

54  
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEMOSTRACION HISTOLOGICA DE LOS AXONES  
COLATERALES QUE CRUZAN LA LINEA MEDIA EN  
LOS CORDONES POSTERIORES. DESPUES DE  
CONTUSION DE LA MEDULA ESPINAL  
DE RATA ADULTA.

**T E S I S**

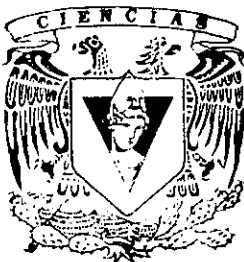
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**ANA LAURA ESPITIA PAREDES**

TUTOR ACADEMICO: DR. GABRIEL GUIZAR-SAHAGUN  
ASESOR: DR. AGUSTIN CHEVEZ ZAMORA  
ASESOR: M. en C. MARIA DEL PILAR TORRES GARCIA  
ASESOR: Biol. JOSE LUIS BORTOLINI ROSALES  
ASESOR: M. en C. PATRICIA RIVAS MANZANO



MEXICO, D. F.



1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

269528



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Demostración histológica de los axones colaterales que cruzan la línea media en los cordones posteriores, después de contusión - de médula espinal de rata adulta.

realizado por Espitia paredes Ana Laura

con número de cuenta 8431694-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Gabriel Guízar-Sahagún

Propietario

Méd. Cir. Agustín Chévez Zamora

Propietario

M. en C. María del Pilar Torres

Suplente

Biol. José Luis Bortolini

Suplente

M. en C. Patricia Rivas

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

DRA. EBNA MARÍA SUAREZ DIAZ

DE BIOLÓGICA

TUTOR ACADEMICO: Dr. GABRIEL GUÍZAR-SAHAGÚN  
Instituto Mexicano del Seguro Social,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades.

ASESOR: Dr. AGUSTÍN CHÉVEZ ZAMORA  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias

ASESOR: M. en C. MARÍA DEL PILAR TORRES GARCÍA  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Laboratorio de Invertebrados. Facultad de Ciencias

ASESOR: Biol. JOSÉ LUIS BORTOLINI ROSALES  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Laboratorio de Invertebrados. Facultad de Ciencias

ASESOR: M. en C. PATRICIA RIVAS MANZANO  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Laboratorio de Biología de la Reproducción  
Facultad de Ciencias

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación del Proyecto Camina, A. C. en el Departamento de Morfología.

Dedico esta tesis

A mis padres José y Ana María para retribuir en algo sus incansables sacrificios, el amor y el apoyo que siempre me han brindado.

A mi mejor brazo derecho por el gran apoyo que recibí en todo momento estuviera donde estuviera.

A mis hermanos: Korina, Erika, Kenia, José Eduardo, Dulce María y Edwin Octavio

A mis familiares, amigos y profesores.

## **AGRADECIMIENTOS.**

-Al Dr. Gabriel Guízar Sahagún porque sin su valiosa ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis, ya que me dedico su tiempo, su dedicación y su asesoría.

-Al Dr. Efrén Israel Grijalva, a la Dra. Hermelinda Salgado y al Dr. Juan Antonio Ibarra porque siempre estuvieron al pendiente de mi desarrollo académico, contribuyendo con sus valiosas enseñanzas y la disposición incondicional para que este trabajo llegara a término.

-A mis asesores académicos: Méd. Agustín Chévez, M. en C. Ma. del Pilar Torres, Biol. José Luis Bortolini y M. en C. Patricia Rivas; por haberme regalado su tiempo, por sus comentarios y críticas que enriquecieron esta tesis.

-A los Sres. Salvador y Raquel Harari por que gracias a su esfuerzo, dedicación y trabajo arduo han hecho posible que Proyecto Camina sea un Centro de Investigación dedicado a la formación académica-científica de jóvenes que al igual que yo luchamos porque algún día Camina logre su objetivo. Gracias una vez más por que sin apoyo esto no sería posible.

-A la Sra. Enna Boijseauneau, a la Srita. Laura Baldwin, al Sr. Fidel López, al Sr. Guillermo González y familia así como a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para la culminación de este trabajo.

Siempre se pasa por el fracaso

en el camino al éxito.

Mickey Rooney

El éxito es ese gran trío:

habilidad, oportunidad y valentía.

Charles Luckman

No hay secretos en el éxito  
es el resultado de preparación,  
trabajo arduo y enseñanza del  
fracaso.

L. Powecl

## INDICE GENERAL

Indice general	1
Indice de figuras y tabla	3
Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	8
Modelos experimentales de lesión medular	10
Lesión tipo contusión-compresión	10
Lesión tipo corte limpio con bisturí	11
Lesión tipo laceración	12
Antecedentes	14
Microambiente favorable para la plasticidad después de una LTME	19
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivo específico	23
Material y métodos	24
Material biológico	24
Método de anestesia	24



Método para contundir la ME	24
Cuidados postoperatorios	25
Sacrificio y estudio histológico	25
Resultados	28
Morfología de la ME normal con la técnica de impregnación argéntica	28
Resultados de la evaluación morfológica general de la zona de lesión	28
Características de los axones neoformados:	29
a) Ubicación de los axones neoformados	29
b) Relación de axones neoformados con tejidos adyacentes	30
c) Expresión temporal de los axones neoformados	30
Discusión	43
Significado de los resultados	46
Conclusiones	47
Consideraciones finales	47
Referencias bibliográficas	48

## INDICE DE FIGURAS Y TABLA

Tabla I. Ventajas, limitaciones y contribuciones conceptuales de los diferentes modelos de LTME	13
Fig. 1. Panorámica de un corte transversal de ME sin lesión y detalles del cordón dorsal.	32
Fig. 2. Detalles del cordón ventral y del istmo de la sustancia gris en ME sin lesión.	33
Fig. 3. Corte transversal de ME a nivel del epicentro de la lesión a 2 meses de evolución después del trauma.	34
Fig. 4. Ejemplos de destrucción walleriana en el cordón posterior	34
Fig. 5. Microfotografías en diferentes aumentos de un espécimen de 2 días después de la lesión	35
Fig. 6. Panorámica y detalles de un espécimen de 4 días después de la lesión	36
Fig. 7. Panorámica y detalles de un espécimen de 6 días después de la lesión	37
Fig. 8. Panorámica y detalles de un espécimen de 8 días después de la lesión	38
Fig. 9. Panorámica y detalles de un espécimen de 10 días después de la lesión	39

Fig. 10. Microfotografía de un espécimen de 14 días después de la lesión	40
Fig. 11. Panorámica y detalles de un espécimen de 30 días después de la lesión	41
Fig. 12. Microfotografía de un espécimen de 2 meses de evolución poslesión	42

## **ABREVIATURAS**

**LTME:** lesión traumática de médula espinal

**ME:** médula espinal

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP:** sistema nervioso periférico

**aFGF:** factor de crecimiento fibroblástico ácido

**bFGF:** factor de crecimiento fibroblástico básico

**trkA:** receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso tipo A

**trkB:** receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso tipo B

**NGF:** factor de crecimiento nervioso

**GAP-43:** Proteína asociada al crecimiento de 43 kDa

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar un fenómeno de plasticidad, no conocido previamente, que se presenta después de una LTME. La mayor parte de evidencias sobre la plasticidad de la ME adulta se ha obtenido en estudios donde se cortan las raíces posteriores de manera alterna, antes de entrar a la ME, asimismo se han empleado hemisecciones de médula o de grupos de axones selectivos, pero el modelo de contusión medular no se ha usado para estudios de plasticidad.

Se sometió a un grupo de 22 ratas adultas a contusión severa de la porción torácica baja de la ME con el método de caída de peso. Se analizó la médula de 2 ratas sacrificadas en los días 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 30, 60 y 90 días poslesión. Para el estudio histológico se tomó de cada rata un segmento de 2 cm de ME con la zona de lesión en el centro, se hicieron cortes transversales secuenciales de 10  $\mu\text{m}$  a intervalos definidos de 750  $\mu\text{m}$ , los cuales se impregnaron con el método de nitrato de plata de Sevier-Munger. Se definió como epicentro de la lesión al sitio con mayor destrucción de tejido nervioso.

Se identificaron axones colaterales de reciente formación tanto en la vía piramidal como en los cordones posteriores ascendentes a  $4.5 \pm 1.5$  mm por abajo del epicentro. Estos nuevos axones colaterales emergen perpendicularmente desde los axones preservados que se localizan en la interfase entre el tejido medular preservado y el degenerado. Este fenómeno peculiar de plasticidad se observó desde el primer día hasta el 30 después de la lesión, no así a los 60 y 90 días.

Las observaciones preliminares sugieren que el fenómeno de plasticidad descrito puede ser transitorio, que podría iniciar como respuesta compensatoria a una denervación parcial de

neuronas blanco en estadios tempranos después de la lesión medular, por la influencia de factores neurotróficos. Para explicar su ausencia en los estadios tardíos (2 y 3 meses poslesión), proponemos que puede ser el resultado de la acción de inhibidores del crecimiento axonal. Es posible también que estos axones colaterales formen circuitos neuronales anormales en la ME, que contribuyan, en parte, a los reflejos cruzados anormales que se presentan en humanos después de recuperado el choque medular. En tal caso estas observaciones deben tomarse en cuenta en la planeación de estudios de reconstrucción de ME con lesión crónica.

## INTRODUCCION

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) tanto en los seres humanos como en otros vertebrados se acompaña de un alto índice de morbi-mortalidad, suele dejar graves secuelas neurológicas, permanentes y devastadoras (Bedbrook, 1987; Frankel, 1987; Stover and Fine, 1987). Hasta el momento no se cuenta con algún tratamiento para revertir dichas secuelas.

De acuerdo a la intensidad del trauma, las lesiones medulares ocasionan alteraciones estructurales y funcionales que oscilan desde el bloqueo transitorio de la conducción, hasta la sección medular completa. Según el nivel medular afectado puede generar parálisis en ambas piernas (paraplejía) o en ambas piernas y en ambos brazos (tetraplejía). Al considerar todas las formas de tratamiento existentes hasta el momento y todos los niveles de lesión medular, menos del 2% de los pacientes con lesión aguda clínicamente completa llegan a caminar nuevamente (Hansebout, 1982).

Las lesiones traumáticas de la médula espinal implican un gasto económico muy elevado, incluyendo el ocasionado por el tratamiento inicial y el manejo para reintegrar socialmente a los pacientes. En nuestro medio es una causa de incapacidad permanente, que implica además, a nivel de las instituciones de seguridad social, una erogación agregada, secundaria a las pensiones. Desde la antigüedad y hasta mediados de los años cuarenta, la mayoría de los pacientes con (LTME) morían durante las primeras horas como resultado del trauma inicial, o en las siguientes semanas, a consecuencia de infecciones y otras complicaciones (Hsu *et al.* 1986). Después de la segunda guerra mundial, gracias a los múltiples avances en cuidados intensivos, farmacología, cirugía, rehabilitación, etc., se mejoró notablemente la posibilidad de sobrevivir. Sin embargo la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de

atención especializados en este tipo de lesión (Bedbrook, 1987; Stover and Fine, 1987). La LTME no sólo se asocia con parálisis, también involucra alteraciones de varias funciones somáticas y autonómicas que pueden ocasionar la muerte en los primeros días o semanas subsecuentes a la lesión (Das, 1989).



## MODELOS EXPERIMENTALES DE LESION MEDULAR

Para entender mejor la naturaleza y los aspectos fisiopatológicos que intervienen en la evolución del trauma medular, así como para evaluar diversos tipos de tratamiento, se han desarrollado diferentes modelos experimentales de lesión, los cuales ofrecen la oportunidad de obtener lesiones medulares de intensidad y características con un rango de variabilidad relativamente constante, en condiciones controladas. A pesar de que todos los modelos experimentales tienen los componentes de una lesión, en cada uno predomina un aspecto en especial.

Existen tres modelos generales para inducir trauma medular: a) lesión tipo contusión-compresión, b) corte limpio con bisturí y c) lesión tipo laceración. Estos modelos permiten el estudio de los aspectos fisiopatológicos que intervienen en la evolución del trauma, así mismo permiten evaluar diversos tipos de tratamiento; cada método tiene muchas variantes y en la literatura existen abundantes reportes en cuanto a técnica, objetivos, ventajas y desventajas, histopatología, contribuciones conceptuales, consideraciones clínicas, etc.(Das, 1986; Das *et al.* 1989). Los aspectos fundamentales de cada uno de los tipos de lesión experimental de médula espinal (ME) (síntesis basada en el artículo de Das, 1989) se mencionan en la tabla I.

### Lesión tipo "contusión-compresión".

Se considera actualmente como el modelo que más se ha utilizado en estudios experimentales, ya que reproduce con mayor fidelidad los fenómenos que ocurren en la mayoría de los casos de lesión medular traumática en seres humanos (Panjabi, 1987). Esta técnica fue desarrollada por Allen en 1911, con el objeto de inducir un trauma medular de manera cuantitativa, sin afectar los

axones en la sustancia blanca o las neuronas en la sustancia gris. La manera de producir este tipo de lesión consiste en anestesiar al animal de experimentación, para exponer quirúrgicamente el nivel medular deseado, a través de una laminectomía conservando las meninges íntegras. Posteriormente, se coloca en un aparato esterotáxico y por medio de un tubo guía se deja caer sobre la ME un cilindro de peso conocido desde una altura predeterminada, con lo cual se produce una lesión bilateral. Existe una relación directa entre la fuerza del impacto y la intensidad del trauma.

Lesión tipo "corte limpio con bisturí".

Este modelo permite lesionar selectivamente ambos lados de la ME o sólo uno, al realizar cortes bilaterales o parciales. Se ha utilizado principalmente con el objeto de investigar aspectos relacionados con la regeneración axonal y con la cicatriz fibrogliosa, más que la relación entre el grado de lesión y paraplejía, pues se ha demostrado que sólo la sección bilateral completa produce paraplejía. En este modelo la lesión primaria es más importante y determinante en la evolución que la secundaria. Para producir esta lesión se expone la ME mediante técnica quirúrgica a través de una laminectomía en el nivel deseado, y bajo visión microscópica quirúrgica se cortan longitudinalmente las meninges y se secciona la ME en el plano transversal; de acuerdo a la profundidad de este último corte, se puede producir sección de vías o fascículos de manera selectiva, hemisección (unilateral) o sección completa (bilateral).

### Lesión tipo "laceración".

Este modelo combina las características de la contusión-compresión y el corte con bisturí; reproducen las características observadas después de una fractura vertebral con penetración de fragmentos óseos dentro del tejido medular, lo cual produce una lesión de laceración múltiple. La lesión puede extenderse uno o dos segmentos más en la ME.

Con el animal bajo anestesia, se realiza la laminectomía en la zona deseada, se inciden las meninges longitudinalmente y con el bisturí o con tijeras de microcirugía se corta la médula en dos puntos y se extrae el tejido medular dejando una cavidad que puede ser de tamaño variable. El objeto es producir una lesión con ablación del tejido neural en la región. Es útil para estudiar varios aspectos del trauma tales como lesión primaria directa e indirecta, lesión secundaria y la degeneración progresiva, así como la interacción progresiva que resulta de la degeneración gradual de los axones preservados. Es el modelo que más se ha empleado para la investigación con trasplante de la ME, ya que la cavidad creada da cabida y retención a los tejidos trasplantados.

TABLA I. Ventajas, limitaciones y contribuciones conceptuales de los diferentes modelos de lesión traumática de la médula espinal.

	Contusión-Compresión	Corte limpio con bisturí	Laceración
V E N T A J A S	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se puede cuantificar el umbral (fuerza necesaria para producir paraplejía de manera permanente).</li> <li>- Al preservar la integridad de las meninges se evita la penetración de tejido conectivo laxo y de líquido intersticial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La extensión de la lesión puede visualizarse durante la cirugía.</li> <li>- La hemorragia puede ser detectada y controlada.</li> <li>- El modelo proporciona una preparación bien controlada para estudios de regeneración axonal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se puede obtener paraplejía permanente después de lesiones parciales.</li> <li>- Por la extensión del daño, permite clasificar a las lesiones en umbral, subumbral y supraumbral.</li> <li>- Puede ser usado para analizar la naturaleza de las condiciones patológicas secundarias.</li> </ul>
L I M I T A C I O N E S	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hay una considerable variabilidad entre la cantidad de sustancia gris y sustancia blanca destruida, así como una frecuente lateralización (derecha-izquierda) del impacto.</li> <li>- Al momento del impacto es difícil predecir cuales son los axones que van a degenerarse finalmente y cuales los que se preservaran.</li> <li>- Los axones preservados pueden ser considerados erróneamente como axones regenerados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es una lesión abierta que permite la penetración de tejido conectivo laxo y de líquido tisular.</li> <li>- El uso de electrocoagulación para controlar la hemorragia agrega variables independientes al experimento.</li> <li>- Durante las maniobras de sección algunos axones pueden ser desplazados y permanecer íntegros, los cuales pueden ser identificados erróneamente como axones regenerados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es una lesión abierta, con las implicaciones ya descritas para la técnica previa.</li> <li>- Se produce abundante hemorragia.</li> <li>- Los animales con una lesión parcial extensa o total muestran paraplejía permanente y sobre todo una sobrevida muy corta.</li> </ul>
C O N T R I B U C I O N E S  C O N C E P T U A L E S	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La importancia de la lesión secundaria (autodestructiva).</li> <li>- La progresión o la regresión en función del tiempo y de la intensidad del trauma (umbral y subumbral).</li> <li>- Alteraciones diferentes de la sustancia gris y blanca, que permite identificar el impacto funcional de cada una.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La causa de la paraplejía es el corte de los axones de los tractos largos, más que el corte de todos los axones en todos los tractos.</li> <li>- Distinción entre paraplejía transitoria y permanente.</li> <li>- Evidencia del crecimiento de colaterales axónicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Explica en términos histopatológicos el desarrollo de la paraplejía.</li> <li>- La sección completa del sistema axonal de tractos largos es la base de la paraplejía permanente.</li> <li>- La paraplejía transitoria tiene importancia, ya que cualquier medida terapéutica debe instaurarse antes de que los cambios secundarios y degenerativos la conviertan en permanente.</li> <li>- No necesariamente deben preservarse la mayoría de los axones para una recuperación motora útil, es suficiente con preservar algunos de la vía reticuloespinal y vestibuloespinal (Nathan and Smith, 1973).</li> <li>- El modelo de laceración total tiene efectos devastadores, se acompaña de alta morbi-mortalidad.</li> </ul>

## ANTECEDENTES

Es bien sabido que en los mamíferos adultos las neuronas no tienen la potencialidad de dividirse (Ramón y Cajal, 1928; Rakic, 1985), y que los axones centrales lesionados no se regeneran de manera apropiada y espontánea para permitir el restablecimiento funcional (Bernstein and Bernstein, 1971; Kalil, 1975; Bernstein and Stelzner, 1983; Guth *et al.* 1986; Faden, 1988; Smith *et al.* 1988).

Los fundamentos iniciales para el conocimiento del que disponemos en la actualidad sobre la regeneración del sistema nervioso central (SNC) fueron publicados por Santiago Ramón y Cajal, quien demostró que después de seccionar la ME de mamíferos inferiores, algunos axones se empezaban a regenerar, sin embargo dicho proceso se detenía después de las primeras dos semanas de la lesión, siendo incapaces de retornar a sus blancos denervados; a este fenómeno lo denominó "regeneración abortiva" (Ramón y Cajal, 1928).

El aborto de la regeneración de los axones medulares es un problema multifactorial: la cicatriz fibrogliar (Windle, 1956; Windle *et al.* 1956; Reier *et al.* 1986; Liuzzi, 1990) y las cavidades que se forman en el sitio de la lesión tienen un efecto de barrera física para el crecimiento axonal (Kao and Chang, 1977; Guízar-Sahagún *et al.* 1994); dicho crecimiento también se detiene debido al establecimiento de sinapsis inapropiadas entre los brotes de crecimiento que emergen de los axones lesionados y neuronas denervadas muy próximas a los mismos (Bernstein and Bernstein, 1971), el cono de crecimiento axonal es inhibido por contacto con pequeñas proteínas de membrana con masa molecular definida de 35 kDa (NI-35) y 250 kDa (NI-250), presentes en la membrana de los oligodendrocitos maduros y en su producto la mielina central (Chiquet, 1989; Schwab, 1990a; Schwab, 1990b) o por una fracción de proteoglicanos presentes en la membrana

de la microglia activada (Bovolenta *et al.* 1992).

Durante la última década, con la utilización de diferentes estrategias, se ha logrado favorecer el recrecimiento a gran distancia de axones medulares seccionados. Savio y colaboradores (1990) han conseguido regeneración exitosa de los axones de la vía corticoespinal de rata. Ratas de dos semanas de edad sometidas a una sección medular a nivel torácico, tratadas al nacer con rayos X para destruir los oligodendrocitos y evitar que se forme la mielina, mostraron recrecimiento de los axones corticoespinales 4.5 - 6 mm., por debajo del sitio de lesión (el máximo fue de 18.7 mm).

En otra investigación reciente, se seccionó de igual manera la porción dorsal de la ME incluyendo la vía piramidal en su totalidad, en donde a ratas jóvenes y adultas, se les aplicó un anticuerpo (IN-1), el cual neutraliza las proteínas asociadas a la mielina que inhiben el crecimiento axonal; encontrando una semana después recrecimiento de los axones corticoespinales de 2.5 a 3.5 mm, por debajo de la lesión. En el mismo estudio se demostró que la neurotrofina-3 promueve un intenso crecimiento colateral de las fibras corticoespinales seccionadas, aunque no se observó recrecimiento a partir de la punta seccionada (Schnell *et al.* 1994).

Si en un estado temprano de desarrollo se lesiona el sitio por donde deben crecer las fibras corticoespinales, éstas no pueden crecer a través del sitio de lesión y forman una vía aberrante rodeando al tejido dañado; aparentemente hacen sinapsis con sus blancos apropiados en sentido caudal a la lesión (Bernstein and Stelzner, 1983; Bregman and Kunkel-Bagden, 1989). La capacidad para reorientar el crecimiento de las fibras corticoespinales en desarrollo está restringida a los 5-6 días posnatal en ratas (Bernstein and Stelzner, 1983). Es posible que este fenómeno esté relacionado con cambios en el microambiente en torno a la vía piramidal en

desarrollo, por ejemplo la formación de mielina en el sistema de vías ascendentes largas vecinas a la vía piramidal pueden suprimir la capacidad de recrecimiento de los axones corticoespinales. El periodo crítico de 5 a 6 días posnatal que permite el recrecimiento de la vía piramidal de manera espontánea, puede ser extendido hasta 30 días posnatal en presencia de un trasplante de ME fetal (Bregman *et al.* 1993).

Uno de los resultados recientes más extraordinarios fue reportado por Iwashita y colaboradores en 1994, quienes en ratas neonatales, resecaron un segmento completo de ME torácica y lo reemplazaron con médula ME de la misma región, manteniendo en el implante la orientación rostro-caudal al segmento medular extirpado; demostraron regeneración axonal de vías ascendentes y descendentes, entre las que se incluyen: corticoespinal, rubroespinal, reticuloespinal, rafeespinal, espinocerebelar y espinotalámica.

Un proceso diferente a la regeneración axonal (recrecimiento y conectividad apropiada de los axones lesionados), es el crecimiento de axones colaterales que emergen de axones intactos, generalmente para ocupar los sitios que los axones lesionados dejan denervados. A este último proceso se le conoce como **plasticidad anatómica** y se le ha atribuido la mejoría funcional parcial que suele observarse después de lesiones medulares incompletas (Murray and Goldberger, 1974; Goldberger and Murray, 1982; Kuang and Kalil, 1990; Helgren and Goldberger, 1993).

En 1953, Edds describió el fenómeno de crecimiento nervioso colateral a nivel de sistema nervioso periférico (SNP). Este investigador seccionó parcialmente las fibras que innervaban un músculo esquelético y observó que de las fibras intactas crecían prolongaciones preterminales en dirección al músculo denervado. Dichas prolongaciones permitían la restauración parcial del peso y la fuerza del músculo previamente denervado, con este experimento se demostraba un principio fundamental de la neurobiología: **la neuroplasticidad**

En 1941, Weddell y colaboradores, demostraron un fenómeno semejante en nervios sensitivos: después de seccionar un nervio cutáneo en el conejo, el área de anestesia se reducía con el paso del tiempo; la mejoría funcional se debía al crecimiento de nuevas fibras nerviosas procedentes de los nervios intactos de la piel circundante. De manera similar se demostró en los ganglios simpáticos del gato, crecimiento y recuperación funcional dependiente de las colaterales neoformadas desde las fibras nerviosas residuales del nervio preganglionar (Murray and Thompson, 1957; Guth and Bernstein, 1961; Williams *et al.* 1973; Langley, 1987).

Es importante establecer las diferencias entre el crecimiento colateral axónico y la regeneración de un axón terminal, ya que el primero resulta del crecimiento de un axón intacto, mientras que el segundo resulta del crecimiento de un axón lesionado.

El crecimiento colateral axónico parecía ser una propiedad inherente al sistema nervioso periférico (SNP), hasta que, Liu y Chambers en 1958 demostraron que la plasticidad anatómica no era un fenómeno exclusivo del SNP, al observar dicho fenómeno en lesiones experimentales de ME. Ellos seccionaron varias raíces dorsales o la vía corticoespinal de manera unilateral; varios meses después seccionaron las raíces restantes del mismo lado, al igual que sus equivalentes contralaterales; dos semanas después empleando tinciones para identificar fibras degeneradas, observaron que el lado denervado se teñía más intensa y extensamente que el lado control, lo cual interpretaron como reiteración colateral del lado denervado crónicamente (Liu and Chambers, 1958). Con este estudio se modificó el concepto que se tenía sobre la organización del SNC.

En 1982 estos hallazgos fueron verificados por Goldberger y Murray. La interpretación de Liu y Chambers (1958) podían dejar duda por haber empleado un método indirecto; sin embargo,



Raisman confirmó el crecimiento colateral en el SNC empleando microscopía electrónica cuantitativa en sus estudios de plasticidad en el núcleo septal del conejo (Raisman, 1969).

En las últimas décadas, la neuroplasticidad ha sido objeto de múltiples estudios. En la actualidad el término "**neuroplasticidad**" se usa para describir los principios asociados tanto con la reorganización neuronal que se presenta después del daño al sistema nervioso, como con la nueva organización neuronal creada por un factor inductor del ambiente externo. La primera se conoce como **plasticidad anatómica o estructural**, se relaciona con fenómenos de degeneración y se enfoca a los mecanismos que inducen, guían y sostienen los cambios; la segunda, se conoce como **plasticidad sináptica**, se relaciona con el aprendizaje y la memoria; se enfoca más a los estímulos que inician los cambios, así como a los efectos fisiológicos y funcionales de éstos (Kerr, 1975; Brailowsky *et al.* 1992; Gage and Cotman, 1992).

Aun falta mucho para determinar con precisión el efecto funcional de la plasticidad anatómica o estructural. En algunos casos, como en lesiones parciales de la vía piramidal, se ha demostrado que la plasticidad anatómica explica un cierto grado de recuperación funcional (Murray and Thompson, 1957; Kuang and Kalil, 1990); en otros casos como sucede con la enfermedad de Alzheimer, el crecimiento colateral axónico en torno a las placas cerebrales de amiloide, la plasticidad parece tener efectos dañinos en algunas funciones cerebrales (Cotman *et al.* 1991).

La inducción, el soporte del crecimiento y la conectividad neuronal han sido motivo de múltiples estudios. Desde principios del siglo se propuso la "Hipótesis neurotrófica", que suponía la existencia de sustancias producidas por las estructuras blanco que atraían las fibras nerviosas (Sperry and Hibbard, 1968; Guth, 1975; Hitoh and Tessler, 1990;). En 1948 Weiss y Hiscoe demostraron que la orientación del crecimiento axonal después de una lesión de nervio periférico, estaba dada por las bandas de Bungner constituidas por células de Schwann.

Durante las siguientes dos décadas (1951, 1968) Levi-Montalcini y colaboradores aislaron y purificaron el primer factor neurotrófico, fue una proteína encontrada en las glándulas salivales del ratón y en el veneno de algunas serpientes, al que llamaron "factor de crecimiento nervioso". Desde entonces, se han hecho grandes progresos en la identificación, aislamiento y purificación de moléculas solubles con efecto neurotrófico. Estas moléculas son particularmente abundantes durante el desarrollo, en tejidos denervados (Rohrer, 1990; Saffran and Crutcher, 1990).

No sólo los factores neurotróficos solubles participan en los fenómenos de crecimiento y conectividad neuronal, también juegan un papel importante las moléculas de adherencia neural presentes en el cono de crecimiento (Lander, 1989 ; Linnemann and Bock, 1989; Letourneau *et al.* 1990; Norris and Kalil, 1990; Walter *et al.* 1990), así como la matriz extracelular (Sperry and Hibbard, 1968; Althaus and Seifert, 1987; Wujek *et al.* 1990; Sivron *et al.* 1990; Liesi, 1990; Burmeister *et al.* 1991).

#### MICROAMBIENTE FAVORABLE PARA LA PLASTICIDAD DESPUÉS DE UNA LTME

Después de una LTME, en el área de lesión, desde las primeras horas posteriores al trauma, se crea un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad anatómica. Se ha reportado incremento en la producción de diferentes factores neurotróficos y de sus receptores, así como incremento en la producción de proteínas asociadas al crecimiento, particularmente de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43).

Durante las siguientes dos décadas (1951, 1968) Levi-Montalcini y colaboradores aislaron y purificaron el primer factor neurotrófico, fue una proteína encontrada en las glándulas salivales del ratón y en el veneno de algunas serpientes, al que llamaron "factor de crecimiento nervioso". Desde entonces, se han hecho grandes progresos en la identificación, aislamiento y purificación de moléculas solubles con efecto neurotrófico. Estas moléculas son particularmente abundantes durante el desarrollo, en tejidos denervados (Rohrer, 1990; Saffran and Crutcher, 1990).

No sólo los factores neurotróficos solubles participan en los fenómenos de crecimiento y conectividad neuronal, también juegan un papel importante las moléculas de adherencia neural presentes en el cono de crecimiento (Lander, 1989 ; Linnemann and Bock, 1989; Letourneau *et al.* 1990; Norris and Kalil, 1990; Walter *et al.* 1990), así como la matriz extracelular (Sperry and Hibbard, 1968; Althaus and Seifert, 1987; Wujek *et al.* 1990; Sivron *et al.* 1990; Liesi, 1990; Burmeister *et al.* 1991).

#### MICROAMBIENTE FAVORABLE PARA LA PLASTICIDAD DESPUÉS DE UNA LTME

Después de una LTME, en el área de lesión, desde las primeras horas posteriores al trauma, se crea un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad anatómica. Se ha reportado incremento en la producción de diferentes factores neurotróficos y de sus receptores, así como incremento en la producción de proteínas asociadas al crecimiento, particularmente de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43).

A continuación se mencionan los resultados de algunos trabajos al respecto, en modelos de LTME:

A 2 días poslesión se incrementa la expresión de factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) en motoneuronas y neuronas de sustancia gris intermedia cercana al sitio de lesión, este incremento se mantiene a 5 y 12 días poslesión. El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) no se modifica a los 2 días, pero a los 5 días se incrementa en el citoplasma y núcleo de los astrocitos reactivos que limitan la zona de lesión, así como en los cordones posteriores (Koshinaga *et al.* 1983).

Follesa y colaboradores encontraron un incremento importante del RNAm del bFGF en la zona de lesión desde 6 horas poslesión manteniéndose elevado a 1 y 7 días, localizado sólo en la porción rostral de la ME; no encontraron cambios en el RNAm del aFGF, ni en el del receptor para el factor de crecimiento nervioso tipo A (trkA) a 6 horas, 1 y 7 días poslesión (Follesa *et al.* 1994).

En un estudio a 10 días y 6 semanas poslesión se encontró una fuerte elevación del receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso tipo B (trkB) y de su RNAm en el tejido cicatrizal que delimita la zona de lesión. Otros factores como el neurotrófico derivado del cerebro, las neurotrofinas 3 y 4, trkA y trkC, solo mostraron un incremento pequeño (Frisen *et al.* 1992).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) se incrementa a nivel de la zona de lesión, alcanza su máximo a los 7 días y disminuye a 2 y 45 semanas (Bakhit *et al.* 1991). El RNAm del receptor de baja afinidad del NGF manifestó su máxima expresión a 7 días poslesión; se encontró asociado con células de vasos sanguíneos neoformados a nivel del epicentro (Reynolds *et al.* 1991).

Después de la lesión del cordón anterior, desde 2 días hasta 8 semanas que duró el estudio, se demostró expresión del receptor de NGF en motoneuronas afectadas y tejido cicatrizal, principalmente en las células perivasculares que no son pericitos (Risling *et al.* 1992).

La presencia de niveles altos de GAP-43 se ha correlacionado con periodos de crecimiento axonal durante el desarrollo, así como en la regeneración y plasticidad anatómica; se piensa que es la molécula clave en la regulación del crecimiento axonal (Skene, 1989; Strittmatter *et al.* 1990; 1992). En diferentes modelos de LTME se ha reportado elevación significativa de los niveles de GAP-43 o de su RNAm, desde un día hasta 4 semanas poslesión, en diferentes poblaciones neuronales, incluyendo neuronas del núcleo rojo (Theriault *et al.* 1992), cuerpos neuronales y axones localizados en torno a la zona de lesión (Curtis *et al.* 1993; Alonso *et al.* 1995), motoneuronas axotomizadas de la ME (Linda *et al.* 1992) y en fibras catecolaminérgicas y serotoninérgicas (Alonso *et al.* 1995).

Resulta de particular interés un estudio reciente de hemisección medular en ratas (Nacimiento *et al.* 1995a), en el que se reporta la expresión de GAP-43 de manera diferencial tanto en la región blanco de las fibras descendentes supraespinales así como en el sistema ascendente, lo que sugiere que el crecimiento y reinervación por parte del sistema no lesionado puede ser un fenómeno específico regional más que una respuesta generalizada a una denervación parcial en el SNC.

## **JUSTIFICACION**

Poco se conoce acerca de la plasticidad anatómica que se presenta de manera espontánea después de una lesión traumática de la ME. Sin embargo, en diferentes estudios se ha reportado la presencia de diversas sustancias que en conjunto forman un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad como consecuencia de dicha lesión.

En el Centro de Investigación del Proyecto Camina, A. C., contamos con modelos experimentales que reproducen fielmente los eventos fisiopatológicos de la lesión medular traumática en humanos, así como con técnicas histológicas que nos permiten identificar claramente a los axones, por lo que optamos por estudiar los fenómenos de plasticidad anatómica en diferentes segmentos y a diferentes tiempos, en médulas espinales lesionadas experimentalmente.

## **HIPOTESIS**

Si se produce una lesión traumática experimental de la ME en rata, entonces se presentará un proceso de crecimiento axonal que puede ser caracterizado en tiempo y localización, desde el punto de vista morfológico.

## **JUSTIFICACION**

Poco se conoce acerca de la plasticidad anatómica que se presenta de manera espontánea después de una lesión traumática de la ME. Sin embargo, en diferentes estudios se ha reportado la presencia de diversas sustancias que en conjunto forman un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad como consecuencia de dicha lesión.

En el Centro de Investigación del Proyecto Camina, A. C., contamos con modelos experimentales que reproducen fielmente los eventos fisiopatológicos de la lesión medular traumática en humanos, así como con técnicas histológicas que nos permiten identificar claramente a los axones, por lo que optamos por estudiar los fenómenos de plasticidad anatómica en diferentes segmentos y a diferentes tiempos, en médulas espinales lesionadas experimentalmente.

## **HIPOTESIS**

Si se produce una lesión traumática experimental de la ME en rata, entonces se presentará un proceso de crecimiento axonal que puede ser caracterizado en tiempo y localización, desde el punto de vista morfológico.

## **JUSTIFICACION**

Poco se conoce acerca de la plasticidad anatómica que se presenta de manera espontánea después de una lesión traumática de la ME. Sin embargo, en diferentes estudios se ha reportado la presencia de diversas sustancias que en conjunto forman un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad como consecuencia de dicha lesión.

En el Centro de Investigación del Proyecto Camina, A. C., contamos con modelos experimentales que reproducen fielmente los eventos fisiopatológicos de la lesión medular traumática en humanos, así como con técnicas histológicas que nos permiten identificar claramente a los axones, por lo que optamos por estudiar los fenómenos de plasticidad anatómica en diferentes segmentos y a diferentes tiempos, en médulas espinales lesionadas experimentalmente.

## **HIPOTESIS**

Si se produce una lesión traumática experimental de la ME en rata, entonces se presentará un proceso de crecimiento axonal que puede ser caracterizado en tiempo y localización, desde el punto de vista morfológico.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Caracterizar, desde el punto de vista morfológico, la plasticidad axonal que se presenta después de una lesión traumática experimental severa de la ME.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el tiempo en el que se forman las colaterales axónicas después de una lesión traumática experimental severa de la ME.

- Determinar la localización de las colaterales axónicas después de una lesión traumática experimental severa de la ME.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico:

Se utilizaron 24 ratas Long-Evans hembras, adultas, de 12 a 14 semanas, con peso corporal entre 190 y 250 g, sanas, nunca embarazadas y sin algún procedimiento experimental previo. Veintidós ratas se sometieron a contusión severa de la ME con el método de caída de peso. Se analizaron las médulas de dos ratas sacrificadas en cada uno de los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 30, 60, y 90 días después de la lesión. Dos animales sin lesión fueron usados como testigos. El estudio se realizó en el Centro de Investigación del Proyecto Camina.

### Método de anestesia.

Durante los procedimientos de lesión medular y sacrificio, se aplicó una dosis intramuscular de una mezcla de clorhidrato de ketamina (77.5 mg/kg de peso corporal) e hidrocloreuro de xilacina (12.5 mg/kg.).

### Método para contundir la ME.

Bajo el efecto de la anestesia se realizó tricotomía de la región torácica baja. Mediante técnica estéril, se practicó una incisión sagital en piel, seguida de disección de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas y desperiostización de láminas usando hoja de bisturí del número 20; después se extirparon dos apófisis espinosas (T-8 y T-9) con una gubia tipo Beyer para visualizar los procesos laminares de T-9. Para finalizar se realizó una laminectomía de un solo nivel (T-9), extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía, el animal se colocó en un equipo de estereotaxia para la realización de la contusión medular con una modificación de la técnica de

Allen (Allen, 1911): se dejó caer sobre la ME un cilindro de acero inoxidable (peso de 15 gr, punta roma de 1.7 mm de diámetro y 1 cm de largo) a una altura de 4 cm a través de un tubo guía. Intensidad de la lesión = 45 g/cm. La herida quirúrgica se suturó en dos planos: la fascia muscular y la piel con puntos simples de nylon 5-0.

#### Cuidados postoperatorios.

Después de la cirugía, las ratas recibieron penicilina benzatínica en dosis intramuscular única de 200 000 UI, luego fueron colocadas en una unidad de cuidados intensivos para animales menores (Schroer Manufacturing Co., Kansas City) hasta que se recuperaron de la anestesia.

Los animales fueron alimentados *ad-libitum* y colocados en jaulas individuales con aserrín estéril. El intestino y la vejiga fueron evacuados mediante expresión manual externa hasta que recuperaron el automatismo. A los animales con heridas por autofagia o por escaras de presión se les hizo aseo diario del área cruenta e inmediatamente después se les aplicó localmente furoxona (Topazone). No se administró ningún otro medicamento para manejo de las complicaciones que se presentaron.

#### Sacrificio y estudio histológico.

Para el estudio histológico, los animales fueron sacrificados por perfusión intraórtica al día correspondiente después de la lesión. Antes de la perfusión, los animales se anestesiaron con la misma mezcla anestésica empleada en la cirugía previa e inmediatamente después se aplicó una dosis intraperitoneal de 1000 UI de heparina. Se practicó una toracotomía amplia, se cortó la aurícula derecha del corazón para facilitar el drenaje de retorno e inmediatamente después se canuló la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo y empleando una bomba peristáltica (Masterflex; Cole-Parmer Inst. Chicago II) se perfundieron 100 ml de solución salina fisiológica

seguida de 500 ml de formaldehído al 10 % diluido en agua destilada. Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 ml/ minuto. Al término de la perfusión se extrajo un fragmento de 2 cm de ME de cada espécimen, con la zona de lesión en el centro de dichos fragmentos.

Los fragmentos de ME se colocaron en el mismo fijador durante 1 semana, al cabo de la cual se siguió el procedimiento de rutina para ser embebidos en parafina: deshidratación en alcoholes graduales (alcohol etílico al 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto, 1 hora en cada uno), aclaración en xileno (1 hora), colocación en parafina a 55°C durante 2 horas y posteriormente inclusión en unos moldes fabricados *ex-profeso* para contener los 2 cm de ME en sentido longitudinal y de esta manera tener la posibilidad de hacer cortes transversales sin necesidad de reincluir el tejido. Se realizaron cortes secuenciales de 10 $\mu$  de espesor, de los cuales se tomaron muestras para los estudios morfológicos a intervalos de 750  $\mu$ . Los cortes seleccionados se pasaron a un baño de flotación con agua a 55°C (a cada litro de agua se le agregó 0.5 g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron sobre portaobjetos.

Laminillas de todos los niveles (aproximadamente 25 laminillas por espécimen, separadas por un intervalo de 750  $\mu$ ) se impregnaron con nitrato de plata utilizando la técnica de Sevier-Munger. Con esta técnica, se impregnan de negro y de manera selectiva las fibras nerviosas (Martín *et al.* 1991). Los cortes se desparafinaron colocándolos en xileno durante 15 min, luego se colocaron en alcohol absoluto y alcohol al 90% 10 min en cada uno, se lavaron en agua corriente y en dos baños de agua destilada, después se colocaron durante 15 min en una solución de nitrato de plata al 20% (precalentada a 60°C), se lavaron en agua destilada, luego se colocaron durante 5 a 30 min (hasta obtener un color café dorado) en una solución preparada a base de nitrato de plata al 10%, hidróxido de amonio al 30%, carbonato de sodio al 26% y formaldehído al 2%; después se lavaron en agua corriente, se colocaron durante 2 min., en solución de tiosulfato de sodio al 5%, nuevamente se lavaron, se deshidrataron en alcoholes

graduales (90% y absoluto) hasta llevarlas a xileno y se montaron con resina sintética para ser observadas al microscopio. Se identificó el epicentro de la lesión definido como el sitio donde se encontró mayor destrucción de tejido medular o menor cantidad de tejido medular preservado.

## RESULTADOS

Morfología de la médula espinal normal con la técnica de impregnación argéntica utilizada.

Se incluyen como testigo diferentes imágenes de cortes transversales de la ME de rata sin lesión a nivel de T-9 (Figuras 1 y 2). Nótese que a nivel de la sustancia blanca, no hay axones que crucen la línea media. En la sustancia gris, en cambio, existen abundantes axones que si la cruzan los cuales son más evidentes en las comisuras posterior y anterior (Figura 2).

Resultados de la evaluación morfológica general de la zona de lesión

Después de la contusión medular, la zona de mayor destrucción del parénquima medular (o de menor preservación de tejido medular), denominada epicentro, correspondió al sitio del impacto. Al final del estudio, el epicentro se caracterizó por pérdida total de la sustancia gris y preservación de sustancia blanca en cantidad variable, generalmente en forma asimétrica (derecha-izquierda), localizada en la periferia de la ME, sobre todo a nivel lateral y ventral, formando muchas veces un anillo incompleto en torno a un quiste (Figura 3). En estadios tempranos (primera y segunda semana), el epicentro y sus regiones vecinas, mostraron datos de necrosis caracterizada por: hemorragia parenquimatosa, trombosis vascular, edema, segmentación axonal e infiltrado inflamatorio (el cual fue cambiando gradualmente de células polimorfonucleares a células mononucleares en el lapso de 1 a 2 semanas que duró esta fase). Al término de la necrosis, se observaron abundantes macrófagos espumosos, los cuales fueron desapareciendo paulatinamente a partir de la tercera semana de lesión, dejando cavidades de tamaño variable, generalmente trabeculadas, las que se observaron hasta el final del estudio. En la fase crónica, el área total de corte de la ME a nivel del epicentro y zonas vecinas, siempre fue

menor al normal, indicando un proceso de colapso.

En todos los casos se identificó una zona de destrucción Walleriana en los cordones posteriores, de magnitud variable, incluyendo la porción central y con salida hasta la periferia, en forma de ojo de cerradura antigua (Figura 4A). Este fenómeno se encontró hasta el final del extremo cefálico analizado (aprox. a 1 cm del epicentro).

En los cortes en sentido caudal al epicentro, al igual que en sentido cefálico, presentó más tejido medular preservado a mayor distancia del epicentro. La destrucción en los cordones posteriores, se observó en la porción central de los mismos (Figura 4B). Justamente en esta zona de destrucción, es donde encontramos el fenómeno de plasticidad que describimos, motivo de esta tesis.

#### Características de los axones neoformados:

Con el método de impregnación utilizado se identificó un grupo de axones orientados en forma perpendicular u oblicua al eje mayor de la ME, con dirección aparentemente errática. A estos axones los calificamos como neoformados; se diferencian fácilmente de los axones preexistentes, ya que estos últimos en un corte transversal de médula espinal sólo se observan como puntos, pues corren en dirección céfalo-caudal o viceversa, pero no en sentido transversal u oblicuo. De los axones neoformados hicimos la siguiente caracterización:

##### a) Ubicación de los axones neoformados.

Los axones colaterales de reciente formación se encontraron en todos los casos en la porción caudal a la zona de lesión y en ningún caso en la porción cefálica a la misma. La presencia de los axones en cuestión se ubicó a  $4.5 \pm 1.5$  mm por abajo del epicentro (región de la ME con mayor

destrucción de tejido nervioso, correspondiente a la zona de lesión original). La mayor parte de los axones neoformados se encontró en la sustancia blanca de la porción dorsal de la ME, tanto en la vía piramidal (motora) (Figuras 5 y 8) como en los cordones posteriores ascendentes (sensitivos) (Figuras 6, 7, 9, 10 y 11).

b) Relación de axones neoformados con tejidos adyacentes.

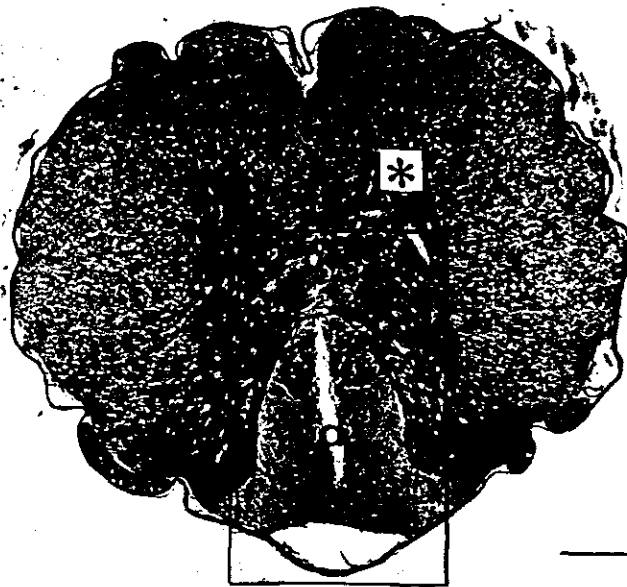
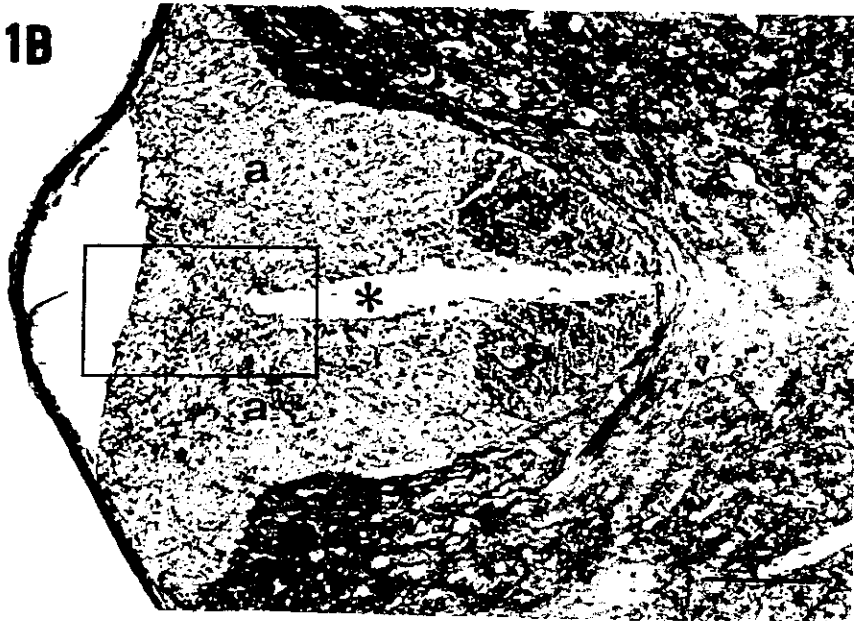
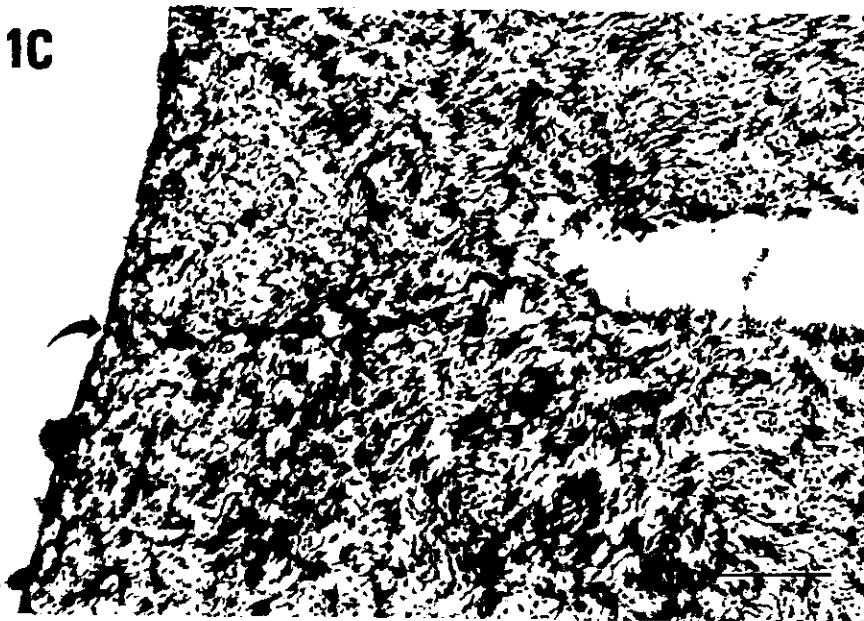
Los nuevos axones colaterales emergen de manera perpendicular desde los axones preservados que se localizan en la interfase entre el tejido medular preservado y el degenerado (Figuras 5, 6 y 9). Pueden viajar a través de la citada interfase (Figuras 8 y 9) o bien a través de detritus celulares (Figuras 5, 6 y 7) o de macrófagos (Figuras 10 y 11) en la mayoría de los casos los axones neoformados atraviesan la línea media, comunicando las porciones izquierda y derecha de la ME (Figuras 7, 8 y 10).

c) Expresión temporal de los axones neoformados.

Este fenómeno de plasticidad fue observado de 1 a 30 días después de la lesión, sin embargo, no se observó a los 60 y 90 días posterior al daño medular. Entre los días 2 y 4 después de la lesión se ubicó a los axones neoformados emergidos desde axones preservados y con una estructura característica de conos de crecimiento axonal en su extremo distal (Figuras 5 y 6). En estadios mas tardíos desde los 4 a los 30 días después de la lesión, no se encontraron ya estructuras parecidas a los conos de crecimiento y los axones neoformados iniciaban y terminaban en sustancia blanca preservada (Figuras 7, 8 y 10). En la última etapa donde se encontraron axones cruzando la línea media, es decir a los 30 días después de la lesión, los axones no se encuentran en contacto con sustancia blanca preservada, y además se ven envueltos



en una sustancia densa que con nuestra metodología no es posible determinar de que se trata (Figura 11). En los especímenes de 60 y 90 días después de la lesión, no se observaron los axones neoformados, la zona de destrucción se hizo más pequeña y quedó delimitada por tejido cicatrizal (Figura 12).

**1A****1B****1C****Figura 1:**

A. Panorámica de un corte transversal de médula espinal sin lesión y detalles del cordón dorsal. Se señalan los principales componentes de la médula incluyendo sustancia gris (cuerno posterior (asterisco grande), cuerno anterior (asterisco chico), canal del epéndimo (flecha) ) y sustancia blanca (cordón ventral (v) , cordón dorsal (d) y cordones laterales (l) ).

B. Imagen del cordón posterior donde se observa el surco central posterior (asterisco), la vía piramidal (p), localizada en la porción más ventral del cordón posterior y las vías ascendentes (a) que ocupan la mayor parte del cordón dorsal.

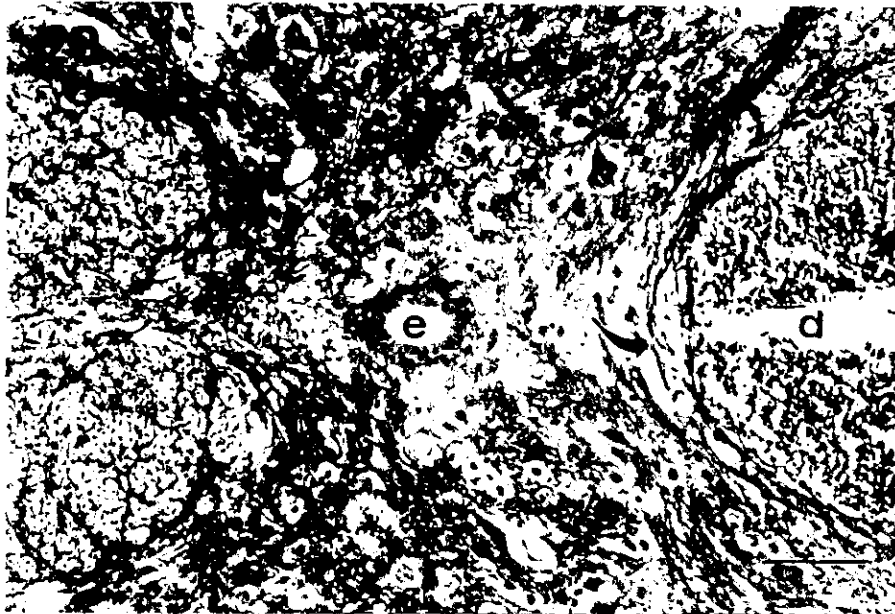
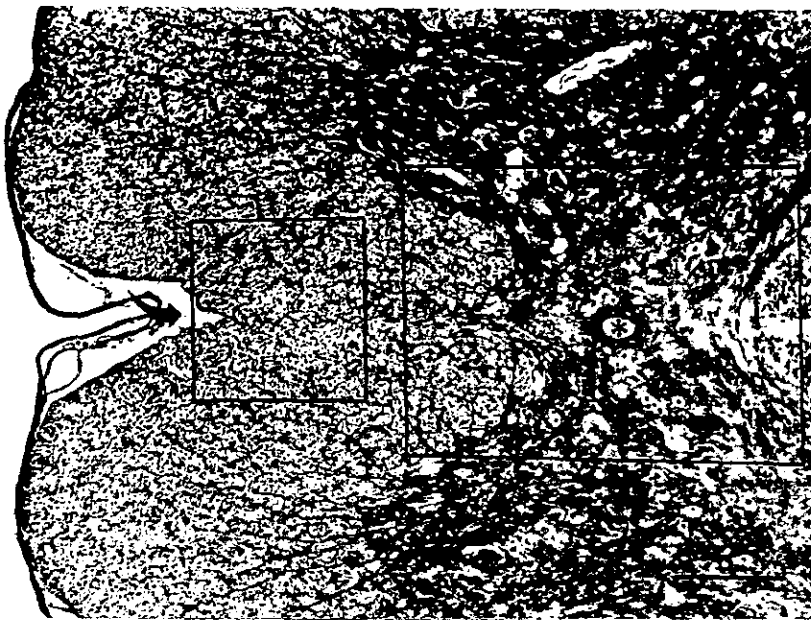
C. Porción central y más externa del cordón posterior, la línea media en este punto esta señalada por una línea de astrocitos (flechas grandes), cada axón a uno y otro lado se observa como un punto negro (flechas chicas) y esta rodeado por un halo claro que corresponde al lugar que ocupaba la mielina de cada uno de los axones. No se observan axones que atraviesen la línea media.

Barras:

A (4X) = 600  $\mu$ m

B (10X) = 240  $\mu$ m

C (40X) = 60  $\mu$ m

**2A****Figura 2:**

Detalles del cordón ventral y del istmo de la sustancia gris en médula espinal sin lesión.

A. Semipanorámica, surco medio ventral (flecha), epéndimo (asterisco).

B. Imagen del istmo, epéndimo (e), axones comisurales que atraviesan la línea media, tanto en región posterior (flecha), como anterior (asterisco), ambos a nivel de sustancia gris; se aprecia parte del cordón ventral (v) y dorsal (d).

C. Porción más externa y central del cordón ventral, se señala la línea media en color café claro (flechas grandes) nótese que los axones que aparecen como puntos negros rodeados de un halo claro correspondiente al espacio ocupado por la mielina (flechas chicas) no atraviesan en ningún caso la línea media. Barras:

A (10x) = 240  $\mu\text{m}$

B (20x) = 120  $\mu\text{m}$

C (40x) = 60  $\mu\text{m}$

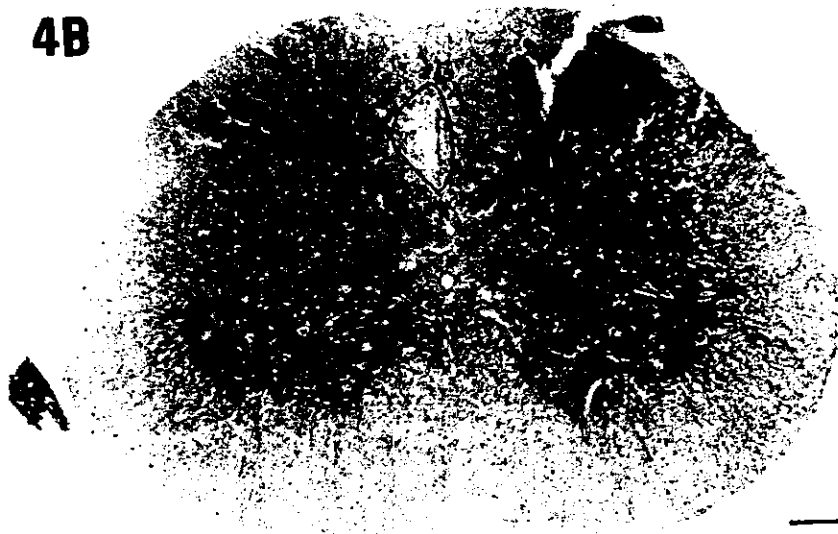
**3**

**Figura 3:**  
Corte transversal de ME a nivel del epicentro de la lesión, a 2 meses de evolución después del trauma. Se observa una gran destrucción en la porción central y un anillo de sustancia blanca preservada que es más grueso en la porción ventral (v) y casi nulo en la porción dorsal (d). Barra: (4X) = 600  $\mu$ m

**4A**

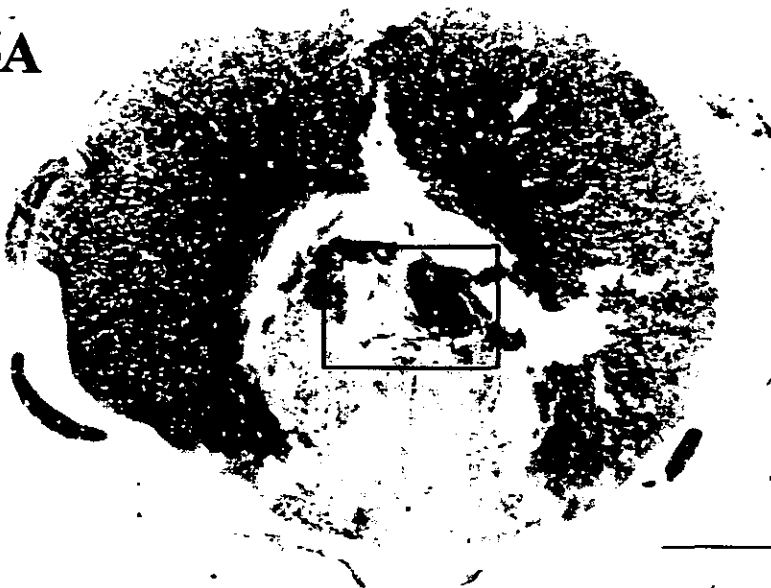
**Figura 4:**  
Ejemplos de destrucción Walleriana en el cordón posterior.

A. Corte transversal de ME obtenido a 4 mm en sentido cefálico al epicentro, nótese la destrucción en forma de "cerradura antigua".

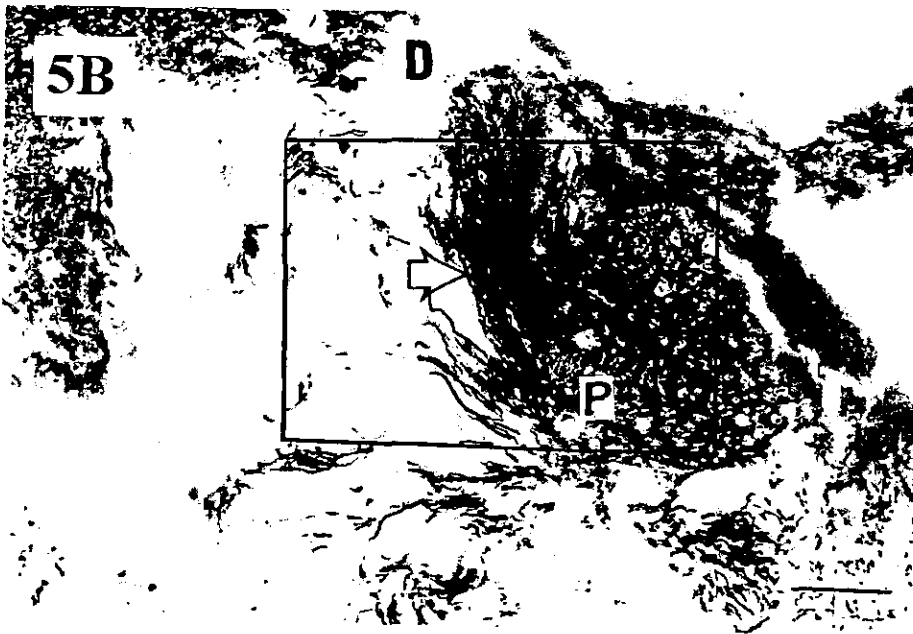
**4B**

B. Corte transversal de ME obtenido a 3.5 mm en sentido caudal al epicentro, nótese que la destrucción esta confinada a la porción central del cordón. Barra: (4X) = 600  $\mu$ m

5A



5B



5C

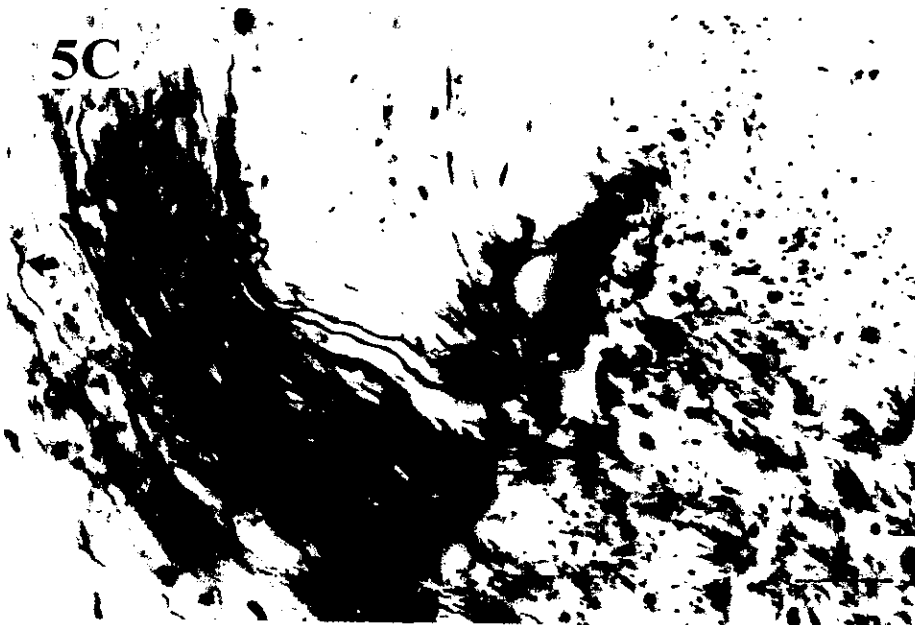


Figura 5:

A, B y C. Microfotografías en diferentes aumentos de un espécimen de 2 días después de la lesión.

B. Se observan abundantes axones neoformados (flecha vacía) que emergen perpendicularmente de axones preservados en la vía piramidal (P) y viajan sobre una zona de destrucción de tejido medular (D) donde sólo quedan detritus celulares.

C. Se observan estructuras compatibles con conos de crecimiento axonal en el extremo distal de los axones neoformados (flecha negra).

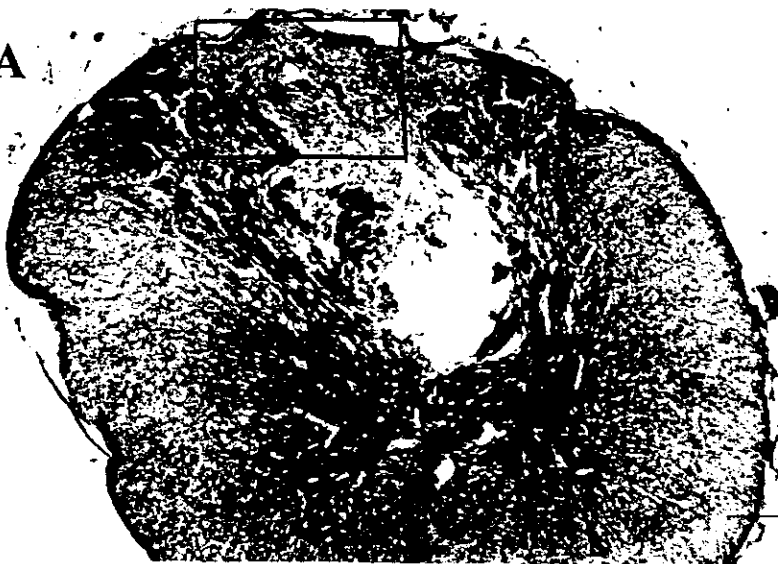
Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

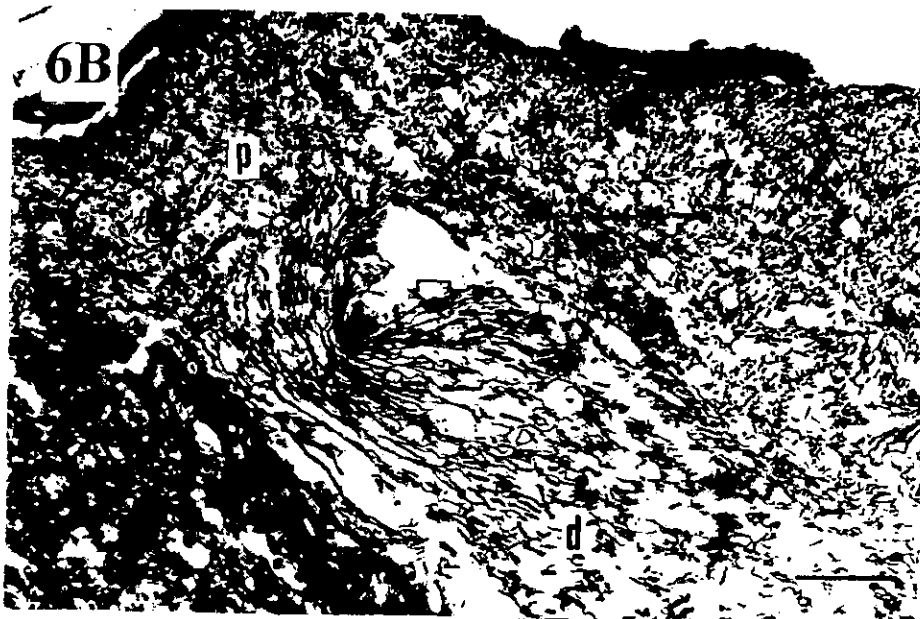
B (20x) = 120  $\mu$ m

C (100x) = 24  $\mu$ m

6A



6B



6C



Figura 6:

A, B y C. Panorámica y detalles de un espécimen de 4 días después de la lesión.

B. Se observaron abundantes axones neoformados (flecha vacía) que emergen perpendicularmente de axones preservados en sustancia blanca del cordón posterior (p) y viajan sobre una zona de destrucción de tejido medular (d).

C. Se observan estructuras celulares con conos de crecimiento axonal en el extremo distal de los axones neoformados (flechas negras).

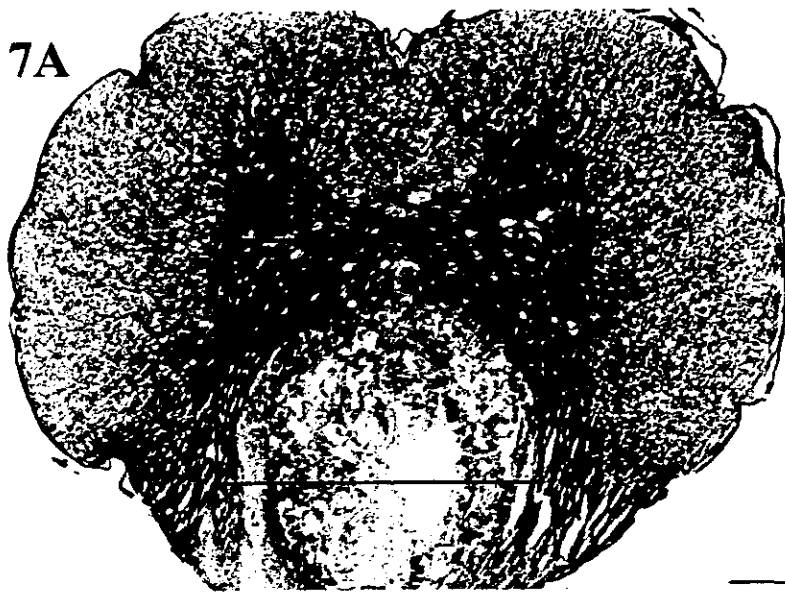
Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

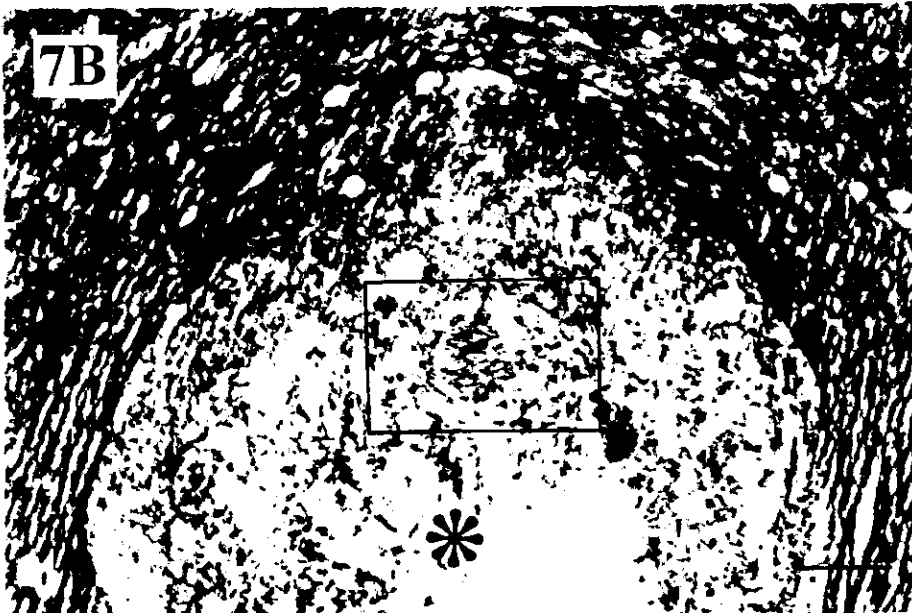
B (20x) = 120  $\mu$ m

C (100x) = 24  $\mu$ m

7A



7B



7C

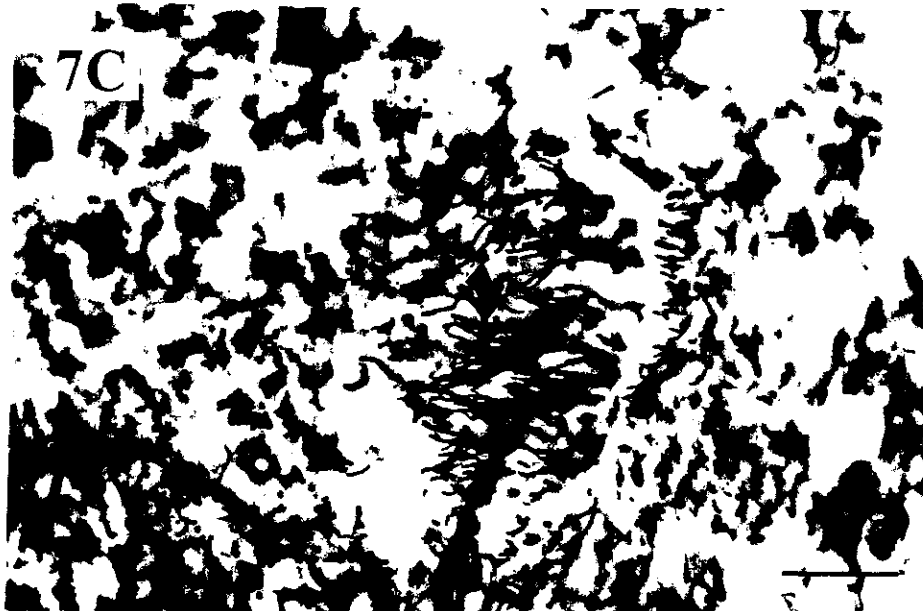


Figura 7:  
A, B y C. Panorámica y  
detalles de un espécimen de 6  
días después de la lesión.  
B. En una zona de destrucción  
(asterisco).  
C. Se observan axones  
neoformados que cruzan la  
línea media a nivel de  
cordones posteriores (flecha).  
Barras:  
A (4x) = 600  $\mu$ m  
B (10x) = 240  $\mu$ m  
C (40x) = 60  $\mu$ m

8A

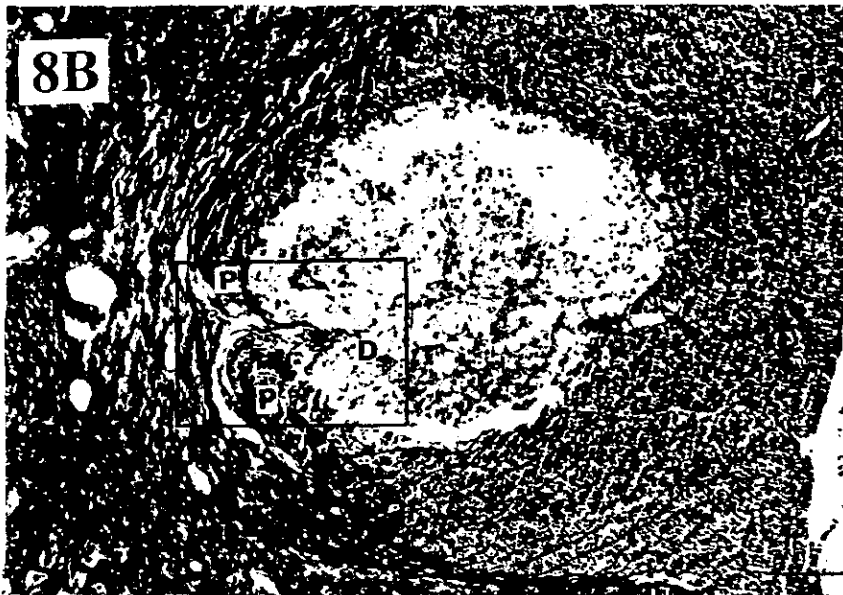


Figura 8:

A, B y C. Panorámica y detalles de un espécimen de 10 días después de la lesión.

Sé observan axones neoformados (flecha) que emergen perpendicularmente de axones preservados en la vía piramidal y viajan en la interfase entre una zona preservada (P) y una zona de degeneración (D). Cruzan la línea media viajando de una a otra vía piramidal.

Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

B (10x) = 240  $\mu$ m

C (40x) = 60  $\mu$ m



9A



9B

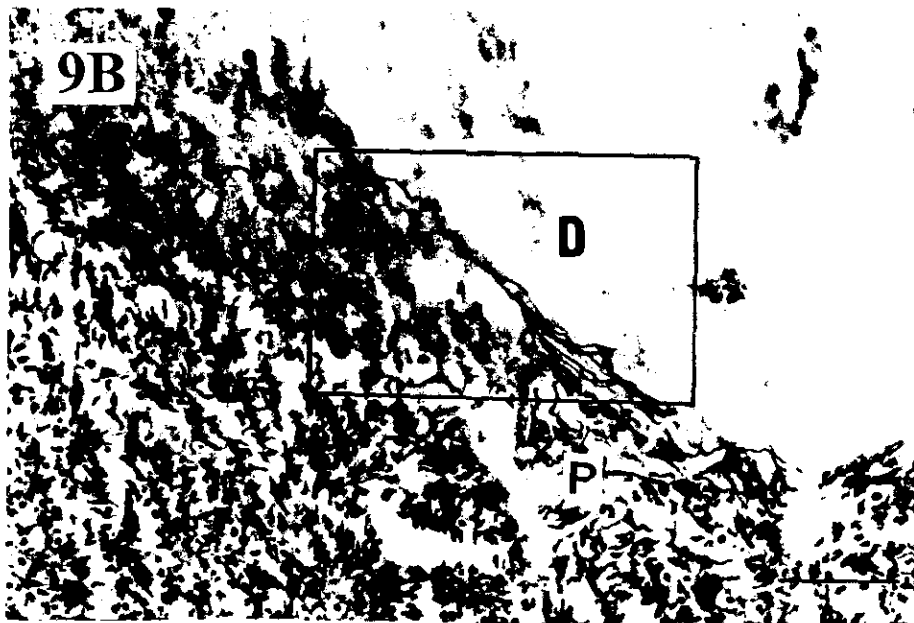


Figura 9:

A, B y C. Panorámica y detalle de un espécimen de 10 días después de la lesión.

B. Se observan axones neoformados que viajan en la interfase entre el tejido preservado (P) y el degenerado (D) en una porción de cordones posteriores.

C. Se aprecian ramificaciones múltiples de axones neoformados.

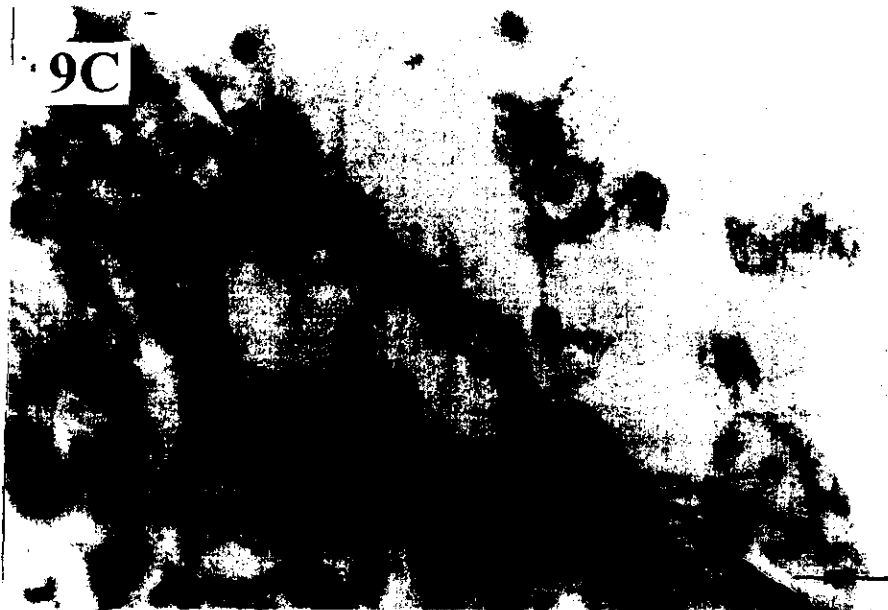
Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

B (40x) = 60  $\mu$ m

C (100x) = 24  $\mu$ m

9C



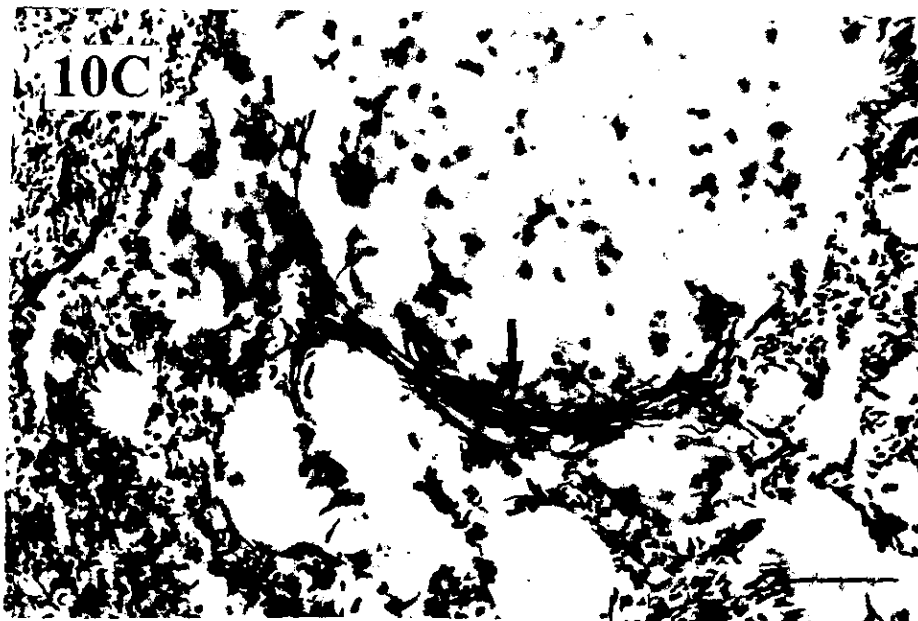
**10A****10B****10C**

Figura 10:

A, B y C. Microfotografías de un espécimen de 14 días después de la lesión.

B. Los axones neoformados atraviesan una zona de degeneración (D) con abundantes macrófagos.

C. Se observan axones neoformados que cruzan la línea media a nivel de cordones posteriores (flecha).

Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

B (10x) = 240  $\mu$ m

C (40x) = 60  $\mu$ m

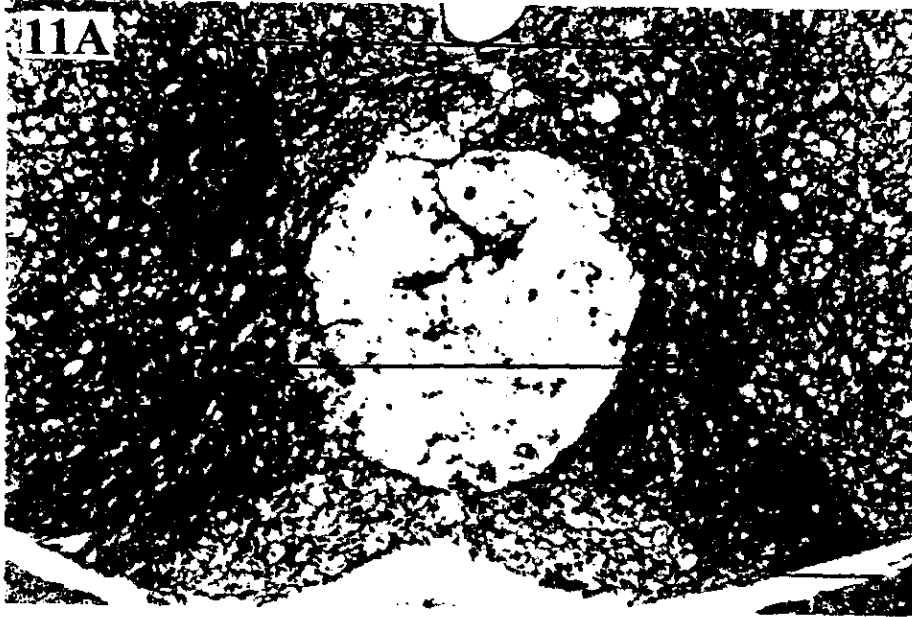
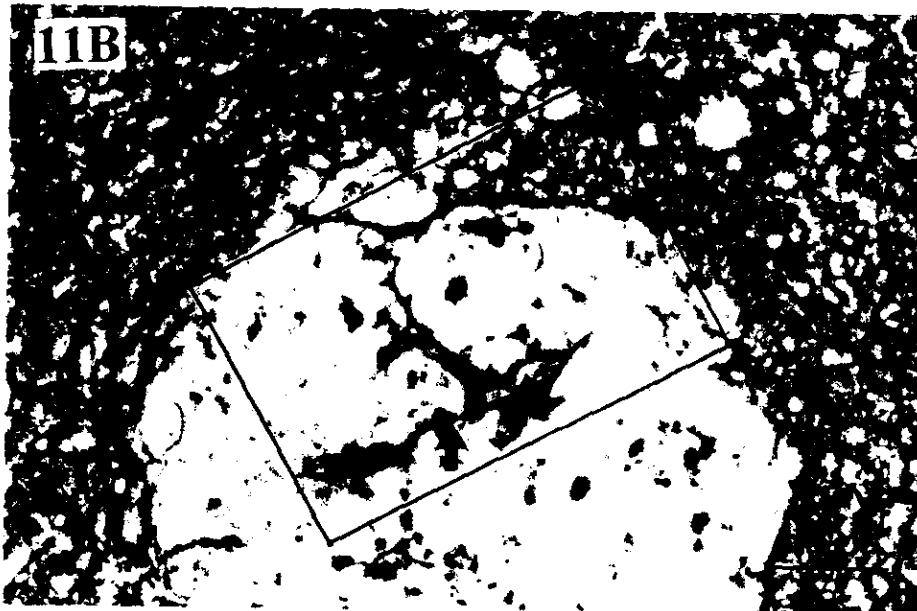


Figura 11:  
A, B y C. Panorámica y detalles de un espécimen de 30 días después de la lesión.  
B. Se observan axones neoformados (flecha) atravesando la línea media por una zona de destrucción con presencia de escasos macrófagos.  
C. Los axones aparentemente no hacen contacto con tejido preservado y están rodeados de una sustancia densa. Posiblemente corresponda a la imagen de los axones neoformados no evolucionados.

Barras:  
A (10x) = 240  $\mu\text{m}$   
B (20x) = 120  $\mu\text{m}$   
C (40x) = 60  $\mu\text{m}$





12B



Figura 12:  
Microfotografías de un espécimen de 2 meses de evolución poslesión. Se observa la zona de destrucción (d) en el centro del cordón posterior sin evidencia de axones neoformados y delimitada por tejido de aspecto cicatrizal.

Barras:

A (4x) = 600  $\mu$ m

B (10x) = 240  $\mu$ m

## DISCUSION

En el presente estudio histológico, se demuestra que después de una lesión traumática experimental de la ME, se desarrolla un proceso de plasticidad no descrito previamente, caracterizado por la formación temprana de colaterales axónicas que cruzan la línea media en la sustancia blanca dorsal, a una distancia definida ( $4.5 \pm 1.5$  mm) distal al epicentro de la lesión.

Existen diferentes estudios anatómicos en los que se han documentado cambios estructurales en la ME vecina a la zona de lesión, como en el caso de los estudios de Nacimiento et al. (1995b), donde en un modelo de hemisección se identifican desaparición y posterior neoformación de sinapsis en torno a las motoneuronas en los segmentos caudales a la lesión. Cabe hacer notar que estos cambios se han descrito en sustancia gris, sin embargo, no se conocen informes de cambios en sustancia blanca.

El crecimiento de axones colaterales (reinervación reactiva), es una forma de respuesta compensatoria del sistema nervioso a lesiones del mismo. Resulta de una expansión del campo terminal de los axones no dañados en respuesta a denervación parcial de las neuronas blanco por remoción de los sistemas de cobertura. Los mecanismos responsables para la selectividad en el crecimiento colateral de axones es desconocido. De acuerdo a nuestros resultados, el crecimiento de los axones colaterales no parece ser un fenómeno al azar, sobre todo, tomando en cuenta que su ubicación es relativamente constante.

Llama la atención lo temprano que se inicia el proceso de plasticidad que estamos describiendo, esto es, a partir del primer día después de producida la lesión. Aún cuando no existen reportes previos de este fenómeno después de LTME para contrastar nuestros resultados, existen otros modelos de lesión neurológica donde se ha reportado emisión temprana de axones

colaterales. Destaca el trabajo de Kuchel y colaboradores en 1992; donde después del corte unilateral del nervio carótido interno en ratas, observaron crecimiento colateral de axones procedentes del nervio intacto, para reinervar la glándula pineal denervada; este proceso de recrecimiento axonal se inicia en los dos primeros días después de la denervación de la glándula pineal. En el trabajo de Rossi y colaboradores (1991); también se describe emisión temprana de colaterales axónicas, tres días después de lesionar la oliva inferior en ratas, las neuronas olivares que sobreviven emiten colaterales axónicos que trepan a través de la capa molecular y reinervan las células de Purkinje denervadas del cerebelo.

Para que se presente un fenómeno de plasticidad con las características que hemos observado, se requiere de un microambiente favorable desde estadios tempranos después de la lesión. Se han reportado diferentes trabajos en modelos de LTME, en los que se describen la sobre-expresión, de manera espontánea, de moléculas capaces de favorecer fenómenos de plasticidad anatómica, incluyendo la formación de colaterales axónicos. De los factores asociados al microambiente favorable destacan: 1) incremento en la producción de diferentes factores neurotróficos (Bakhit *et al.* 1991; Reynolds *et al.* 1991). 2) mayor expresión de receptores para los factores neurotróficos (Koshinaga *et al.* 1983; Frisen *et al.* 1992; Risling *et al.* 1992; Follesa *et al.* 1994). 3) incremento en la producción de proteínas asociadas al crecimiento, particularmente de GAP-43 (Skene, 1989; Strittmater *et al.* 1990; 1992; Theriault *et al.* 1992; Linda *et al.* 1992; Curtis, 1993; Alonso *et al.* 1995; Nacimiento *et al.* 1995 [a]). Algunos de estos factores se incrementan desde las primeras horas después de producida la lesión. Los trabajos más significativos se describen con mayor detalle en la sección de antecedentes de esta tesis.

En nuestro trabajo observamos que los axones colaterales que atraviesan la línea media solo crecen en zonas donde hay destrucción del tejido medular, no así donde dicho tejido se encuentra

aparentemente íntegro. Proponemos que el terreno de destrucción es propicio para el crecimiento axonal, entre otras razones, porque se eliminan los inhibidores del crecimiento axonal naturales, como aquellos asociados a mielina/oligodendrocitos (Chiquet, 1989; Schwab, 1990a; Schwab, 1990b ) y los de la matriz extracelular de la línea media (García-Abreu *et al.* 1996).

La línea media del SNC juega un papel muy importante en el crecimiento y guía de los axones durante el desarrollo. La matriz extracelular de la línea media tiene propiedades diferentes a la ubicada en otras regiones en cuanto a su capacidad de bloquear o favorecer el recrecimiento axonal (García-Abreu *et al.* 1996). En la ME, en particular, los axones de la sustancia blanca no cruzan la línea media en condiciones normales. En nuestro trabajo encontramos que los axones atraviesan la línea media en lugares donde se perdió el tejido normal correspondiente a dicha región, por lo que suponemos que la pérdida de sustancias inhibitorias de la línea media permitieron el crecimiento aberrante que observamos.

## Significado de nuestros resultados.

Las observaciones preliminares sugieren que el fenómeno de plasticidad axónica que estamos describiendo puede ser un fenómeno transitorio el cual podría iniciar como una respuesta compensatoria a denervación parcial de neuronas blanco en estadios tempranos después de la lesión medular, por la influencia de diferentes factores neurotróficos y GAP-43.

Para explicar la ausencia del fenómeno anatómico descrito, en los estadios tardíos del estudio (2 y 3 meses poslesión), proponemos que la ausencia de los axones colaterales en cuestión puede ser el resultado de la acción de inhibidores del crecimiento axonal al dejar la zona de degeneración y entrar en contacto con la sustancia blanca preservada. De hecho está descrito que la mielina del SNC ejerce un efecto inhibitorio muy potente sobre el crecimiento de los axones (Schwab and Carino, 1988) y que el contacto directo del cono de crecimiento con la mielina o los oligodendrocitos induce colapso permanente del mismo (Bandtlow *et al.* 1993; Igarashi *et al.* 1993).

En cuanto a la importancia clínica de los axones colaterales en cuestión, cabe mencionar la posibilidad de que se formen circuitos neuronales anormales en la ME que contribuyan, al menos en parte, a los reflejos cruzados anormales que se presentan en animales de experimentación (Imai and Aoki, 1996) y en humanos (Calancie, 1991; Calancie *et al.* 1996) después de recuperado el choque medular. En tal caso, estas observaciones deben de tomarse en cuenta en la planeación de estudios de reconstrucción de ME con lesión crónica.



## CONCLUSIONES

Después de una lesión traumática experimental severa de la ME en ratas adultas, se presenta un fenómeno particular de plasticidad anatómica:

- Axones colaterales emergen perpendicularmente de axones preservados, localizados entre el tejido medular preservado y el tejido medular destruido.
- Este recrecimiento axonal ocurre tanto en la vía piramidal como en tractos dorsales ascendentes, a  $4500 \pm 1500 \mu\text{m}$  caudal al epicentro de la lesión.
- aparentemente se trata de un fenómeno transitorio de plasticidad, observado en nuestro estudio desde 1 día hasta un mes después de producida la lesión que no fue posible identificar en etapas tardías (2 y 3 meses poslesión).

Consideraciones finales.

Se han hecho muchos avances en la reparación estructural y funcional de la ME con lesión traumática y también se ha avanzado en la neuroprotección. En esta situación, es importante el entender en que grado ocurre una reorganización anatómica en la ME poslesionada y en ausencia de cualquier terapia.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen, A. R. 1911. Surgery of Experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA*. 57:878-880.
- Alonso, G., L. Ridet, A. B. Oestreicher, W. H. Gispen and A. Privat. 1995. B-50 (GAP-43). Immunoreactivity is rarely detected within intact catecholaminergic and serotonergic axons innervating the brain and spinal cord of the adult rat, but associated with these axons following lesion. *Exp. Neurol.* 134:35-48.
- Althaus, H. and W. Seifert (Eds.). 1987. Glial-neuronal communication in development and regeneration. Springer-Verlang. p. 112-126.
- Bakhit, C., M. Armanini, W. L. Wong, G. L. Bennett and J. R. Wrathall. 1991. Increase in nerve growth factor-like immunoreactivity and decrease in choline acetyltransferase following contusive spinal cord injury. *Exp. Brain Res.* 554:264-271.
- Bandtlow, C. E., M. F. Schmidt, T. D. Hassinger, M. E. Schwab and S. B. Kater. 1993. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science*. 259:80-83.
- Bedbrook, G. M. 1987. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia*. 25:172-184.
- Bernstein, J. J. and M. E. Bernstein. 1971. Axonal regeneration and formation of synapses proximal to the site of the lesion following hemisection of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 30:336-351.
- Bernstein, D. R. and D. J. Stelzner. 1983. Developmental plasticity of the corticospinal tract (CST) following mid-thoracic "over hemisection" in the neonatal rat. *J. Comp. Neurol.* 221:371-385.

- Bovolenta, P., F. Wandosell and M. Nieto-Sampedro. 1992. Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Restor. Neurol. Neurosci.* 4:173.
- Brailowsky, S., D. G. Stein y B. Wills (Eds.). 1992. El cerebro averiado. Plasticidad cerebral y recuperación funcional. Fondo de Cultura Económica. p. 67-83.
- Bregman, B. S. and E. Kunkel-Bagden. 1989. Methods of determining development and recovery of motor function after spinal cord lesions and transplants in rats. In: M. Brown and M. Goldberger (Eds.), *Proceedings of the Conference on Criteria for Assessing Recovery of Function: Behavioral Methods*, Springfield, NJ: American Paralysis Association. 47-55.
- Bregman, B. S., E. Kunkel-Bagden, P. J. Reier, H. N. Dai, M. McAtee and D. Gao. 1993. Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp. Neurol.* 123:3-16.
- Burneister, D. W., R. J. Rivas and D. J. Goldberg. 1991. Substrate-bound factors stimulate engorgement of growth cone lamellipodia during neurite elongation. *Cell motility cytoskeleton.* 19:255-268.
- Calancie, B. 1991. Interlimb reflexes following cervical spinal cord injury in man. *Exp. Brain Res.* 85:458-469.
- Calancie, B., S. Lutton and J. G. Broton. 1996. Central nervous system plasticity after spinal cord injury in man: interlimb reflexes and the influence of cutaneous stimulation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiol.* 101:304-315.
- Chiquet, M. 1989. Neurite growth inhibition by CNS myelin proteins: a mechanism to confine fiber tracts? *TINS*, 12:1-3.

**ESTA TESIS NO DEBE  
CALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Cotman, C. W. and J. S. Whitson. 1991. The role of misdirected plasticity In plaque biogenesis and Alzheimer disease pathology. In: Hefti, F., P. Brachet, B. Will, Y. Christen. (Eds.). Growth factors and Alzheimer disease. Springer-Verlag, Heidelberg. p. 222-233.
- Curtis, R., D. Green, R. M. Lindsay and G. P. Wilkin. 1993. Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J. Neurocytol.* 22:51-64.
- Das, G. D. 1986. Neural transplantation in spinal cord under different conditions of lesions and their functional significance. In: Das, G. D. and R. B. Wallace. (Eds.). Neural transplantation and regeneration. Springer-Verlag. p. 1-61.
- Das, G. D. 1989. Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. *Brain Res. Bull.* 22:7-32.
- Das, G. D., K. G. Das, J. Brasko, M. Riedl, P. Rai and V. Rajeswari. 1989. Spinal traumas: some postoperative complications in experimental animals. *Brain Res. Bull.* 22:33-37.
- Edds, M. V. 1953. Collateral nerve regeneration. *Quartz Rev. Biol.* 28:260-276.
- Faden, A. I. and R. P. Simon. 1988. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann. Neurol.* 23:623-626.
- Follesa, P., R. J. Wrathall and I. Mocchiatti. 1994. Increase basic fibroblast growth factor mRNA following contusive spinal cord injury. *Brain Res. Mol.* 22:1-8.
- Frankel, H. 1987. Spinal cord injury units. *Paraplegia.* 25:239-240.
- Frisen, J., V. M. Verge, S. Cullheim, H. Persson H, K. Fried, D. S. Middlemas, T. Hunter, T. Hokfelt and M. Risling. 1992. Increased levels of trkA and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:1282-1286.- Gage, F. H. and C. W. Cotman (Eds.). 1992. Plasticity and pathology in the damaged brain. Raven Press. p. 239-264.

- Hsu, C. Y., P. V. Halushka, E. Hogan and R. D. Cox. 1986. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* 74:289-296.
- Igarashi, M., S. M. Strittmatter, T. Vartanian and M. C. Fishman. 1993. Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science.* 259:77-79.
- Imai, T. and M. Aoki. 1996. Temporal relationships between the recovery of longitudinal reflex systems and motor recovery in chronic spinally-lesioned rats. *Rest. Neurol. Neurosci.* 9:167-176.
- Iwashita, Y., S. Kawaguchi and M. Murata. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature.* 367:167-170.
- Kalil, K. and G. Schneider. 1975. Retrograde cortical and axonal changes following lesions of the pyramidal tract. *Brain Res.* 89:15-27.
- Kao, C.C. and L. W. Chang. 1977. The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part I. A correlated histochemical study. *J. Neurosurg.* 46:197-209.
- Kerr, F. W. L. 1975. Structural and functional evidence of plasticity in the central nervous system. *Exp. Neurol.* 48:16-31.
- Koshinaga, M., H. R. Sanon and S. R. Whitemore. 1983. Altered acidic and basic fibroblast growth factor Expression following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 120:32-48.
- Kuang, R. Z. and K. Kalil. 1990. Specificity of corticospinal axon arbors sprouting into denervated contralateral spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 302:461-472.
- Kuchel, G. A., R. Hellendall and M. Blum. 1992. Transynaptic regulation of low-affinity p75 nerve growth factor receptor mRNA precedes and accompanies lesion-induced collateral neuronal sprouting. *Exp. Neurol.* 118:73-84 .

- Martin, D., J. Schoenen, P. Delree, P. Leprince, B. Rogister and G. Moonen. 1991. Grafts of syngenic cultured, adult dorsal root ganglion-derived Schwann cells to the injured spinal cord of adult rats: preliminary morphological studies. *Neurosci Lett.* 124:44-48.
- Murray, J. G. and J. W. Thompson. 1957. The occurrence and function of collateral sprouting in the sympathetic nervous system of the cat. *J. Physical.* 135:133-1620.
- Murray, M. and M. Goldberger. 1974. Restitution of function and collateral sprouting in cat spinal cord: The partially hemisected animal. *J. Comp. Neurol.* 158:19-36.
- Nacimiento, W., T. Sappok, G. A. Brook, L. Tóth, A. B. Oestreicher, W. H. Gispen, J. Noth and G. W. Kreutzberg. 1995. B-50 (GAP-43) in the rat spinal cord caudal to hemisection: lack of intraspinal sprouting by dorsal root axons. *Neuroscience Letters.* 194:13-16 (a).
- Nacimiento, W., T. Sappok, G. A. Brook, L. Tóth, S. W. Schoen, J. Noth and G. W. Kreutzberg. 1995. Structural changes of anterior horn neurons and their synaptic input caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat: a light and electron microscopic study. *Neuroscience Letters.* 90:552-564 (b).
- Nathan, P. W. and M. C. Smith. 1973. Effects of two unilateral cordotomies on the motility of the lower limbs. *Brain.* 96:171-194.
- Norris, C. R. and K. Kalil. 1990. Morphology and cellular interactions of growth cones in the developing corpus callosum. *J. Comp. Neurol.* 293:268-281.
- Panjabi, M. M. 1987. Experimental spinal cord trauma a biomechanical viewpoint paraplegia. 25:217-220.
- Raisman, G. 1969. Neural plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 14:25-48.
- Rakic, P. 1985. Limits of neurogenesis in primates. *Science.* 227:1054-1056.

- Ramón y Cajal S. 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system. Vol. 1 and 2. University Press, Oxford, London .
- Reier, P. J., B. S. Bregman and J. R. Wujer. 1986. Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 247:275-296.
- Reynolds, M. E., N. Brunello, I. Mocchetti and L. R. Wrathall. 1991. Localization of nerve growth factor receptor mRNA in contused rat spinal cord by *in situ* hybridation. *Brain Res.* 559:149-153.
- Risling, M., K. Fried, H. Linda, S. Cullheim and M. Meier. 1992. Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats. *J. Neurocytol.* 21:79-93.
- Rohrer, H. 1990. The role of growth factors in the control of neurogenesis. *J. Neurosci.* 2:1005-1015.
- Rossi, F., L. Wiklund Van der, J. J. Want and P. Strata. 1991. Reinnervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres surviving a subtotal lesion of the inferior olive in the adult rat. I. Development of new collateral branches and terminal plexuses. *J. Comp. Neurol.* 308:513-535.
- Saffran, B. N. and K. A. Crutcher. 1990. NGF-induced remodeling of mature uninjured axon collaterals. *Brain Res.* 525:11-20.
- Savio, T. and M. E. Schwab. 1990. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4130-4133.
- Schnell, L., R. Schneider, R. Kolbeck, Y. A. Barde and M. E. Schwab. 1994. Neurotrophin-3 enhances of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature.* 367:170-173.

- Schwab, M. E. and P. Carino. 1988. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 8:2381-2393.
- Schwab, M. E. 1990. Myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Exp. Neurol.* 109:2-5 (a).
- Schwab M. E. 1990. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *TINS.* 13:452-456 (b).
- Selzer, M. E. 1978. Mechanisms of functional recovery and regeneration after spinal cord transection in larval sea lamprey. *J. Physical.* 277:395-408.
- Sivron, T., A. Cohen, R. Duvdevani, G. Jeserich and M. Schwartz. 1990. Glial response to axonal injury: In vitro manifestation and implication for regeneration. *Glia.* 3:267-276.
- Skene, J. H. P. 1989. Axonal growth associated proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* 12:127-156.
- Smith, G. M., J. Rudge, J. Silver and R. H. Miller. 1988. Astrocyte supported neurite outgrowth and neural adhesion is reduced as the astrocyte matures. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14:867.
- Sperry, R.W. and E. Hibbard. 1968. Regulative factors in the orderly growth of retino-tectal connections. In: Wolstenholme, G. E. and M. O'Conner. (Eds.). *Growth of the nervous system.* Ciba symposium, A. Churchill, Ltd. p. 41-52.
- Stover, S. L. and P. R. Fine. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia.* 25:225-228.
- Strittmatter, S. M., D. Valenzuela, T. E. Kennedy, E. J. Neer and M. C. Fishman. 1990. Gp130 is a major growth protein subjected to regulation by GAP-43. *Nature.* 344:836-841.
- Strittmatter, S. M., T. Vartarian and M. C. Fishman. 1992. GAP-43 as a plasticity protein in neural form and repair. *J. Neurobiol.* 23:507-520.
- Theriault, E., W. Tetzlaff, C. H. Tator. 1992. Elevated gene expression in the red nucleus after spinal cord compression injury. *Neuroreport.* 3:559-562.



- Walter, J., T. E. Allsopp and J. A. Bonhoeffer. 1990. A common denominator of growth cone guidance and collapse. *TINS*. 13:447-452.
- Weddell, G., L. Gutmann and E. Gutmann. 1941. The extension of nerve fibres into denervated areas of skin. *J. Neurol. Psychiat.* 4:206-225.
- Weiss, P. and H. B. Hiscoe. 1948. Experiments on the mechanics of nerve growth. *J. Exp. Zool.* 107:315-396.
- Williams, T.H., J. Jew and S. L. Palay. 1973. Morphological plasticity in the sympathetic chain. *Exp. Neurol.* 39:181-203.
- Windle, W. F. 1956. Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system. *Physical Rev.* 36:427-440.
- Windle, W. F., J. L. Litrell, J. O. Smart and J. Joralemon. 1956. Regeneration in the cord of spinal monkeys. *Neurology.* 6:420-428.
- Wujek, J. R., H. Haleem-Smith, Y. Yamada, R. Lipsky, Y. T. Lan and E. Freese. 1990. Evidence that the B2 chain of laminin is responsible for the neurite out growth promoting activity of astrocyte extracellular matrix. *Dev. Brain Res.* 55:237-247.