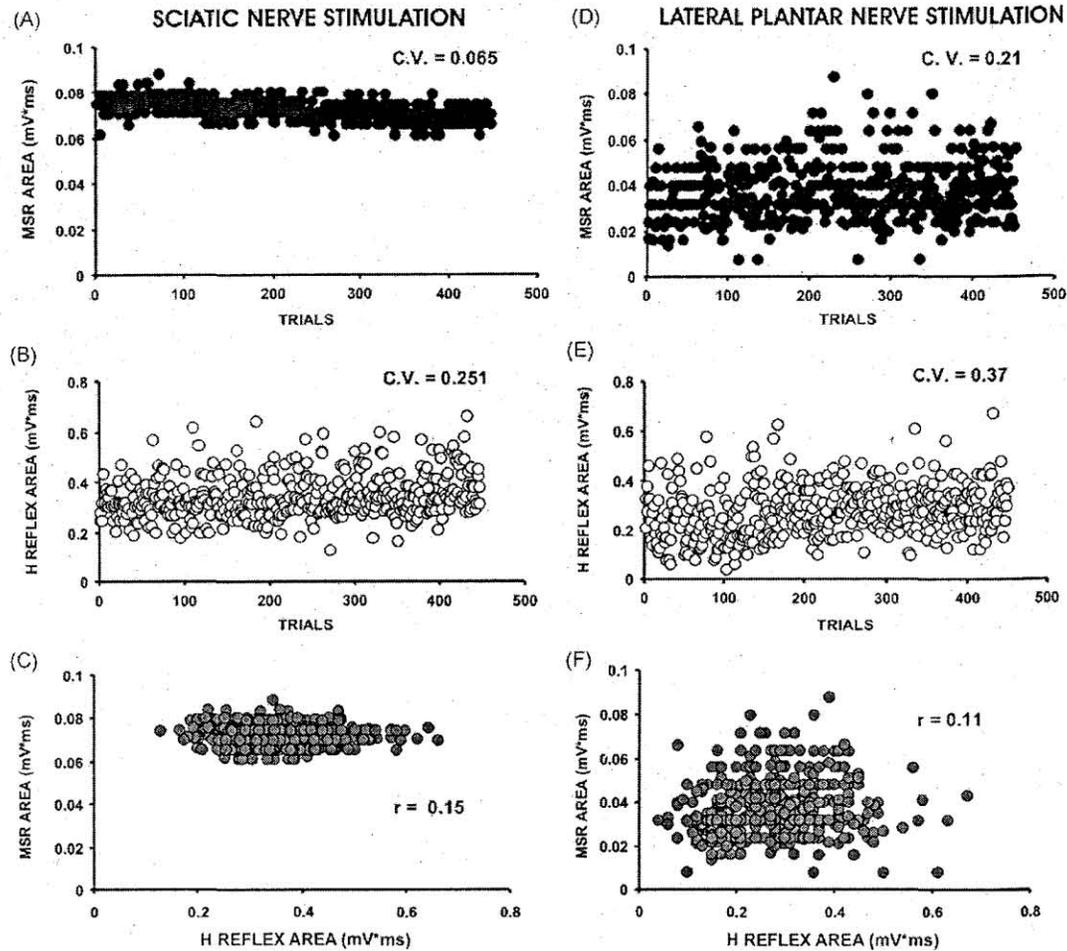


Fig. 2. Amplitude variability of MSR and H reflexes evoked by sciatic or lateral plantar nerve stimulation (450 trials at $1.8 \times T$). The area of successive MSR (A, D), H reflex (B, E), and the relationship between areas of MSR and H reflex responses (C, F) evoked by sciatic nerve stimulation and recorded in the distal tibial (A–C) or lateral plantar nerve and lateral plantar muscle (D–F). Values of the coefficient of variation (C.V.) and correlation coefficient (r) are indicated in inserts.

of variation of the H reflex area was fourfold that of the MSR responses and several times that of CAP and M responses (Table 1A).

As shown in Fig. 2C, a remarkable scattering of data values and a relative low linear correlation coefficient ($r_{\text{MSR-H}} = 0.15$; $z = 76.86$, H_0 rejected, Fisher Z test) was obtained between concurrent changes in area of MSR and H reflexes. The latter indicates a probable absence of association between changes in area of both responses. Similar scattering of values with a mean correlation coefficient of 0.11 ± 0.031 ($z = 78.11$, H_0 rejected, Fisher Z test) were determined in seven more experiments (Table 1A). The relative lack of correlation between area variability of MSR and H reflexes could suggest that both responses fluctuate in an independent way.

To activate only one pool of spinal motoneurons in an additional series of experiments ($n = 5$), MSR and H reflexes were evoked by constant intensity stimulation of the lateral plantar nerve and simultaneously recorded on the same lateral plantar nerve and in the corresponding lateral plantar muscle in the foot, respectively.

Fig. 2D and E illustrate the trial-to-trial variability in area of MSR and H responses evoked in one experiment by stimulation of the lateral plantar nerve and distally recorded in the same lateral plantar nerve, respectively. As with responses evoked by sciatic nerve stimulation, trial-to-trial MSR and H reflexes evoked by stimulation of the lateral plantar nerve fluctuate in area around a mean value (MSR: 0.041 ± 0.009 mV ms and H reflex: 0.28 ± 0.10 mV ms; Fig. 2D to E). In this experiment the variability of H reflexes occurs over a higher range than that of MSR (C.V._(MSR) = 0.21 and C.V._(H) = 0.37, respectively; Fig. 2D and E). In addition, the relationship between areas of MSR and H reflexes evoked by stimulation of the lateral plantar nerve showed a prominent scattering of data and low linear correlation coefficient ($r_{\text{MSR-H}} = 0.15$; $z = 77.08$, H_0 rejected, Fisher Z test; Fig. 2F). Statistical measures of ENG and EMG responses in the lateral plantar nerve and muscle in 5 experiments are shown in Table 1B.

In the present study we confirmed a direct relationship between the mean area of MSR and H reflexes evoked by graded stimulation of the sciatic nerve and recorded in the tibial nerve and plantar muscles, respectively, in the ketamine-anesthetized

rat. This observation is in agreement with the hypothesis that both responses are a reliable representation of the level of afferent activation in the spinal motoneuronal pool [6,10].

By contrast, we found a noticeable lack of linear correlation between changes in area of the MSR with regard to those concurrently observed in H reflex responses, both responses recorded in a closed-loop condition on the distal tibial or lateral plantar nerves and evoked by successive constant-intensity stimulus applied to the sciatic or lateral plantar nerves in the rat, respectively. This lack of correlation could imply that both reflexes fluctuate independently from each other and probably they are subjected to different sources of variation. Funase et al. [3] proposed that much of the variability of the H reflex in the soleus human muscle is associated with small changes in the level of activation of the motoneuronal pool during repeated trials. They also suggested that the source of variability of the H reflex is related to a continuous change in excitability of the motoneuronal pool around a mean level.

By analysis of the dynamic properties of soleus-H reflex amplitude variability recorded in humans, Nozaki et al. [9] reported that a sequence of H reflex amplitudes evoked from soleus human muscle was not random in time but was time-correlated owing to fractal characteristics (“fractal correlation”) and the M-wave amplitudes were similar to white noise with no time-correlation. Nozaki et al. [9] concluded that the fractal characteristics of H reflex amplitude variability were generated at the spinal level. The latter could imply that H reflex and MSR evoked by the same pool of motoneurons varied synchronously, a fact which was not observed in this study. Our results indicate that MSR and H reflex fluctuate in an independent manner from each other and absence of correlation between MSR and H reflex variability could suggest the probable participation of peripheral and spinal mechanisms that decorrelate the trial-to-trial fluctuations in area of H reflex and MSR responses evoked by activation of a part (25–40%) of plantar motor neurons in the spinal cord of the rat. In addition, it is suggested that H reflex variability could even be ascribed to the probable interaction of MSR variability (due to pre- and/or post-synaptic mechanisms affecting transmission in the Ia afferent – motoneuron pathway at the spinal level) [3,4,8] with peripheral sources of variation (i.e.: peripheral activation of a variable number of muscle fibers either by the probabilistic release of transmitter from the motor axonal terminations at the neuromuscular junction, by activation of motor units of variable size or to changes in excitability of muscle fibers or). However these possibilities need to be further evaluated by other experimental and/or analytical approaches than those implemented in this study, such as the analysis of

fractal time series analysis of sequential concurrently evoked MSR and H reflex responses [9].

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Alan Larsen for grammar corrections to the manuscript and Enrique Velázquez and Porfirio Reyes for their technical assistance in computer programming. Partially supported by Sistema Nacional de Investigadores, México.

References

- [1] X.Y. Chen, J.R. Wolpaw, Probable corticospinal tract control of spinal cord plasticity in the rat, *J. Neurophysiol.* 87 (2002) 645–652.
- [2] D.P. Crockett, S.L. Harris, M.D. Egger, Plantar motoneuron columns in the rat, *J. Comp. Neurol.* 265 (1987) 109–118.
- [3] K. Funase, T.S. Miles, B.R. Gooden, Trial-to-trial fluctuations in H reflexes and motor evoked potentials in human wrist flexor, *Neurosci. Lett.* 271 (1999) 25–28.
- [4] J.P. Gossard, M.K. Floeter, Y. Kawai, R.E. Burke, T. Chang, S.J. Schiff, Fluctuations of excitability in the monosynaptic reflex pathway to lumbar motoneurons in the cat, *J. Neurophysiol.* 72 (1994) 1227–1239.
- [5] M. Gozariu, V. Roth, F. Keime, D. Le Bars, J.C. Willer, An electrophysiological investigation into the monosynaptic H reflex in the rat, *Brain Res.* 782 (1998) 343–347.
- [6] C. Hunt, Monosynaptic reflex response of spinal motoneurons to graded afferent stimulation, *J. Gen. Physiol.* 38 (1955) 813–826.
- [7] D.P.C. Lloyd, Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat, *J. Neurophysiol.* 6 (1943) 293–315.
- [8] E. Manjarrez, J. Rojas-Piloni, I. Jiménez, P. Rudomin, Modulation of synaptic transmission from segmental afferents by spontaneous activity of dorsal horn spinal neurones in the cat, *J. Physiol.* 529 (2000) 445–460.
- [9] D. Nozaki, K. Nakazawa, Y. Yamamoto, Fractal correlation in human H reflex, *Exp. Brain Res.* 105 (1995) 402–410.
- [10] C. Perot, M.I. Almeida-Silveira, The human H and T reflex methodologies applied to the rat, *J. Neurosci. Methods* 51 (1994) 71–76.
- [11] W. Rall, C.C. Hunt, Analysis of reflex variability in terms of partially correlated excitability fluctuations in a population of motoneurons, *J. Gen. Physiol.* 39 (1956) 397–422.
- [12] A. Reza, B. Segura, J.C. Guadarrama, I. Jiménez, Absence of correlation between fluctuations in amplitude of Hoffmann and monosynaptic reflexes in the rat, *Soc. Neurosci. Abstr.* (2001) 299, 9.
- [13] P. Rudomin, J. Madrid, Changes in correlation between monosynaptic responses of single motoneurons and in information transmission produced by conditioning volleys to cutaneous nerves, *J. Neurophysiol.* 35 (1972) 44–64.
- [14] B. Segura, J. Lomelí, C. Reyes, J.C. Guadarrama, I. Jiménez-Estrada, Amplitude fluctuations of monosynaptic and H reflexes recorded in the lateral plantar pathway of the rat, *Soc. Neurosci. Abstr.* (2005) 299, 9.
- [15] J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey, 1974, p. 252 (Chapter 19).

ANEXO No. 2

ESCALA BBB

RATA: _____ FOLIO: _____ FECHA DE EVALUACIÓN: _____

EVALUACION: DIRECTA / VIDEO HORA DE EVALUACION: INICIO: ____:____ / TERMINO;____:____.

OBSERVADOR: _____.

0	No hay movimiento observable de miembros traseros (HL, HindLimb= miembro trasero)	
1	Ligero movimiento de una o dos articulaciones, generalmente de la cadera y/o la rodilla	
2	Movimiento importante de una articulación o movimiento importante de una articulación y un ligero movimiento de la otra articulación	
3	Movimiento importante de las dos articulaciones	
4	Ligero movimiento de la totalidad de las tres articulaciones de miembro trasero (HL)	
5	Ligero movimiento de dos articulaciones y movimiento importante de la tercera	
6	Movimiento importante de dos articulaciones y movimiento ligero de la tercera	
7	Movimiento importante de la totalidad de las tres articulaciones del miembro trasero (HL)	
8	Movimiento amplio sin soportar el peso o colocación plantar de la pata sin soporte del peso	
9	Colocación plantar de la pata con soporte del peso solamente en una postura (es decir, cuando se encuentra sin movimiento) o marcha dorsal con soporte de peso ocasional, frecuente o consistente y no recorrido plantar	
10	Marcha plantar ocasional con soporte del peso; sin coordinación entre miembros delanteros (FL) y miembros traseros (HL).	
11	Marcha plantar con soporte de peso de frecuente a consistente y ausencia de coordinación entre miembros delanteros y traseros (FL-HL).	
12	Marcha plantar con soporte de peso de frecuente a consistente y coordinación ocasional entre miembros delanteros y traseros (FL-HL).	
13	Marcha plantar con soporte de peso de frecuente a consistente y coordinación frecuente entre miembros delanteros y traseros (FL-HL).	
14	Marcha plantar con soporte de peso consistente y coordinación consistente entre miembros delanteros y traseros (FL-HL) y rotación (interna o externamente) de la posición predominante de las patas durante la locomoción cuando hace <i>contacto inicial</i> con la superficie además de ser justo antes de <i>despegarlas</i> al final de la postura; o marcha plantar frecuente, coordinación consistente entre miembros delanteros y traseros, así como una ocasional marcha dorsal	
15	Marcha plantar consistente con coordinación delantera-trasera consistente y sin espacio de libramiento de la punta de los dedos u libramiento ocasional de la punta durante el avance del miembro hacia delante; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial.	
16	Marcha plantar consistente con coordinación delantera-trasera consistente durante el andar y se presenta el espacio de libramiento de la punta de los dedos con frecuencia durante el avance del miembro hacia delante; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial y despegarla.	
17	Marcha plantar consistente con coordinación delantera-trasera consistente durante el andar y se presenta el espacio de libramiento de la punta de los dedos con frecuencia durante el avance del miembro hacia delante; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial y <i>a</i> despegarla.	
18	Marcha plantar consistente con coordinación delantera-trasera consistente durante el andar y se presenta el espacio de libramiento de la punta de los dedos de manera consistente durante el avance del miembro hacia delante; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial y <i>gira</i> al despegarla.	
19	Marcha plantar consistente con coordinación delantera-trasera consistente durante el andar y se presenta el espacio de libramiento de la punta de los dedos de manera consistente durante el avance del miembro hacia delante; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial y <i>a</i> despegarla, mientras que la cola se encuentra abajo una parte o la totalidad del tiempo.	
20	Marcha plantar consistente con andar coordinado consistente, espacio de libramiento de la punta de los dedos de manera consistente durante el avance del miembro hacia delante, posición predominante de la pata paralela al cuerpo en el contacto inicial y en el despegue, <i>con</i> inestabilidad del tronco; la cola se encuentra consistentemente arriba.	
21	Marcha plantar consistente con andar coordinado consistente, espacio de libramiento de la punta de los dedos de manera consistente, posición predominante de la pata paralela al cuerpo durante toda la marcha y estabilidad consistente del tronco; la cola se encuentra consistentemente arriba.	

ANEXO No. 3

METODO DE VIOLETA DE CRESILO PARA SUSTANCIA DE NISSL

Sumergir en H²O Destilada

EH-OH 50%_____3min

EH-OH 70%_____3min

EH-OH 96%_____3min

EH-OH 96%_____3min

EH-OH Absoluto_____3min

EH-OH Absoluto_____3min

EH-OH Absoluto_____ 2-3min

EH-OH Absoluto_____ 2-3min

EH-OH 96%_____2-3min

EH-OH 96%_____2-3min

EH-OH 70%_____2-3min

EH-OH 50%_____2-3min

H2O Destilada_____3min

COLORANTE_____5-6min

Sumergir en H2O Destilada 1vez

Sumergir en ET-OH's 50 veces

EH-OH 50%

EH-OH 70%

EH-OH 96%

EH-OH 96%

EH-OH Absoluto

EH-OH Absoluto (NOTA: Secar casi por completo)

Sumergir en ET-OH_Xileno 80 veces (NOTA: NO realizar este paso)

Xileno_____5min

Xileno_____5min (NOTA: NO dejar secar por completo)

Montar (Resina o DPX)

ANEXO No. 4.

TABLAS DE RESULTADOS

GRUPOS	PUNTUACION PROMEDIO (\pm E.E.) PRUEBA BBB
CONTROL	20.5 \pm 0.32
SHAM 3 DIAS	19.47 \pm 0.23
SHAM 15 DIAS	19.8 \pm 0.34
SHAM 30 DIAS	20 \pm 0.35
LESIONADA 3 DIAS	0 \pm 0*
LESIONADA 15 DIAS	6.17 \pm 1.79*
LESIONADA 30 DIAS	11.92 \pm 1.51*

4.1. Tabla R1. Muestra la puntuación promedio (\pm E.E.) del desempeño motor de las extremidades posteriores de ratas control, con falsa lesión (a los 3, 15 y 30 días post-operación) y lesionadas por compresión del 8º segmento de la médula espinal torácica (a los 3, 15 y 30 días post-lesión), de acuerdo a la escala BBB. (Kruskal Wallis, $p > 0.5$).

GRUPOS	PUNTUACIÓN PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA 1	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA 1	PUNTUACIÓN PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA 2	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA2	PUNTUACIÓN PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA3	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) BARRA3
CONTROL	2 \pm 0	100 \pm 0	1.4 \pm 0.55	70 \pm 26	1.8 \pm 0.27	90 \pm 11
SHAM 3 DIAS	1.1 \pm 0.65	55 \pm 33	1.6 \pm 0.55	75 \pm 21	1.8 \pm 0.45	90 \pm 11
SHAM 15 DIAS	1.8 \pm 0.45	90 \pm 11	1.1 \pm 0.82	55 \pm 33	1.7 \pm 0.45	85 \pm 12
SHAM 30 DIAS	1.4 \pm 0.75	69 \pm 27	1.13 \pm 0.63	56 \pm 28	1.87 \pm 0.25	94 \pm 7
LESIONADA 3 DIAS	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*
LESIONADA 15 DIAS	0.9 \pm 0.85	44 \pm 49	0.4 \pm 0.25	19 \pm 33	0.8 \pm 0.75	38 \pm 58
LESIONADA 30 DIAS	0.5 \pm 0	25 \pm 0	0.5 \pm 0	25 \pm 0	0.8 \pm 0.7	40 \pm 38

4.2. Tabla R2. Muestra la puntuación promedio (\pm E.E.) y el % promedio (\pm E.E.) del recorrido de los distintos grupos de ratas control, con falsa lesión y con lesión traumática por compresión de la médula espinal torácica (T8) a través de 3 diferentes barras de equilibrio. (Kruskal Wallis, $p > 0.5$).

GRUPOS PATA DERECHA	DURACIÓN ZANCADA (s) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO DURRACIÓN ZANCADA (±E.E.)	LONGITUD ZANCADA (cm) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO LONGITUD ZANCADA (±E.E.)	VELOCIDAD ZANCADA (cm/s) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO VELOCIDAD ZANCADA (±E.E.)
CONTROL	0.37±0.01	100±0	10.74±0.4	100±3.7	29.70±2.04	100±6.87
SHAM 3 DIAS	0.44±0.01	118±2.7	10.98±2.1	102±19.55	26.53±9.46	89±31.86
SHAM 15 DIAS	0.38±0.01	102±2.7	10.2±0.3	94±2.79	27.17±1.37	91±4.61
SHAM 30 DIAS	0.41±0.01	110±2.7	11.07±0.24	103±2.23	27.04±1.04	90±3.5
LESIONADA 3 DIAS	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*
LESIONADA 15 DIAS	0.45±0.02	121±5.4	10.19±0.31	95±2.88	22.85±1.18	77±3.97
LESIONADA 30 DIAS	0.39±0.01	105±2.7	11.9±0.36	111±3.35	30.49±1	103±3.36

GRUPOS PATA IZQUIERDA	DURACIÓN ZANCADA (s) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO DURRACIÓN ZANCADA (±E.E.)	LONGITUD ZANCADA (cm/s) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO LONGITUD ZANCADA (±E.E.)	VELOCIDAD ZANCADA (cm/s) PROMEDIO (±E.E.)	PORCENTAJE (%) PROMEDIO VELOCIDAD ZANCADA (±E.E.)
CONTROL	0.37±0.01	100±2.7	11.11±0.32	100±2.88	30.71±1.99	100±6.47
SHAM 3 DIAS	0.43±0.09	116±2.4	11.24±1.96	101±17.64	27.58±9.66	89±31.45
SHAM 15 DIAS	0.37±0.01	100±2.7	11.38±0.36	102±3.24	31.17±1.75	101±5.69
SHAM 30 DIAS	0.4±0.01	108±2.7	11.64±0.19	104±1.7	28.82±0.86	93±2.8
LESIONADA 3 DIAS	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*
LESIONADA 15 DIAS	0.45±0.02	121±5.4	10.09±0.34	90±3.06	22.94±1.36	74±4.42
LESIONADA 30 DIAS	0.4±0.01	108±2.7	11.6±0.34	104±3.06	29.36±1.3	95±4.23

4.3. Tablas R3. Muestran el promedio de la Duración, Longitud y Velocidad de las zancadas (±E.E.) y % promedio de la Duración, Longitud y Velocidad de las zancadas (±E.E.) que ejecutan las extremidades posteriores de ratas control, con falsa lesión y con lesión espinal por compresión. (Kruskal Wallis, $p>0.5$).

GRUPOS	AMPLITUD (mV) PROMEDIO (\pm E.E.) RMS	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) RMS	AMPLITUD (mV) PROMEDIO (\pm E.E.) RH	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) RH
CONTROL	24.19 \pm 0.31	100 \pm 3.2	16.5 \pm 0.13	96 \pm 1.3
SHAM 3 DIAS	21.13 \pm 0.2	87 \pm 22	15.06 \pm 0.16	89 \pm 1.7
SHAM 15 DIAS	11.90 \pm 0.24	49 \pm 2.6	6.24 \pm 0.04	38 \pm 2
SHAM 30 DIAS	15.46 \pm 0.34	64 \pm 3.4	3.99 \pm 0.02	24 \pm 2
LESIONADA 3 DIAS	34.73 \pm 0.37*	144 \pm 3.8*	10.18 \pm 0.2	53 \pm 2
LESIONADA 15 DIAS	76.62 \pm 0.2*	317 \pm 2*	31.94 \pm 0.36*	187 \pm 3.6*
LESIONADA 30 DIAS	40.63 \pm 0.3*	161 \pm 3*	65.17 \pm 0.45*	400 \pm 4.7*

4.4. Tabla R4. Amplitud promedio del RMS y del RH (\pm E.E.) y % promedio (\pm E.E.) registrados en los animales de los grupos control, falsa lesión (3, 15 y 30 días post-operación) y con lesión traumática de la médula espinal torácica (3, 15 y 30 días post-lesión). (Kruskal Wallis, $p>0.5$).

GRUPO	COEFICIENTE DE VARIACIÓN PROMEDIO (\pm E.E.) RMS	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) RMS	COEFICIENTE DE VARIACIÓN PROMEDIO (\pm E.E.) RH	PORCENTAJE (%) PROMEDIO (\pm E.E.) RH
CONTROL	0.15 \pm 0.024	15 \pm 2.4	0.44 \pm 0.09	44 \pm 9.6
SHAM 3 DIAS	0.16 \pm 0.044	16 \pm 4.4	0.6 \pm 0.08	60 \pm 8.7
SHAM 15 DIAS	0.2 \pm 0.07	20 \pm 7	0.6 \pm 0.28	56 \pm 28
SHAM 30 DIAS	0.16 \pm 0.009	16 \pm 0.9	0.79 \pm 0.29	79 \pm 29
LESIONADA 3 DIAS	0.24 \pm 0.056	24 \pm 5.6	0.43 \pm 0.13	43 \pm 13
LESIONADA 15 DIAS	0.13 \pm 0.076	13 \pm 7.6	0.17 \pm 0.02	17 \pm 2.7
LESIONADA 30 DIAS	0.06 \pm 0.011	6 \pm 1.1	0.39 \pm 0.14	39 \pm 14

4.5. Tabla R5. Coeficiente de Variación de la amplitud del RMS y del RH de ratas control y experimentales (\pm E.E.). (Kruskal Wallis, $p>0.5$).

GRUPOS	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (RMS VS RH) PROMEDIOS
CONTROL	0.05±0.03
SHAM 3 DIAS	0.51±0.14
SHAM 15 DIAS	0.09±0.08
SHAM 30 DIAS	0.02±0.014
LESIONADA 3 DIAS	0.09±0.09
LESIONADA 15 DIAS	0.08±0.06
LESIONADA 30 DIAS	0.03±0.01

4.6. Tabla R6. Coeficiente de correlación entre el reflejo monosináptico (RMS) y el reflejo de Hoffmann (RH) (±E.E.)

BIBLIOGRAFÍA.

- Agrawal SK, Fehlings MG. 1997. The effect of the sodium channel blocker QX-314 on recovery after acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*.14: 81-88
- Allen AR. 1911. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA*, 57: 878-880.
- Allison, SC. and Abraham, LD. 2001. Sensitivity of qualitative and quantitative spasticity measures to clinical treatment with cryotherapy. *Int. J. Rehabil. Res.* Mar; 24 (1): 15-24.
- Aloisi F, Ría F, Penna G, Adorini L. 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th-1 but not Th-2 cell activation. *J Immunol*, 160: 4671-4680.
- Amar AP, Levy ML. 1999. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*; 44: 1027-40.
- Andersen JB, Sinkjaer T. 1999. The stretch reflex and H-reflex of the human soleus muscle during walking. *Motor Control*. Apr; 3 (2): 151-7.
- Anthes DL, Theriault E, Tator CH. 1996. Ultrastructural evidence for arteriolar vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurgery*. Oct; 39 (4): 804-14.
- Armengol JA. 1999. Centros y vías nerviosas 1. Médula espinal, tronco del encéfalo y cerebelo. Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (eds). *Manual de Neurociencia*. Síntesis,,: pp 360-392
- ASIA American Spinal Injury Association. 1992. Standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. Chicago: ASIA.
- Bach y Rita, P. and Illis, LS. 1993 Spinal shock: possible role of receptor plasticity and nonsynaptic transmission. *Paraplegia* 31: 82-87.

- Balentine JD. Hypotheses in spinal cord trauma research. Becker DP, Povlishock JT, Bethesda MD (eds). 1985. Central nervous system trauma status report. NIH,: pp 455-461
- Balentine JD. 1988. Spinal cord trauma: In search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropath Exp Neurol*; 47 (2): 77-92.
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P and Kreutzberg GW. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 7: 111-118.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O and Schwab ME. 2004. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nature Neuroscience*; 7 (3): 269-277
- Barrière G, Mellen N, Cazalets JR. 2004. Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci*. Mar; 19 (5): 1325-35.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. 1996b. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experiences and teamwork on reability. Multicenter animals spinal cord injury study. *J Neurotrauma*, 13: 343-359.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Exp Neurol* 12: 1-21.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. 1996a. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, 139: 244-256.
- Benveniste EN. 1993. Astrocyte-Microglia interactions. Murphy S (eds). *Astrocytes: Pharmacology and function*. Academic Press,: pp 355-383

- Benveniste EN. 1992. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol*, 263: C1-C16.
- Bhaskar SH, Bhatia BD, Mahadevan S, Thombre DP, Krishnamurthy N. 1997. Electrophysiological studies in children with paralytic poliomyelitis. *Electromyogr Clin Neurophysiol*. Jan-Feb; 37 (1): 33-7.
- Bizzi E, Tresch MC, Saltiel P, Avella A. 2000. New perspectives on spinal motor systems. *Nature Rev Neurosci*, 1: 101-108.
- Bohlman, HH; and Ducker, TB. 1992 Spine trauma in adults. In: *The Spine*, edited by R. H. Rothman and F. A. Simeone. Philadelphia, PA: Saunders, p. 973-1104.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I, Mendez-Otero R, Nieto-Sampedro M. 1997. Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci*, , 5: 977-89.
- Braugher JM, Hall ED. 1992. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma*; 9 (Suppl 1): S1-S7.
- Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *PNAS*, 87: 682-685.
- Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD, Noyes DH. 1987. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impact device. *Exp Neurol*, 95: 548-570.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak, Lipston SA. 2000. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in the cerebrocortical neurons. *PNAS*, 97: 6161-6166.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol*, 151: 77-88

- Castro, MJ; Apple, DF. Jr; Melton-Rogers S. and Dudley, G. A. 2000 A Muscle fiber type-specific myofibrillar Ca (2+) ATPase activity after spinal cord injury. *Muscle Nerve*. Jan; 23 (1): 119-21.
- Castro, MJ; Apple, DF. Jr; Rogers S, and Dudley, G. A. 2000 B Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle mechanics within the first 6 months of injury. *Eur. J. Appl. Physiol*. Jan; 81 (1-2): 128-31.
- Chehrazi BB, Scremin O, Decima EE. 1989. Effect of regional blood flow and central control in recovery from spinal cord injury. *J. Neurosurg*. 71: 747-753.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar M, Frank M, Schnell L, Spillman A, 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*; 403: 434-9.
- Chen R, Corwell B, Yaseen Z, Hallett M and Cohen LG. 1998. Mechanisms of cortical reorganization in lower-limb amputees. *J Neurosci*. 18. 3434-3450
- Chen, XY; Chen, L. and Wolpaw, JR. 2001 Time course of H-reflex conditioning in the rat. *Neurosci. Lett*. Apr. 20; 302 (2-3): 85-8.
- Chen, XY; Feng-Chen, KC; Chen, L; Stark, DM. and Wolpaw, JR. 2001 Short-Term and medium-term effects of spinal cord tract transections on soleus H-reflex in freely moving rats. *J. Neurotrauma*. Mar; 18 (3): 313-27.
- Choi DW. 1987. Ion dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7: 369-379.
- Cliffer KD, Tonra JR, Carson SR, Radley HE, Cavnor C, Lindsay RM, Bodine SC, DiStefano PS. 1998. Consistent repeated M- and H-Wave recording in the hind limb of rats. *Muscle Nerve*. Nov; 21 (11): 1405-13.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in the rats and monkeys. *Nat Med*, 3: 73-76.

- Danner R, Leino E, Partanen J, Riekkinen PJ. 1981. Electrophysiological signs of peripheral nerve dysfunction in progressive myoclonus epilepsy. *Acta Neurol Scand.* Jun; 63 (6): 381-8.
- Danner R. 1981. [Measurements of nerve conduction velocity during decreasing toxic diphenylhydantoin levels and the beginning of carbamazepine medication. A clinical neurophysiological documentation (author's transl)] *Arch Psychiatr Nervenkr.*; 229 (3): 267-72. German.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. 1999. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19: 5810-5822.
- de la Torre JC. 1984. Spinal cord injury models. *Prog Neurobiol*, 22: 289-344.
- Delwaide PJ, Pepin JL, De Pasqua V, de Noordhout AM. 2000. Projections from basal ganglia to tegmentum: a subcortical route for explaining the pathophysiology of Parkinson's disease signs? *J Neurol.* Apr; 247 Suppl 2:II75-81.
- DeVivo MJ, Fine PR, Maetz HM, Stover SL. 1980. Prevalence of spinal cord injury: a reestimation employing life table techniques. *Arch Neurol.*; 37 (11): 707-8.
- Dickson DW, Mattiace LA, Kure K, Hutchins K, Lyman WD, Brosnan CF. 1991. Biology of disease. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immunodeficiency syndrome, 64: 135-156.
- Dimitrijevic MR, Larsson LE, Lehmkuhl D, Sherwood A. 1978. Evoked spinal cord and nerve root potentials in humans using a non-invasive recording technique. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Sep; 45 (3): 331-40. No abstract available
- Dishman JD, Bulbulian R. 2001. Comparison of effects of spinal manipulation and massage on motoneuron excitability. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* Mar; 41 (2): 97-106.

- Dong Y, Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia*, 36: 180-190.
- Dupont-Versteegden, E., Houle, J.D., Gurley, C.M. y Peterson, Ch. A. 1998. Early changes in muscle fiber size and gene expresión in response to spinal cord transection and exercise. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 275: 1124-1133.
- Eddleston M, Mucke L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disiasse. *Neuroscience*, 54: 15-36.
- El Masry WS, Tsubo M, Katoh S, El Miligui YH, Khan A. 1996. Validation of the American Spinal Injury Association (ASIA) motor score and the National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) motor score. *Spine (Phila Pa 1976)*. Mar 1; 21 (5): 614-9.
- Eldadah BA, Faden AI. 2000. Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *J Neurotrauma*, 17: 811-829.
- Faden AI, Simon RP. 1988. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol*; 23 (6): 623-626.
- Fawcett JW, Asher RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49: 377-391.
- Fehlings MG, Tator CH. 1999. An evidence-based review of decompressive surgery in acute spinal cord injury: rationale, indications and timing based on experimental and clinical studies. *J Neurosurg: Spine*; 91: 1-11.
- Fehlings MG, Tator CH. 1995. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, 132: 220-228.
- Fiskum G. 2000. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma*, 17: 843-855.
- Ford RW. 1983. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg*, 59: 268-275

- Freeman LW, Wright TW. 1953. Experimental observations of concussion and contusion of the spinal cord. *Ann Surg*, 137: 433-443.
- Funase, K. and Miles, TS. 1999 Observations on the variability of the H reflex in human soleus. *Muscle. Nerve*. Mar; 22 (3): 341-6.
- Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. 1985. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*, 88: 123-134
- Gerrits, HL; de Haan, A; Sargeant, AJ; Dallmeijer, A. and Hopman MT. 2000 Altered contractile properties of the quadriceps muscle in people with spinal cord injury following functional electrical stimulated cycle training. *Spinal cord*. Apr; 38 (4): 214-23.
- Gledhill RF, Harrison BM, McDonald W. 1973. Demyelination after acute spinal cord compression. *Exp. Neurol*. 38: 472-487.
- Giulian D, Ingeman JE. 1988. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci*, 8: 4707-4717.
- Gledhill RF, Harrison BM, McDonald WL. 1973. Demyelination after acute spinal cord compression. *Exp Neurol*, 38: 472-487.
- Goode DJ, Meltzer HY, Mazura TA. 1979. Hoffmann reflex abnormalities in psychotic patients. *Biol Psychiatry*. Feb; 14 (1): 95-110.
- Gordon PH, Wilbourn AJ. 2001. Early electrodiagnostic findings in Guillain-Barré syndrome. *Arch Neurol*. Jun; 58 (6): 913-7.
- Gossard, J. Bouyer, L. and Rossignol, S. 1999 .The effects of antidromic discharges on orthodromic firing of primary afferents in the cat. *Brain Res*. 17; 825: 132-145.
- Goto, T. and Hoshino, Y. 2001 Electrophysiological, histological, and behavioral studies in a cat with acute compression of the spinal cord. *J. Orthop. Sci*. 6 (1): 59-67.
- Goulart F, Valls-Solé J, Alvarez R. 2000. Posture-related changes of soleus H-reflex excitability. *Muscle Nerve*. Jun; 23 (6): 925-32.

- Gozariu M, Roth V, Keime F, Le Bars D, Willer JC. 1998. An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Res.* Jan 26; 782 (1-2): 343-7.
- Gruner JA. 1992. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 9: 123- 128.
- Guha A, Tator CH. 1988 Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 28: 481-490
- Guissard N, Duchateau J, Hainaut K. 2001. Mechanisms of decreased motoneurone excitation during passive muscle stretching. *Exp Brain Res.* Mar; 137 (2): 163-9.
- Guttman L. 1969. Clinical symptomatology of spinal cord lesions. In: Vinken PJ & Bruyn GW, editors. *Handbook of clinical neurology.* Amsterdam: North-Holland Publ.
- Hancock PJ, Williams LR, Sullivan SJ. 2001. The reliability of H-reflex recordings in standing subjects. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* Jan-Feb 41 (1): 9-15.
- Hayes KC, Allatt RD, Wolfe DL, Kasai T, Hsieh J. 1991. Reinforcement of motor evoked potentials in patients with spinal cord injury. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.*; 43: 312-329
- Hicks S, D'Amato CJ. 1975. Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats. *Am. J Anat.*; 143: 1-42.
- Higashi T, Funase K, Kusano K, Tabira T, Harada N, Sakakibara A, Yoshimura T. 2001. Motoneuron pool excitability of hemiplegic patients: assessing recovery stages by using H-reflex and M response. *Arch Phys Med Rehabil.* Nov; 82 (11): 1604-10.
- Hiraoka K. 2001 Phase-dependent modulation of the soleus H-reflex during rhythmical arm swing in humans. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* Jan-Feb; 41 (1): 43-7.
- Holstege G. 1995. The basic, somatic, and emotional components of the motor system in mammals. Paxinos G (eds). *The rat nervous system.* Academic press, pp 137-154.

- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Banik NL, Lee WA, Perot PL Jr. 1985. Alteration of thromboxane and prostacyclin levels in experimental spinal cord injury. *Neurology*, 35: 1003-1009.
- Hughes, J. T. 1974 Pathology of spinal cord damage in spinal injuries. In: Brock's Injuries of the Brain and Spinal Cord, edited by E. H. Feiring. New York: Springer, p.668-687.
- Hultborn, H. and Malmsten, J. 1983A. Changes in segmental reflex following chronic spinal cord hemisection in the cat. I. Increased monosynaptic test reflexes. *Acta Physiol. Scand. Dec*; 119 (4) 405-22.
- Hultborn, H. and Malmsten, J. 1983B. Changes in segmental reflexes following chronic spinal cord hemisection in the cat. II. Conditioned monosynaptic reflexes. *Acta Physiol. Scand. Dec*; 119 (4): 423-433.
- Ikata, T; Iwasa, K. Morimoto, K. Tonai, T. and Taoka, T. 1989 Clinical considerations and biochemical basis of prognosis of cervical spinal cord injury. *Spine* 14: 1096-1101.
- Joshi M, Fehlings MG. 2002a. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: 1, clip design, behavioral outcomes and histopathology. *J Neurotrauma* 19: 175-190.
- Joshi M, Fehlings MG. 2002b. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: 2, quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery. *J Neurotrauma* 19: 191-203.
- Kakulas, BA. and Taylor, JR. 1992. Pathology of injuries of the vertebral column and spinal cord. In: *Handbook of clinical Neurology*, edited by H. L. Frankel. Amsterdam: Elsevier, p. 21-51.

- Kelly JP. 1985. Anatomical basis of sensory perception and motor coordination. Kandel ER and Schwartz JH (eds). Principles of neural science. Elsevier: pp 222-243.
- Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg GW. 1990. Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. J Neurosci Res, 26: 278-287.
- Knikou M, Conway BA. 2001. Modulation of soleus H-reflex following ipsilateral mechanical loading of the sole of the foot in normal and complete spinal cord injured humans. Neurosci Lett. May 4; 303 (2): 107-10.
- Kolev OI, Milanov I. Central nervous system impairment in diabetic patients. Electromyogr Clin Neurophysiol. 1999 Dec; 39 (8): 479-84.
- Kraus JF, Franti CE, Riggins RS, Richards D, Borhani NO. 1975. Incidence of traumatic spinal cord lesions. J Chronic Dis.; 28: 471-92.
- Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, Takeoka A, McFarland KC, Muñoz-Quiles C, Roy RR, Edgerton VR, Ramón-Cueto A, Phelps PE. 2008. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. Brain. Jan; 131(Pt 1):264-76. Epub 2007 Dec 3.
- Kuruoglu HR, Oh SJ. 1994. Tendon-reflex testing in chronic demyelinating polyneuropathy. Muscle Nerve. Feb; 17 (2): 145-50.
- Kushnir, M; Klein, C. and Rabey, JM. 2001. H Reflex behavior in Parkinson's disease patients and patients with extrapyramidal and pyramidal signs combined. J. Neurol. Sci. May 1; 186 (1-2): 101-5.
- Kuypers HGJM. 1981. Anatomy of the descending pathways. Brooks VB (eds). Handbook of Physiology, section 1: The Nervous system, Vol II, Motor Control. American Physiological Society, pp 597- 666.

- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. 1987. Alterations in tissue Mg⁺⁺. Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats *Bioch Cioph Res Com*; 147 (3): 1170-1175.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosomal compounds. *Nature*, 364: 626-631.
- Little JW, Halar EM. 1985. H-reflex changes following spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. Jan;66 (1): 19-22.
- Lodge, D. and Anis, N. 1984. Effects of ketamine and three other anesthetics on spinal reflexes and inhibitions in the cat. *Br. J. Anaesth*. 56: 1143-1151.
- Lu, J; Feron, F; Ho, SM; Mackay-Sim, A. and Waite, PM. 2001. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain. Res*. Jan 19; 889 (1-2): 344-57.
- Luque D., Jiménez-Estrada, I., Martínez-Fong, D., Segura, B., Guadarrama, JC, Paniagua R., Vargas H., Rios A. y Escalante, B. 2007. Hindlimb claudication reflects impaired nitric oxide-dependent revascularization after ischemia. *Vascular Pharmacology* 46: 10-15.
- Magladery, J. and Mcdougal, D. 1950. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in man. Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fiber. *Bull Johns Hopkins hosp*. 86: 265-290.
- Majczynski, H. y Slawinska, U. 2007. Locomotor recovery after thoracic spinal cord lesions in cats, rats and humans. *Acta Neurobiol. Exp*. 67: 235-257
- Malmsten, J. 1983 Time course of segmental reflex changes after chronic spinal cord hemisection in the rat. *Acta Physiol. Scand*. Dec; 119 (4): 435-43.

- Manca M, Cavazzini L, Cavazza S, Salvadori T, DeGrandis D, Basaglia N. 1998. H reflex excitability following voluntary muscle contraction of different duration. *Electromyogr Clin Neurophysiol. Sep; 38 (6): 381-4.*
- Manjarez, E. Rojas-Piloni, J. Jiménez, I. and Rudomin, P. 2000. Modulation of synaptic transmission from segmental afferents by spontaneous activity of dorsal horn spinal neurones in the cat. *J. Physiol. 1; 529, 2:445-460.*
- Mansouri B, Pakdaman H, Yassami S, Karimzadeh A. 2001. The changes in the transmission functioning of the ulnar nerve in a high power magnetic field. *Electromyogr Clin Neurophysiol. Jul-Aug; 41 (5): 269-71.*
- Martin D, Robe P, Franzen R, Delrée P, Schoenen J, Stevenaert A, Moonen G. 1996. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J Neurosci Res 45: 588-597.*
- Martin JH. 1998. *Neuroanatomía. Prentice Hall. 2 edición.*
- Martinez A, Marcillo AE. 1995. Modelos experimentales de la lesión medular. *Médula Espinal, 1: 15-20.*
- Mazaira J. 1997. Epideimología de la lesión medular de 8 comunidades autónomas, 1974-1993. *Médula Espinal, 3: 28-57.*
- Mazzini L, Balzarini C, Gareri F, Brigatti M. 1997. H-reflex changes in the course of amyotrophic lateral sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol. Sep;1 04 (5): 411-7.*
- Mazzocchio, R. Rothwell, J. and Rossi, A. 1995. Distribution of Ia effects onto human hand muscle motoneurons as revealed using an H-reflex technique. *J. of Physiology. Vol. 489.1: 263-273.*
- McDonald JW, Sadowsky C. 2002. Spinal cord injury. *Lancet; 359: 417-25.*

- Meirck, HM. 1976 Occurrence of the H reflex and the F wave in the rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 41: 530-533.
- Meldrum B, Garthwaite J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS*, 11: 379-87.
- Merrill JE, Benveniste EN. 1996. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *TINS*, 19: 331-338.
- Merrill JE, Jonakait GM. 1995. Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J*, 9: 611-618.
- Metz GA, Curt A, van de MH, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. 2000. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 17: 1-17.
- Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. 2000. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, 883: 165-177.
- Meunier S, Mogyoros I, Kiernan MC, Burke D. 1996. Effects of femoral nerve stimulation on the electromyogram and reflex excitability of tibialis anterior and soleus. *Muscle Nerve*. Sep; 19 (9): 1110-5.
- Miller RJ. 1995. Regulation of calcium homeostasis in neurons: the role of calcium-binding proteins. *Biochem Soc Trans*, 23: 629-632
- Molt JT, Poulos DA, Bourke RS. 1978. Evaluation of experimental spinal cord injury by measuring spontaneous spinal cord potentials. *Neurosurg*, 48: 985-992.
- Nathan PW. 1994. Effects on movement of surgical incisions into the human spinal cord. *Brain*, 117: 337-346.
- Nyberg-Hansen R. The location and termination of tectospinal fibers in the cat. *Exp. Neurol*. 9: 212-227 (1964).

- Noble, L. J. and Wrathall, J. R. 1985 Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp. Neurol.* 88: 135-149.
- Norenberg MD. 1998. Active and passive roles of astrocytes in neurologic disease: commentary on forum position paper. *Neurotoxicology.* Feb; 19 (1): 23-6; discussion 37-8.
- Novikova VP. 1985. Possibilities and limitations of the H-reflex test in the diagnosis of diseases of the nervous system. *Neurosci Behav Physiol.* 1985 Mar-Apr; 15 (2): 167-72.
- Oepen G, Hillesheimer W. 1981. Qualitative H-reflex testing in huntington's disease. *Arch Psychiatr Nervenkr.;* 230 (3): 221-6.
- Ojcius DM, Zychlinsky A, Zheng LM, Young D. 1991. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp Cell Res,* 197: 43-49.
- Olney JW. 1978. Neurotoxicity of excitatory aminoacids. McGeer EG, Olney JW, McGeer PI (eds). *Kainic acid as a tool in neurobiology.* Raven press, pp 95-121.
- Pardini CM. 1998. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis doctoral, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México.
- Paxinos G. 2004. *The Rat Nervous System.* 3a. Ed. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Pellegrini-Giamperio DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. 1990. Excitatory aminoacid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci,* 10: 1035-1041.
- Pérot, C. Almeida. Silveira. 1994 The human H and T reflex methodologies applied to the rat. *Journal of neuroscience methods.* Vol.51: 71-76.
- Petito CK, Chung M, Halaby IA, Cooper AJ. 1992. Influence of the neuronal environment on the pattern of reactive astrocytosis following cerebral ischemia. *Prog Brain Res,* 94: 381-387.

- Popesko, P. 1992 Anatomy of small laboratory animals. pp: 253.
- Popovich Z, Guan P, Wei I, van Rooijen N, Stokes BT. 1999. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*; 158: 351-365
- Prado R, Dietrich WD, Watson BD, Ginsberg MD, Green BA. 1987. Photochemically induced graded spinal cord infarction. Behavioral, electrophysiological, and morphological correlates. *J Neurosurg*, 67: 745-753.
- Qiao J, Hayes KC, Hsieh JT, Potter PJ, Delaney GA. 1997. Effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma*. Mar; 14 (3): 135-49.
- Raffaele, R; Cosentino, E; Anicito, MB; Sciacca, A; Rampello, L; Pennisi, G; Genazzani, AA. Bosco, G; Casabona, A. and Drago, F. 1992. Effects of TRH-T on spinal motoneurons in man. *Neuroreport*. Nov; 3 (11): 1017-8.
- Raineteau O, Schwab ME. 2001. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injuries. *Nature Rev Neurosci*, 2: 263-273.
- Ramón y Cajal, S. 1928. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York: Hafner.
- Rémy-Néris O, Barbeau H, Daniel O, Boiteau F, Bussel B. 1999. Effects of intrathecal clonidine injection on spinal reflexes and human locomotion in incomplete paraplegic subjects. *Exp Brain Res*. Dec; 129 (3): 433-40.
- Reyes L; Celia. 2003. Efecto de la lesión medular a nivel torácico sobre los reflejos monosináptico y "H" de la rata. (Tesis Maestra en Ciencias Biológicas). México D, F. Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, pp.69.
- Reyes C, Segura B, Reza JA, Pacheco MT, Lomelí J, Guadarrama JC, Guevara R, Jiménez I. 2007. Absence of linear correlation between fluctuations in area of

simultaneous recorded monosynaptic responses and Hoffmann's reflexes in the rat. *Neuroscience Letters*.; 411: 249-253

- Rivlin AS, Tator CH. 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *J Neurosurg*, 10: 38-43.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403: 316-321.
- Rossignol S. 1996. Neural control of stereotypic limb movements. In: Rowell LB, Sheperd JT (eds.) *Handbook of Physiology*. Oxford University Press: New York, , pp 173-216
- *Rudomín, P. 2000. Primary afferent depolarization produced in A delta and C fibres by glutamate spillover?. *New ways to look at old things. J. Physiol.* Oct 1; 528 Pt 1:1.
- Rudomin, P. Jimenez, I. and Enriquez, M. 1991. Effects of stimulation of group Ia afferents from flexor muscles on heterosynaptic facilitation of monosynaptic reflexes produced by Ia and descending inputs: a test for presynaptic inhibition. *Exp. Brain Res.* Vol. 85: 93 -102.
- *Salud Pública México*. 2007. Lesión de medula espinal y medicina regenerativa Vol. 49(6): 437- 444.
- Sandler AN, Tator C. 1976. Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J Neurosurg*; 45: 638-46.
- Sanes, JR. and Lichtman, JW. 1999. Development of vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389- 442.
- Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, Kiuchi K. 2000. Nitric oxide via macrophages iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Mol Brain Res*, 85: 114-122.

- Schanne FA, Kane AB, Young EA, Farber JL. 1979. Calcium dependence in toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 206: 700-702.
- Schmidt, RF. 1983. Motor systems. En: Schmidt, R.F. and Thews, G. (Eds): *Human, Physiology*. Cap. 5, pp. 81-110. Springer-Verlag, Berlín,
- Schucht P, Raineteau O, Schwab ME, Fouad K. 2002. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp Neurol*, 176: 143-153
- Schwab, ME. and Bartholdi D. 1996 Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* Apr, 76 (2): 319-370.
- Selzer ME. 1998. Regeneration and plasticity in neurologic dysfunction. in Lazar R. *Principles of neurology rehabilitation*. Mc Graw Hill Co. USA.
- Sherrington CS. T. 1906. *The integrative action of the nervous system*. New Haven and London: Yale University Press.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. 1998. *Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects*. Sixth edition. New York: Lippincott Raven.
- Siesjo BK, Katsura K, Tibor K. 1996. Acidosis related brain damage. Siesjo BK, Wieloch T (eds). *Advances in Neurology: Cellular and molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Raven press: pp 209-236.
- Siman R, Noszek J. 1988. Excitatory aminoacids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron*, 1: 279-287.
- Simpson Jr RK, Robertson CS, Goodman JC. 1996. The role of glycine in spinal shock. *J Spinal Cord Med*; 19: 215-224
- Skinner RD, Houle JD, Reese NB, Garcia-Rill EE. 1997. Electrophysiological investigations of neurotransplant-mediated recovery after spinal cord injury. *Adv Neurol*;72: 277-90.

- Skinner, RD; Houle, JD; Reese, NB; Berry, CL. and García-Rill, E. 1996. Effects of exercise and fetal spinal cord implants on the H-reflex in chronically spinalized adult rats. *Brain. Res. Aug 5; 729 (1): 127-31.*
- Soos JM, Ashley TA, Morrow J, Patarroyo JC, Szente BE, Zamvil SS. 1999. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol, 11: 1169-1179.*
- Stanley, EF. 1981. Sensory and motor nerve conduction velocities and the latency of the H reflex during growth of the rat. *Exp. Neurology. Vol.71: 497-506.*
- Stichel CC, Müller HW. 1998. Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog Neurobiol. Oct; 56 (2):119-48.*
- Stokes BT. 1992. Experimental spinal cord injury: A dynamic and verifiable injury device. *J Neurotrauma, 9: 129-131.*
- Stover SL, Fine PR. 1986. Spinal cord injuries: the facts and figures. The National Spinal Cord Injury Statistical Centre. University of Alabama at Birmingham.
- Stover SL, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia. 1987; 25: 225-8*
- **Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol, 57: 563-581.*
- Sullivan JA, Gross RH, Grana WA, Garcia-Moral CA. 1980. Evaluation of injuries in youth soccer. *Am J Sports Med. Sep-Oct; 8 (5): 325-7.*
- Surkin J, Colley-Gilbert BJ, Harkey III HL, Sniezek J, Currier M. 2000. Spinal cord injury in Mississippi. Findings and evaluation, 1992-1994. *Spine; 25 (6): 716-21.*
- Suzuki M, Raisman G. 1992 The glial framework of central white matter tracts: segmented rows of contiguous interfascicular oligodendrocytes and solitary astrocytes

give rise to a continuous meshwork of transverse and longitudinal processes in the adult rat fimbria. *Glia*, 6: 222-235.

- Sybert GW. 1990. Thoracolumbar fusion techniques. *Clin Neurosurg.*; 36: 186-216
- Táboríková, and Sax. 1968. Motoneuron pool and the H reflex. *J. Neurol. Neurosurg psychiat.* Vol.31: 354-361.
- Tan L, Gordon KB, Mueller JP, Matis LA, Miller SD. 1998. Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1 dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN γ activated astrocytes. *J Immunol*, 160: 4271-4279.
- Tang, A. and Schroeder, L. 1973. Spinal-cord depressant effects of ketamine and etoxadrol in the cat and the rat. *Anesthesiology* 39: 37-43.
- Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. 1953. Spinal cord compression studies: 1. Experimental techniques to produce acute and gradual compression in dogs. *Arch Neurol Psychial*, 70: 813-819.
- Tator CH, Fehlings MG. 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75: 15-26.
- Thompson, J. Reier, P. Lucas, C. and Parmer, R. 1992. Altered Patterns of Reflex Excitability Subsequent to Contusion Injury of the Rat Spinal Cord. *J. of Neurophysiology*. Vol.68.5: 1473-1486.
- Towe, IA and Luschei, SE. 1981. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 5. Motor coordination. Plenum Press. New York and London.
- Tracey D. 1995. Ascending and descending pathways in the spinal cord. Paxinos G (eds). *The rat nervous system*. Academic press: pp 67-80.
- Trimble MH, Behrman AL, Flynn SM, Thigpen MT, Thompson FJ. 2001. Acute effects of locomotor training on overground walking speed and H-reflex modulation in

individuals with incomplete spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* Summer; 24 (2): 74-80.

- Trimble MH, Koceja DM. 2001. Effect of a reduced base of support in standing and balance training on the soleus H-reflex. *Int J Neurosci.* Jan; 106 (1-2): 1-20.
- Van Beek AL. 1986. Electrodiagnostic evaluation of peripheral nerve injuries. *Hand Clin.* Nov;2 (4): 747-60.PMID: 3793771
- Voigt, M. and Sinkjaer, T. 1998. The reflex in the passive human soleus muscle is modulated faster than predicted from post-activation depression. *Brain Res.* 783: 332-346.
- Watson B, Dietrich D, Busto R, Wachtel S, Ginsberg MD. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17: 497-504.
- Watson BD, Prado R, Dietrich WD, Ginsberg MD, Green BA. 1986. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res*, 367: 296-300.
- Watson y Harvey: 2009. Projections from the brain to the spinal cord. En: Watson, Ch., Paxinos, G. and Kayalioglu, G. (eds.): *The spinal cord.* Cap. 11, pp. 168-179. A Christopher and Dana Reeve Foundation text and Atlas, Academic Press, Amsterdam.
- Werth JL, Thayer SA. 1994. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 14: 348-56.
- Westerga J, Gramsbergen A. 1990. The development of locomotion in the rat. *Dev. Brain Res.*; 57: 163-174
- Wolpaw JR, Tennisen AM. 2001. Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci*, 24: 807-843.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in the induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 269: 4705-4708

- Young W y Koreh I. 1986. Potassium and calcium changes in spinal cord injuries. *Brain Res*, 365: 42-53.
- Zar JH. 1974. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood, USA.
- Zehr EP, Hesketh, KL. y Chua, R. 2001. Differential regulation of cutaneous and H-reflex during leg cycling in humans. *J. Neurophysiol.* Mar; 85 (3): 1178-84.
- Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D. 1998. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol*, 154: 654-662.