



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia.

Facultat de Medicina

**Efectos del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en  
un modelo de lesión fotoquímica de la médula espinal de la rata**

**Guillermo García Alías**

**TESIS DOCTORAL**

**Bellaterra 2004**

# **Efectos del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en un modelo de lesión fotoquímica de la médula espinal de la rata**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Guillermo García Alías** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del **Dr. Enrique Verdú Navarro**, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Doctorando

Director de Tesis

Guillermo García Alías

Dr. Enrique Verdú Navarro



## AGRADECIMIENTOS

Un amigo me dijo una vez que los cambios más importantes en la persona son aquellos en los que ni él mismo se ha dado cuenta de que los ha llevado a cabo. Estoy completamente de acuerdo con su afirmación. Pero si hago una mirada retrospectiva, me doy cuenta de que nada tiene que ver la persona que entró, hace cinco años, en el laboratorio de neurofisiología, con la persona que lo deja ahora, en busca de un proyecto postdoctoral al que incorporarse en algún centro de excelencia extranjero.

Este cambio gradual no se debe al azar sino que ha estado firmemente forjado desde la disciplina formal que la ciencia exige, y por la exquisita voluntad de las personas que me rodean. Es por ello, que sin lugar a dudas, quiero agradecer en primer lugar a Raquel el hecho de haber estado conmigo desde el principio, y acompañarme en esta larga y tortuosa carrera. Y por supuesto al *group leader*, el Dr. Xavier Navarro, y a mi director, el Dr. Enrique Verdú, por haberme, no sólo aceptado para formar parte del grupo de investigación sino además por enseñarme las habilidades, el espíritu crítico y la puesta en escena del científico y del docente.

Ahora, también es el momento de ver el trayecto recorrido y de no olvidar el peso tan importante que han tenido en mi formación Aurora y Luís Alías Navarro, y Antoni Oliva, quienes profundamente me han inculcado el interés por los fenómenos que me rodean. Y por supuesto, con Ignacio y María Luisa, con quienes comparto la ilusión y el esfuerzo del trabajo realizado, así como el entusiasmo por el apasionante, aunque incierto, futuro que me espera.

Quiero también agradecer a Esther Udina, Hugo Peluffo, Xavier Xifró y Antoni Valero-Cabré por ser referentes imprescindibles tanto dentro, como fuera del laboratorio.

Por último, no me olvido de todos los miembros del Grup de Neuroplasticitat i Regeneració y de la Unitat de Fisiologia Médica de la UAB. En especial del Dr. Joaquim Forés, por la extensa cirugía desarrollada, de Rubén López-Vales por el continuo alarde de comunicación científica, ni de Mónica Espejo y Natalia Lago por su alegre antipatía. Ni de mis familiares y amigos quienes siempre han mostrado un adorable interés por todo mi trabajo. De David Mañé, Antonio Lozano, Olga Ortega, Carles García, Sergio de Miguel, Dani y Ruth Villero, Gloria Quirós e Irene y Emilio García-Arnau.



## ABREVIACIONES

AMP	Adenosin monofosfato
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propinóico
BDNF	Factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro
Ca <sup>++</sup>	Ion Calcio
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CNTF	Factor de crecimiento nervioso ciliar
CSF	Factor estimulante de colonias
FGF	Factor de crecimiento de los fibroblastos
GAG	Glicosaminglicanos
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento
GDNF	Factor de crecimiento nervioso derivado de la glía
GE	Glía envolvente
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
GGF	Factor de crecimiento de la glía
GM-1	Gangliósido
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos y macrófagos
GMP	Guanidil monofosfato
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular
IFN $\gamma$	Interferón $\gamma$
IL	Interleuquina
IN-1	Anticuerpo anti-Nogo-1
IP-10	Proteína inducida por el IFN- $\gamma$
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
LFA-1	Antígeno-1 asociado a la función leucocitaria
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina
MCP-1	Péptido quimioatractivo de los monocitos
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
MTN	Receptor de la Neurturina
Na <sup>+</sup>	Ion Sodio
NASCIS	Estudio nacional de lesiones agudas de la médula espinal
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NgR	Receptor de Nogo
NMDA	N-methyl-D-aspartato
NT	Neurotrofinas
OMgp	Glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos
ON	Óxido nítrico
p75 NTR	Receptor p75 del factor de crecimiento nervioso
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
RANTES	Regulado tras activación, expresión y secreción normal en células T
SC	Células de Schwann
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGF- $\beta$	Factor de transformación del crecimiento- $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
VCAM	Moléculas de adhesión vascular
VLA-1	Antígeno muy tardío

## RESUMEN

En la presente Tesis doctoral se ha caracterizado un modelo de lesión fotoquímica de la médula espinal de la rata, basado en la aplicación tópica del agente fotoactivo rosa de bengala. En los diferentes grupos experimentales estudiados, se ha constatado que a mayor tiempo de fotoactivación del colorante, mayor es la lesión producida en los animales, que desemboca en una pérdida progresiva de las capacidades neurológicas y funcionales de éstos (Trabajo 1). Asimismo, las lesiones fotoquímicas realizadas producen cambios en la reactividad glial y neuronal similares a los producidos tras una lesión traumática de la médula espinal (Trabajo 2).

Con el objetivo de avanzar en la búsqueda y mejora de una terapia promotora de la recuperación funcional de la médula espinal dañada, se han evaluado los efectos del trasplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en animales con una lesión fotoquímica. En los estudios a corto plazo, se ha evidenciado el papel neuroprotector ejercido por el trasplante glial, ya que los animales con trasplante presentaron una menor cavidad necrótica, atribuible a una menor reactividad astrocitaria, que los animales del grupo control (Trabajo 3).

También se han estudiado los efectos de una lesión en diferentes segmentos espinales, y se ha evidenciado que las lesiones en los segmentos lumbares afectan severamente las funciones motoras, en comparación a las producidas en los segmentos torácicos de la médula espinal (Trabajo 4).

Con el fin de evaluar la influencia del trasplante en la recuperación funcional de los animales a largo plazo, se escogió el modelo de lesión fotoquímica en el segmento torácico. Los resultados obtenidos muestran que los animales con el trasplante celular presentaron mayor preservación de parénquima medular, así como una mejor respuesta neurológica y funcional que los animales sin trasplante (Trabajo 5). Además, en comparación con el trasplante de células de Schwann, el trasplante de glía envolvente redujo la reactividad glial y promovió una mejor respuesta electrofisiológica (Trabajo 6).

Por último, se ha estudiado la influencia del método de trasplante celular en los efectos ejercidos por este en la médula espinal, observándose que el trasplante por medio de una inyección, a baja presión y de forma continua es similar al trasplante en forma de pulsos de aire repetidos (Trabajo 7).

# ÍNDICE

Introducción	1
1. Anatomía funcional de la médula espinal	1
2. La Lesión traumática de la médula espinal	4
2.1 Epidemiología de la lesión traumática	4
2.2 Modelos experimentales en el estudio de las lesiones traumáticas	5
2.2.1 Modelos de contusión	5
2.2.2 Modelos de compresión	6
2.2.3 Modelos de sección	6
2.2.4 Modelos de lesión vascular	7
2.3 Características de las lesiones traumáticas	8
2.3.1 Las lesiones primarias	9
2.3.2 Las lesiones secundarias	9
3. Factores que impiden la restauración funcional del sistema nervioso central	16
3.1 Factores limitantes extrínsecos a las neuronas	17
3.1.1 La cicatriz glial	18
3.1.2 Moléculas inhibitorias de la mielina	19
3.1.3 Moléculas de señalización durante el desarrollo	21
3.2 Factores limitantes intrínsecos a las neuronas	22
4. Estrategias promotoras de la regeneración neural	22
5.1 Neuroprotección	23
5.2 Potenciación de las capacidades regenerativas intrínsecas de las neuronas centrales	25
5.3 Bloqueo de los componentes de la cicatriz glial	26
5.4 Neutralización de los efectos bloqueantes de la mielina	27
5.5 Modulación del ambiente glial: El trasplante celular	29
Objetivos	32
Diseño experimental	33
Resultados	39
Trabajo 1	41
Functional and electrophysiological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat.	
<i>Journal of Neurotrauma</i> 2003, 20: 501-510	

Trabajo 2	53
Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. <i>Journal of Neurotrauma</i> 2003, 20: 483-499	
Trabajo 3	73
Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. <i>Neuroreport</i> 2001, 12: 2303-2309	
Trabajo 4	83
Functional changes in the spinal cord of the rat caused by injuries in the thoracic or lumbar spinal segments. <i>(Manuscrito)</i>	
Trabajo 5	93
Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. <i>Glia</i> 2003, 42: 275-286	
Trabajo 6	107
Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or schwann cells promotes functional recovery after a mild thoracic injury of the rat spinal cord. <i>(Manuscrito)</i>	
Trabajo 7	125
El trasplante de células de la glía envolvente del bulbo olfatorio favorece la preservación de parénquima medular y evita la pérdida de función motora y sensorial. <i>(Manuscrito)</i>	
Discusión	139
1 La lesión fotoquímica como modelo experimental de lesión traumática	139
2 El efecto del trasplante de glía envolvente en la médula espinal lesionada	142
2.1 Propiedades de la glía envolvente	143
2.2 Trasplante de glía envolvente en diferentes modelos de lesión del SNC	145
2.3 El trasplante de glía envolvente promueve la preservación del parénquima medular y el restablecimiento funcional de la médula espinal	148
Conclusiones	154
Bibliografía	155

## INTRODUCCIÓN

Seguramente, no hay peor condición para el ser humano que la privación de su libertad. En lo referente al plano metafísico, el hombre ha mostrado una y otra vez a lo largo de la historia, no poder estar sujeto a una única convicción política o ideal, por lo que ha tenido que reiteradamente luchar contra las imposiciones para poder recuperar los dominios de su voluntad. En cambio, físicamente el hombre está determinado por la estructura y por las fuerzas de la naturaleza sin que, de momento, pueda comprenderlas ni modularlas a su capricho. Es por ello que se halla incondicionalmente sujeto a su régimen de acción con escaso, o nulo, margen de acción.

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 la libertad de movimiento y de sensación perdidas tras una lesión. Las secuelas producidas por éstas son, de momento, 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 lesionado 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.

### **Anatomía funcional de la médula espinal**

La médula espinal es una estructura delicada, que se asemeja a un cilindro ligeramente aplanado y que se aloja en el interior de la columna vertebral. Rostralmente continúa con el tronco del encéfalo y caudalmente se afila, de manera brusca, dando lugar al cono terminalis, de donde parte una fina banda de tejido conjuntivo que la une a la primera vértebra coccígea. 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 nace bilateralmente un par de nervios 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 abordar con éxito su función la médula espinal requiere en primer lugar, una alta especialización morfológica y fisiológica de las células que la componen, y 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, las cuales forman una estructura casi cristalina (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. En las astas dorsales se localizan núcleos de neuronas que intervienen en el relevo y procesamiento sensorial, en las astas intermedias se hallan 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.

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 sinaptar 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, que constituyen las vías del mantenimiento básico de la postura y de la locomoción. En cambio, el control fino de los movimientos, sobretudo el de los dígitos de las extremidades, está regulado por los tractos filogenéticamente más modernos que son el rubroespinal y corticoespinal, 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 contralateralmente por el funículo lateral para sinaptar directa o indirectamente con las motoneuronas más lateralizadas de las astas ventrales. En cambio, el tracto corticoespinal está compuesto por los axones proyectados por las células piramidales de la V capa de la corteza motora. Un rama de éstos decusa en el tronco del encéfalo y desciende por la parte más dorsal del funículo lateral para sinaptar con los núcleos motores espinales, mientras que, una porción más pequeña desciende ipsilateralmente por el cordón ventral de la médula espinal. 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 (Brösamle et al., 1997).

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.

En función de su área de terminación, los tractos del cordón ventrolateral se agrupan en tres sistemas: los espinotalámicos, que desembocan en el tálamo, los espinoreticulares que finalizan en la formación reticular y los espinocerebelosos que terminan en el cerebelo y en núcleos relacionados con él. Los dos primeros tractos conducen sensibilidad termoalgésica, táctil y de presión, mientras que los últimos transmiten información propioceptiva.

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 cuneato del bulbo raquídeo. Desde aquí se proyectan axones al tálamo, donde hacen relevo para finalizar en la corteza somatosensorial. Por esta vía se transmite información propioceptiva, así como la implicada en el procesamiento complejo como la discriminación táctil entre dos puntos, la vibración o la intensidad de la presión. Las fibras que proceden de las neuronas propioespinales forman la vía postsináptica del cordón posterior, y sus axones sinaptan con los núcleos del tálamo. Por esta vía se procesa información propioceptiva y táctil (Armengol 1999, Kelly 1985, Martin 1998, Tracey 1995).

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 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 del movimiento, por lo que el control motor se limitó a movimientos sencillos, fácilmente ejecutados 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 esta fue la causa de la aparición del sistema descendente lateral, básicamente del tracto rubroespinal. La evolución siguió su curso, y los animales terrestres desarrollaron maniobras motoras más complejas, que requirieron un procesamiento sensoriomotor más refinado. Por este motivo, se originó la corteza cerebral y las estructuras emparentadas con ella. El aumento de superficie neural y de conexiones sinápticas permitió la elaboración de comandos más complicados y de un aumento en el control fino de las extremidades (Holstege, 1995). 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, mucho más relevante que el de cualquier otro núcleo y tracto espinal motor. Prueba de ello es que ligeras lesiones del tracto corticoespinal provocan la paraplejia o tetraplejia (Nathan, 1994). En cambio en los mamíferos más antiguos, el control sobre la locomoción recae en estructuras del tronco del encéfalo, por lo que lesiones del tracto corticoespinal o rubroespinal no comportan graves déficits motores (Schucht et al., 2002), mientras que la paraplejia o tetraplejia se consigue mediante la afectación de las vías del sistema medial. Además los roedores y animales emparentados presentan una gran plasticidad y en lesiones en las que tan sólo se preserva un 5% del parénquima ventral medular, los animales mantienen las habilidades locomotoras (Fehlings y Tator, 1995).

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 la 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 sensiomotora (Bizzi et al., 2000, Wolpaw y Tennissen, 2001, Raintenau y Schwab, 2001).

## **2. La lesión traumática de la médula espinal**

### 2.1 Epidemiología de la lesión traumática

Las lesiones traumáticas del SNC son una de las causas que más muertes y minusvalías provocan en personas jóvenes (Marion, 1998). Concretamente, las lesiones de la médula espinal, aun no siendo tan comunes como los traumatismos craneoencefálicos (Zink, 2001), producen unos efectos devastadores en las personas que las sufren; el paciente presenta parálisis motora y pérdida de la sensibilidad de los segmentos corporales por debajo de la zona de lesión, así como disfunción intestinal, urinaria y sexual. Es por ello que el paciente necesita, de forma crónica, la asistencia sanitaria y el cuidado de sus familiares, haciendo que las lesiones medulares trasciendan del plano personal al familiar y estatal, por lo que plantean una problemática médica y social de gran repercusión socioeconómica. En España (1992) se estima que el promedio de coste de un paciente con lesión medular desde su primer tratamiento hasta su alta es de 8.000.000 de pesetas, lo que redunda en un dispendio global en el ámbito estatal de aproximadamente 30 mil millones de pesetas (Mazaira, 1997).

Se estima que en los países industrializados, la incidencia de las lesiones traumáticas es de 15-40 nuevos casos por millón de habitantes (Girolami et al., 1997). La mayoría de los accidentados son varones jóvenes de edades comprendidas entre 15 y 35 años. El accidente de tráfico es la principal causa que provoca estas lesiones, y constituye el 54% del total de la etiología traumática. Otros

desencadenantes, menos frecuentes, son los accidentes laborales, la práctica de deportes de aventura, y en un pequeño porcentaje las agresiones violentas por heridas de arma blanca o disparos (Mazaira, 1997). La tasa de mortalidad de los lesionados medulares asciende al 50% de los pacientes que acuden al hospital por primera vez tras el accidente. Los casos de supervivencia son debidos a la implementación de los primeros auxilios en los centros hospitalarios, donde farmacológicamente se frena el desarrollo de infecciones, de embolias pulmonares y de coágulos y trombos.

## 2.2. Modelos experimentales en el estudio de las lesiones traumáticas.

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 sea clínicamente relevante 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 extrapolación 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 de contusión, donde un peso genera una fuerza compresiva aguda sobre la médula espinal, modelos de compresión, donde la fuerza aplicada es persistente durante un periodo de tiempo, modelos de 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.

### 2.2.1 Modelos de contusión

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 una alteración mecánica del tejido nervioso, que va seguida por el progreso 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 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). Este modelo se

bautizó con el nombre de "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 del weight-drop ha sido criticada, modificada y mejorada reiteradamente por numerosos investigadores, y es en la actualidad el procedimiento de contusión más utilizado. Modificaciones posteriores acoplaron un dispositivo sobre la médula, de tal forma que el peso impactaba sobre éste, y al deformarse comprimía la médula espinal (Freeman-Wright, 1953). Posteriormente se aplicaron sensores electrónicos que permitían calcular la energía liberada por la compresión (Molt et al., 1978), o el uso de 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 ejercida (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).

### 2.2.2 Modelos de compresión

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 se basa en la colocación de un balón hinchable en el espacio extradural, para posteriormente inflarlo a presión o a intervalos de tiempo conocidos. Un modelo alternativo es la aplicación de clips de aneurismo sobre la médula espinal, que permite producir lesiones de diferente severidad en función del tiempo o de la fuerza aplicada por el clip (Rivlin y Tator 1978, Joshi y Fehlings 2002a, 2002b). 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).

### 2.2.3 Modelos de sección

Las lesiones por sección permiten realizar la disrupción de tractos espinales concretos, generando una lesión nítida y bien localizada. Como en la mayoría de lesiones experimentales, se requiere un paso previo que consiste en realizar la cirugía espinal, y posteriormente realizar la sección

con una cuchilla, bisturí o tijeras. Se han desarrollado procedimientos alternativos donde el uso de un láser permite la sección de la médula espinal sin necesidad de realizar la laminectomía vertebral. En esta situación la energía del láser es capaz de atravesar el tejido óseo y muscular para dañar directamente el parénquima medular. Además, la sección producida es más nítida que la producida con bisturí (de la Torre, 1984)

#### 2.2.4 Modelos de 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 agentes polimerizadores, por la obstrucción de la aorta torácica con clips de aneurismo, 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). Las reacciones fotoquímicas son un modelo utilizado en diversos campos de la investigación neurobiológica que se basan en la capacidad de ciertas moléculas orgánicas, como el rosa de bengala o la eritrosina B, de formar especies reactivas del oxígeno al ser irradiadas con un haz de luz de determinada longitud de onda. La interacción de la luz con el rosa de Bengala resulta en la transferencia de la energía de los fotones al oxígeno, concluyendo en la formación de radicales libres (Spikes et al., 1991). La presencia de rosa de Bengala fotoactivo en un tejido produce la interacción de las especies reactivas de oxígeno formadas con proteínas y lípidos insaturados de las membranas celulares y de compartimentos citoplasmáticos produciendo su peroxidación y por tanto disfunción celular (Valenzeno et al., 1987).

La lesión fotoquímica desarrollada por Prado y colaboradores (1987) consistió en la alteración de la vasculatura medular a partir de la fotoactivación del rosa de Bengala. El procedimiento consistió en introducir un bolo de rosa de Bengala intravenoso para posteriormente irradiar la columna vertebral del animal con una fuente de luz láser. En este procedimiento experimental la cirugía no es necesaria, ya que el arco vertebral es lo suficientemente translúcido para que las ondas láser lo atraviesen y transfieran su energía a la médula espinal subyacente. La reacción fotoquímica produjo la peroxidación de proteínas y ácidos grasos insaturados de la cara luminal del endotelio, estimulando la adherencia y agregación plaquetaria, resultando en la formación de un trombo y la subsiguiente obstrucción vascular e isquemia (Watson et al., 1986). En estudios posteriores se estudió las alteraciones neurológicas y funcionales producidas al aumentar el tiempo de fotoactivación (Prado et

al., 1987), así como se caracterizó, por medio de estudios con microscopía óptica y electrónica, la evolución temporal de la lesión inducida (Cameron et al., 1990, Bunge et al., 1994, Olby y Blakemore 1996).

Desde su aparición, se han desarrollado distintas variantes del procedimiento experimental, entre las cuales, las más notorias son las introducidas por Van Rempts and Borgers (1993) y por Madsen y colaboradores (1998). Van Rempts y colaboradores estudiaron los efectos desmielinizantes de los axones periféricos inducidos por la activación del rosa de bengala aplicado tópicamente sobre el nervio periférico. La exposición del nervio permitió el uso de una fuente de luz fría en vez de láser, ya que no era necesario atravesar ninguna estructura ósea. Los autores observaron la desmielinización de los axones y la infiltración masiva de células sanguíneas en el área de nervio lesionada fotoquímicamente. Por el otro lado, la lesión fotoquímica realizada por Madsen consistió en la inyección intravenosa del rosa de Bengala y su fotoactivación a través de la irradiación con una fuente de luz fría sobre la médula espinal expuesta (Madsen et al., 1998). La lesión producida en la médula, descrita como fototrombótica, consistió en la destrucción tisular de la mitad dorsal del parénquima medular.

No obstante, no hay en la literatura estudio alguno que caracterice los efectos producidos en la médula espinal al lesionarla fotoquímicamente por medio de la aplicación tópica de rosa de Bengala y la subsiguiente irradiación con una fuente de luz fría, lo que provoca una laguna conceptual y experimental para el uso y desarrollo de la lesión fotoquímica como herramienta experimental encaminada al estudio de la neuroprotección y regeneración de la médula espinal.

### 2.3 Características de las lesiones traumáticas

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 desatan un conjunto de sucesos bioquímicos que conllevan la expansión de la lesión y un aumento de la afectación tisular y funcional (Tator y Fehlings, 1991). Además, investigaciones recientes indican que los déficits producidos por una lesión son mayoritariamente generados por los mecanismos de la lesión secundaria. Además, y 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)

### 2.3.1 Las lesiones primarias

En función de la naturaleza de la agresión y de la respuesta morfológica y funcional de la médula espinal, las lesiones primarias pueden ser clasificadas en alguno de los siguientes mecanismos (Barbera, 1983):

**Contusión medular:** Es la aplicación brusca, intensa y transitoria de una fuerza que sobrepasa la capacidad plástica de la médula espinal. Por ejemplo, la fractura de la columna vertebral y la luxación vertebral son mecanismos característicos que producen una contusión en la médula espinal.

**Transección medular:** Es la interrupción anatómica, parcial o completa, de la médula espinal. Generalmente está provocada por la acción penetrante de un arma blanca, de un proyectil o por el desplazamiento violento de un fragmento óseo.

**Compresión medular:** Se produce por los mismos mecanismos que originan la contusión medular, pero a diferencia de ellos, la acción de la compresión persiste indefinidamente. Las causas más comunes que desembocan en estas lesiones son malformaciones del canal vertebral o la presencia de pequeños fragmentos óseos o discuales.

Otros mecanismos, menos comunes, son las hemorragias extramedulares y las lesiones radicales. La hemorragia extradural puede ser el resultado de una agresión poco severa que provoca la compresión medular, mientras que las lesiones radicales se desencadenan a partir de desgarros y disrupciones de las raíces de los nervios raquídeos.

La aplicación de cualquiera de estos mecanismos conlleva la afectación del parénquima medular y/o de la vasculatura que lo irriga. En consecuencia, tiene lugar una muerte necrótica, primordialmente de las células que constituyen la sustancia gris medular, formando una cavidad central rodeada por un ribete de tejido de sustancia blanca (Kakulas, 1984).

### 2.3.2 Las lesiones secundarias

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. Estos mecanismos incluyen: el shock neurogénico, estados de isquemia, edema, reperfusión, 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 shock 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. Donde los iones  $K^+$  dejan, durante un corto periodo de tiempo, de concentrarse masivamente en el espacio intracelular, para hacerlo en otros compartimentos, provocando un bloqueo de la conducción de los potenciales de acción (Young y Koreh, 1986). Paralelamente, y quizás en consecuencia de esta pérdida funcional, se desarrolla el shock neurogénico, donde la abolición de la actividad neuronal desencadena la pérdida de reflejos simpáticos, imposibilitando la rápida compensación de la pérdida de volumen sanguíneo producido 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. Esta hipoconstricción, conjuntamente con las alteraciones del funcionamiento de la circulación, produce un déficit del flujo sanguíneo tisular agravando la situación isquémica producida por la lesión (Guha y Tator, 1988).

Seguidamente, el descenso de oxígeno tisular desencadena una compleja cadena de procesos metabólicos que conducen a la muerte neuronal. En primer lugar, la situación anóxica aumenta las reacciones anaeróbicas de la célula en detrimento de las aeróbicas. Las consecuencias más tempranas son la producción de ácido láctico, responsable de acidificar el medio celular y la depleción de los niveles de ATP celulares. En consecuencia, las bombas iónicas dependientes de energía dejan de funcionar y provocan la despolarización de la neurona. La liberación masiva de glutamato y el desacople simultáneo de las bombas de glutamato de los astrocitos (Rossi et al., 2000) inducen al acúmulo de grandes cantidades de este neurotransmisor en el espacio extracelular, facilitando su unión a los receptores AMPA, kainato y NMDA de neuronas próximas. La activación de estos 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 de 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 resultará en el aumento de  $Ca^{++}$  citoplasmático, que afectará 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 de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular se ha denominado 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 varios mecanismos, al desarrollo de la lesión secundaria.

En este sentido, el aumento de  $\text{Ca}^{++}$  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. Éstos son átomos o moléculas que poseen un electrón desapareado 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 ( $\text{O}_2\bullet$ ) y los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ). 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 medio de la presencia de proteínas tamponadoras o antioxidantes mitocondriales. Ejemplos de éstas son la calbindina, la calmodulina y la parvalbúmina entre otras (Miller, 1995). En cambio, su aumentada concentración alcanzada tras una lesión, les hacen ser altamente tóxicos, puesto que reaccionan y degradan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que conllevan a la muerte celular (Pellegrini-Giampetro et al., 1990).

Por otra parte, el incremento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular activa una serie de proteasas y lipasas citoplasmáticas, como por ejemplo la fosfolipasa A2, la 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 conlleva la destrucción del citoesqueleto neuronal (Siman y Noszek, 1988). Además, el aumento de  $\text{Ca}^{++}$  activa endonucleasas  $\text{Ca}^{++}$  dependientes, dando lugar a la degradación de ácidos nucleicos con 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 las altas concentraciones intracelulares de iones  $\text{Ca}^{++}$  aumentan los niveles de ON citosólico. En el SNC lo sintetiza varios tipos celulares; las neuronas donde cumple un papel en los procesos de plasticidad sináptica, las células endoteliales donde realiza una modulación de la vasodilatación, y la microglía/macrófagos donde desempeña una función inmune. En las neuronas y en las células endoteliales la síntesis de ON está mediada por la óxido nítrico sintasa tipo I, que es un enzima de expresión constitutiva y cuya actividad depende de la calmodulina, que es cofactor  $\text{Ca}^{++}$

dependiente (Bredt y Snyder, 1990). En situación fisiológica la síntesis de ON está muy bien regulada y el ON producido no es por sí sólo neurotóxico. Pero tras una lesión, al producirse un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, se multiplica su producción, y éste a altas concentraciones reacciona con otras moléculas celulares y da lugar a elementos tóxicos. En este sentido, el ON reacciona con el superóxido para dar lugar al peroxinitrito (ONOO), compuesto que es altamente tóxico para la célula ya que oxida el DNA y los lípidos de la membrana (Lipton et al., 1993).

En cambio, en los macrófagos y las células de microglía, la síntesis de ON está mediada por la acción de la óxido nítrico sintasa inducible (tipo II), cuya actividad es independiente de  $\text{Ca}^{++}$ . Determinadas citoquinas, como el inteferón gamma, son capaces de activar este enzima (Xie et al., 1994). La síntesis inducible de ON está asociada a traumatismos y lesiones inmunológicas, y su alta concentración conlleva la peroxidación de las membranas celulares, así como al desarrollo de apoptosis de las células en la zona de lesión (Satake et al., 2000).

Otro de los fenómenos asociados con el aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, es la entrada de la célula en 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  $\text{Ca}^{++}$  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  $\text{TNF-}\alpha$  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 ON sintetizado por la microglía que concluye en la misma vía degradativa (Satake et al., 2000).

Además de la degeneración resultante del aumento de  $\text{Ca}^{++}$  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 (Siesjo et al., 1996), agrava el daño al DNA (Siesjo et al., 1996) y dificulta la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  (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 formes de la sangre. Asimismo liberan citoquinas proinflamatorias, tales como IL1, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , y factores quimioatrayentes, como las quimiocinas, que inducen al reclutamiento de células sanguíneas. En paralelo, expresan en su cara luminal moléculas de adhesión celular (p.e. ICAM-1 y VCAM-1), sobre las que interaccionan los correspondientes receptores de los neutrófilos y monocitos (LFA-1 y VLA-4 respectivamente), facilitando así la diapedesis 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 (Merrill y Benveniste, 1996). Esta infiltración de elementos formes 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 (Carlson 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 de catabolismo celular 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 los astrocitos y la microglía, con el propósito de proteger y reparar el daño producido en el parénquima medular, 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 autoinmunidad 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 por medio de la regulación del funcionamiento neuronal como el de la barrera hematoencefálica (Norenberg, 1998). Al producirse una lesión traumática de la médula espinal, los astrocitos cambian el patrón de expresión de una larga lista de genes 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. Uno de los efectos más relevantes en éstas células gliales es el aumento de mitocondrias, de retículo endoplasmático rugoso y la sobreexpresión de proteínas estructurales del citoesqueleto, en especial de GFAP (Petito et al., 1992). El objetivo del aumento del tamaño celular es doble, por una parte rellenar los espacios huecos generados por la muerte celular, y sobretodo, por 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, 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). Ramón y Cajal ya describió esta propiedad, y observó cómo los axones regenerativos se colapsaban o bien retrocedían al entrar en contacto con ella (Ramón y Cajal, 1928). Esta impermeabilidad se debe a la presencia de moléculas inhibitorias tanto en la superficie de las membranas celulares como de los componentes de la

matriz extracelular. Tiene especial relevancia la familia de los proteoglicanos, que en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado ser unos 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, hay autores que sugieren que los astrocitos juegan un papel preponderante en la potenciación y magnificación de la respuesta inflamatoria. Está ampliamente aceptado que en numerosas enfermedades del SNC, tanto degenerativas, autoinmunes, y 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- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , y RANTES, que inducen a 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 presentadoras de antígeno, 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), mientras que otros indican todo 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 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 media 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 proteolíticas, 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 el enzima proteolítico catépsina B/L que 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- $\alpha$  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 (Kettenman, 1990).

### **3. Factores que impiden la restauración funcional del sistema nervioso central**

A diferencia del resto de tejidos del organismo, una lesión del SNC es irreparable, ya que directa e indirectamente se activan un conjunto de mecanismos que dificultan y reducen la remodelación y reestructuración eficiente del sistema, conduciendo, en último lugar, a la pérdida de las facultades neurológicas del individuo.

Las causas que originan esta limitada regeneración neural son de diferente índole y naturaleza. En primer lugar, las neuronas dañadas por la lesión son difícilmente remplazadas por nuevas neuronas, de tal modo que la muerte de grandes poblaciones neurales va irrevocablemente acompañada de la pérdida crónica de la función que desempeñan. Aunque se haya constatado la continua generación de neuronas en el SNC del individuo adulto (Lois y Alvarez Buylla, 1993, Cameron et al., 1993), los datos obtenidos hasta la fecha constatan que esta proliferación y diferenciación son insuficientes para reparar las zonas lesionadas sin que sean por sí sola una vía eficaz para el restablecimiento de la estructura y función neural. (Rossi y Cattaneo, 2002)

En segundo lugar, la lesión induce a las células gliales del SNC a entrar a un estadio de reactividad, donde no sólo van a intervenir en los procesos de degeneración tisular sino que también van a participar activamente en el impedimento del crecimiento de los axones dañados.

Este papel inhibitorio desarrollado por las células gliales del SNC ya fue descrito en los pioneros trabajos realizados por Ramón y Cajal y su discípulo Tello a principios del pasado siglo, quienes experimentalmente evidenciaron que, a diferencia del SNC, el microambiente producido por el SNP era favorable para la regeneración de axones centrales, y propusieron que esta situación podía ser debida a la síntesis de factores quimiotrópicos y neurotrópicos por parte de las células del SNP (Ramón y Cajal, 1928). Medio siglo después, Alberto Aguayo y sus colaboradores, retomaron los planteamientos iniciados por Ramón y Cajal, y en diferentes modelos experimentales replicaron los resultados obtenidos anteriormente, demostrando que el transplante de piezas de nervio periférico permitía la

regeneración de los axones centrales al interior del injerto (Richardson 1980, David et al., 1981, Benfey et al., 1982). Estudios posteriores demostraron que el ambiente glial del SNC desarrollado tras una lesión no es sólo pobre en factores de crecimiento sino que además presenta componentes que inhiben el crecimiento (Schwab y Thoenen, 1985)

Por último, los axones de las neuronas centrales, a diferencia de los axones del SNP, presentan una menguada capacidad de crecimiento. Situación que agrava el pobre soporte regenerativo aportado por las células gliales y que, en último término, impide la reconexión del circuito.

En este sentido, los recientes trabajos de Neumann y Woolf (1999) muestran que al realizar una lesión de la médula espinal, los axones sensoriales de las raíces dorsales crecen a través de la lesión si previamente se ha realizado una lesión condicionante de las mismas neuronas, por medio de la sección de la rama periférica del axón de éstas (Neumann y Woolf, 1999). Estos trabajos ponen al descubierto que las propiedades intrínsecas de las neuronas dictan su respuesta ante los factores inhibitorios del CNS, y dejan de manifiesto que no sólo el ambiente glial es el responsable de limitar el crecimiento axonal sino que además el estado y las características propias de las neuronas intervienen activamente en las capacidades de regeneración.

### 3.1 Factores limitantes extrínsecos a las neuronas

Además de las limitaciones intrínsecas de las neuronas, el ambiente extracelular producido tras la lesión dificulta enormemente la reducida capacidad de crecimiento axonal. La alteración morfológica y funcional de las células gliales, tanto en la zona de lesión como en regiones distales a ésta, se pone de manifiesto con la expresión de moléculas de superficie inhibitorias a la elongación axonal (Qiu et al., 2000) y por la ausencia de síntesis de factores tróficos promotores del crecimiento axonal (Widenfalk et al., 2001).

En el hipotético caso que las neuronas supraespinales pudieran hacer crecer sus axones, éstos tendrían que superar dos grandes obstáculos; atravesar la cicatriz glial formada en la zona de lesión, y a continuación, navegar a través del parénquima medular caudal hasta finalmente sinaptar con sus células diana.

#### 3.1.1 La cicatriz glial

La cicatriz glial formada tras una lesión, es una de las barreras infranqueables que los axones tendrían que atravesar para poder extenderse a lo largo del parénquima medular caudal a la lesión. La naturaleza inhibitoria de la cicatriz glial es conocida desde hace tiempo. Ramón y Cajal ya describió el colapso y retracción de los brotes axonales al no poder atravesarla (Ramón y Cajal, 1928). Inicialmente, se concluyó que la cicatriz glial actuaba como una barrera física, insuperables para los

axones en crecimiento (Berry et al., 1983), pero estudios más recientes han revelado que su carácter inhibitorio viene dado por la presencia de moléculas de superficie, tanto en las membranas de las células que la componen como de la matriz extracelular que las envuelve, que ejercen una función inhibitoria y bloqueadora para el crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999).

La cicatriz glial es una malla de células altamente interdigitadas y envueltas por una matriz extracelular, de detallada estructura. Se desarrolla rápidamente después de la lesión y su formación madura se alcanza a las dos semanas. Celularmente está constituida por neutrófilos y macrófagos provenientes del torrente sanguíneo, microglía y astrocitos que proliferan en la misma zona lesionada y que también migran desde otros puntos del SNC, oligodendrocitos y sus precursores y células endimarias (Fawcett y Asher, 1999).

La identificación y purificación de las moléculas de la cicatriz glial que limitan regeneración neuronal ha recibido la atención de muchos investigadores. Hasta el momento, estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han revelado la presencia de dos grandes familias de moléculas inhibitorias; los proteoglicanos, que incluyen los versican, neuroacan, NG2, phosphocan y los chondritin sulphates, y en menor medida las tenascinas.

El papel inhibitorio desarrollado por los proteoglicanos fue evidenciado en los inicios de los años 90 por los trabajos realizados por Rudge y Silver (1990), quienes relacionaron el aumento de expresión de estas glicoproteínas con el bloqueo del crecimiento de las neuritas. Posteriormente, en una serie de experimentos realizados por Davies y colaboradores (1997, 1999) se puso de manifiesto el papel tan relevante que desempeñan en la inhibición del crecimiento. En el primer experimento, inyectaron células purificadas de las raíces de los ganglios dorsales en el cuerpo caloso. El trasplante se realizó de forma muy cuidadosa por medio de inyecciones con presión de aire, resultando ser atraumático. En esta situación, donde no se produjo afectación del parénquima nervioso, ni por tanto reactividad glial, los axones de las células transplantadas crecieron a lo largo de los tractos mielinizados, y sólo en aquellos donde el trasplante había alterado ligeramente la estructura nerviosa y donde los astrocitos, reactivos, habían expresado proteoglicanos las neuritas neuronales se colapsaban y no se extendían (Davies et al., 1997). En un segundo experimento, llevaron a cabo una lesión en la médula espinal y rostral, inyectando el mismo tipo de células que en el experimento anterior. Por medio del estudio inmunohistoquímico observaron cómo las neuronas transplantadas proyectaban y extendían neuritas a lo largo del eje longitudinal de la médula, y que éstas se colapsaban al topar con la cicatriz glial formada tras la lesión medular (Davies et al., 1999). Los resultados de estos trabajos ofrecieron dos conclusiones de gran relevancia; 1) La cicatriz glial por medio de la expresión de las moléculas de superficie constituye una barrera infranqueable para los axones en crecimiento. 2) Los axones de las

células de las raíces dorsales transplantadas han sido capaces de crecer a través de tractos mielinizados intactos y lesionados sin que hayan inducido al colapso o retracción axonal. De ello se deduce que los factores inhibitorios presentes en la mielina intacta y más aún en la mielina alterada por la lesión no actúan de la misma manera ante todas las poblaciones celulares.

El modo mediante el cual los proteoglicanos inhiben el crecimiento aun está por descubrir. Hasta el momento, se ha descrito que la actividad inhibitoria puede estar mediada por sus cadenas GAG o por la propia estructura de la proteína (Dou y Levine 1994, Chen et al., 2002). Los mecanismos transductores de la señal inhibitoria evocados por el contacto del cono de crecimiento con los proteoglicanos son desconocidos, pero investigaciones recientes muestran que en este proceso participa Rho (Dergham et al., 2002).

### 3.1.2 Moléculas inhibitorias de la mielina

Uno de los avances más notorios en la búsqueda de terapias regenerativas, y que más expectación ha generado, ha sido la identificación de diferentes componentes de las membranas de los oligodendrocitos como factores bloqueantes del crecimiento axonal. El papel inhibitorio llevado a cabo por los oligodendrocitos se ha evidenciado en un gran número de experimentos.

Tanto en estudios de lesión como de desarrollo del SNC, la presencia de oligodendrocitos maduros y diferenciados coincide con la restricción o limitación del crecimiento axonal. De esta manera, se ha observado que la naturaleza inhibitoria de los oligodendrocitos, y de la mielina que sintetiza, no se manifiesta exclusivamente tras lesionar el SNC ya que es una propiedad inherente de este tipo celular.

Sin embargo, hay que resaltar que existen diferencias importantes entre la mielina intacta (no lesionada) y la dañada, ya que en las membranas más periféricas, se han identificado proteínas que promueven el crecimiento de las neuritas (Myelin-associated glycoprotein). Es por ello que no es de extrañar el crecimiento axonal que encontró Davies al transplantar DRG cells en una médula espinal intacta (Davies et al., 1997). La lesión de la médula espinal produce ineludiblemente la afectación de la mielina y la exposición de moléculas inhibitorias para el crecimiento axonal, que normalmente no estarían expuestas (Qiu et al., 2000).

En esta línea destacan los trabajos llevados a cabo por el grupo de Martin Schwab, que a lo largo de los últimos 15 años, ha identificado y caracterizado componentes de membrana plasmática de los oligodendrocitos, responsables de inducir un potente colapso del brote axonal concretamente en la proteína inicialmente bautizada con el nombre de IN-250 y posteriormente identificada como NOGO-A (Caroni y Schwab, 1988). Ésta es uno de los tres productos generados a partir del splicing alternativo del gen que recibe el mismo nombre (Chen et al., 2000). NOGO-A es una proteína transmembranal,

que se localiza tanto en la superficie de los oligodendrocitos (Chen et al., 2000), como en las caras internas y externas de la mielina (Huber et al., 2002). Presenta dos dominios capaces de generar el bloqueo de los axones. El primero es el loop ubicado en el espacio extracelular (NOGO-66), y el segundo dominio próximo al extremo N-terminal (Amino-Nogo). Este último sólo es inhibidor cuando está expuesto al espacio extracelular como, por ejemplo, cuando la lesión daña la estructura de la mielina, ya que su presencia en el espacio intracelular no ejerce ninguna función bloqueadora. Aparte de generar una función bloqueadora, el extremo amino-Nogo induce la astrogliosis y la formación de la cicatriz glial, agenciándose un papel indirecto en la inhibición del crecimiento (David y Lacroix, 2003). NOGO actúa a partir de su unión a un receptor presente en el cono de crecimiento axonal. Este receptor es en realidad un complejo formado por varias proteínas entre las que destacan las de anclaje (GPI), y la p75<sup>ntr</sup>, que es la responsable de traducir la señal inhibitoria evocada por la unión de NOGO-66 (Fournier et al., 2001). El receptor de Amino-Nogo aún está por descubrir.

Además de Nogo, en la superficie de los oligodendrocitos y en las caras de la mielina se han caracterizado y purificado otras señales que ejercen también un papel bloqueante del brote axonal. De todas éstas destacan la proteína MAG (McKerracher et al., 1994) y la recientemente identificada OMgp (Wang et al., 2002). MAG es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que posee funciones adhesivas e inhibitorias a la vez. Esta dualidad funcional pone de manifiesto que durante el desarrollo, MAG promueve el crecimiento axonal de fibras inmaduras pero lo impide a las fibras ya maduras (Cai et al., 2001), sugiriendo que los receptores de MAG se expresan en la madurez del SNC. MAG induce el bloqueo del crecimiento axonal por medio del colapso del cono de crecimiento axonal (Song et al., 1998). Tras una lesión del SNC se pueden liberar por medio de la previa proteólisis fragmentos solubles de MAG, los cuales ejercen también un papel inhibitorio (Tang et al., 1997) MAG comparte con Nogo-66 el receptor (NGR+p75<sup>ntr</sup>) (Liu et al., 1999). OMgp se encuentra tanto en la superficie de los oligodendrocitos como en la mielina y posee al mismo tiempo capacidades inhibitorias de crecimiento de las neuritas como inducen al colapso del cono de crecimiento.

La naturaleza y la función de los segundos mensajeros neuronales que, en último término, son las efectoras de producir el crecimiento y colapso del cono de crecimiento están aun pobremente entendidos. Variaciones en las concentraciones de Ca<sup>++</sup>, la actividad de familia de proteínas GTPasas Rho, y los AMP y GMP cíclicos están adquiriendo protagonismo en el desarrollo del comportamiento del cono de crecimiento. Ha quedado constatado desde hace tiempo que cambios en la concentración de Ca<sup>++</sup> afectan a la motilidad del cono de crecimiento (Connor, 1986). Así, por ejemplo, en el colapso inducido por la unión de NOGO-A y su receptor hay previamente un aumento del Ca<sup>++</sup> intracelular (Bandtlow et al., 1993). En la familia de GTPasas Rho están incluidas las proteínas RhoA, Rac1 y

Cdc42, cada una de las cuales está implicada en los procesos de retracción o extensión del cono de crecimiento, induciendo cambios en la estructura del citoesqueleto (Hall, 1988). De esta forma, Cdc-42 y Rac promueven el crecimiento de las neuritas y la atracción del cono de crecimiento por medio de la polimerización de la actina -F en los lamelopodios y filopodios, mientras que Rho produce el colapso y repulsión del cono de crecimiento por medio de la despolimerización de la actina. Por último, progresivamente se van acumulando más evidencias del papel pivote que los AMP y GMP cíclicos desempeñan en los conos de crecimiento. De tal manera que, dependiendo de los niveles intracelulares de AMPc, la respuesta atractora o retractora de las neuritas varía, favoreciendo la extensión la presencia de altas concentraciones y la repulsión lo contrario (Song et al., 1997, 1998).

### 3.1.3 Moléculas de señalización durante el desarrollo

A lo largo del desarrollo embrionario y durante las fases más tempranas de la vida postnatal del individuo se establece un entrecruzado patrón de conexiones neuronales. Es necesario que durante la formación de esta circuitería neuronal exista un sistema de señales que permitan guiar eficazmente al axón en crecimiento hacia su diana correspondiente. Para conseguir este propósito, a lo largo del desarrollo, se expresan un conjunto de moléculas que atraen o repelen al cono axonal, determinando la motilidad, el crecimiento y la dirección de éste para alcanzar la célula con la que ha de sinaptar (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Hasta la fecha, se han caracterizado un gran número de familias moleculares que desempeñan esta función quimiotáctica, y se han descrito cuatro mecanismos básicos de acción involucrados en el crecimiento de axonal; por contacto o a distancia, y en cada caso pudiendo ser por repulsión o por atracción. Las lamininas, tenascinas, CAMs, cadherinas, ephrinas, semaforinas slits, entre otras, son familias de moléculas que juegan un papel preponderante en la función quimiotáctica del cono de crecimiento (Mueller, 1999). Después de una lesión, muchas de las moléculas inhibitorias que se expresaron durante el desarrollo lo vuelven a hacer, propiciando un ambiente inhibitorio. Por ejemplo, la semaforina 3A o efrinas EPHse expresa en la cicatriz glial (Pasterkamp, 1999, Miranda et al., 1999).

### 3.2 Factores limitantes intrínsecos a las neuronas

Los axones periféricos, independientemente de la distancia del soma celular a la que se haya producido la axotomía muestran una capacidad de crecimiento vigorosa, parcialmente potenciada por el soporte trófico y físico de las células de Schwann (Bunge, 1994). Además, las neuronas expresan proteínas asociadas al crecimiento (GAPs) esenciales para la plasticidad, la elongación y la regeneración de los axones periféricos. Son proteínas estructurales del citoesqueleto, como actina y tubulina (Bisby y Tetzlaff, 1992), y proteínas reguladoras del crecimiento, como la GAP-43 que

intervienen en el proceso de control y elongación del cono de crecimiento axonal (Benowitz y Routtenberg, 1987). Por el contrario, las neuronas centrales no muestran la misma predisposición para crecer. En primer lugar, dada la gran heterogeneidad de poblaciones neurales hay unas que presentan más capacidades regenerativas que otras (Fawcett, 1992). No obstante, todas tienen en común que si la lesión del axón es distal al cuerpo celular de la neurona, presentaran bajos niveles de expresión de GAP-43 (Skene, 1984).

#### **4. Estrategias promotoras de la regeneración neural**

La preservación y regeneración del SNC va a depender de la presencia y ausencia de una gran multitud de factores. Algunos de ellos actúan en detrimento mientras que otros lo hacen en promoción de la regeneración neural, y el resultado final dependerá del lado hacia el cual se incline la balanza (Fawcett, 1997).

El hallazgo de una terapia que permita restablecer la función del SNC no va a ser trivial. Para abordar con éxito la recuperación funcional de la médula espinal, hay una serie de objetivos que se han de alcanzar escalonadamente. En primer lugar, después de una lesión se ha de potenciar la supervivencia neural, ya sea de las neuronas medulares como de las neuronas cuyo soma celular está ubicado en los centros superiores, del tronco del encéfalo, de la corteza, y de las raíces dorsales. Esto se consigue por medio de la inhibición y atenuación de todas las cascadas degenerativas que conforman la lesión secundaria (Dumont et al., 2001), así como de la prevención de la atrofia y pérdida de las facultades regenerativas de las neuronas supraespinales (Kobayashi et al., 1997).

Una vez que las neuronas supraespinales han sobrevivido y han mantenido las capacidades suficientes para elongar sus axones, el siguiente paso consiste en conseguir que sus axones regenerativos atraviesen la cicatriz glial que sella la lesión. Y por último, que los axones regenerativos crezcan a lo largo del parénquima medular caudal a la lesión hasta sinaptar con sus respectivas células diana, para finalmente formar sinapsis funcionales con ésta y restablecer la circuitería medular (Horner y Gage, 2000).

No obstante, la restauración de la circuitería medular no implica una reformatión de todo el parénquima medular dañado, ya que si tan sólo se consiguiera la preservación o regeneración de, aunque sólo fuera un pequeño número de fibras, se mejoraría considerablemente la respuesta funcional de los pacientes (Nathan, 1994). La presencia de centros generadores del patrón de locomoción en los engrosamientos cervical y lumbosacro, responsables en último término, de ejecutar los comandos motores han mostrado tener una parcial independencia de los centros de control supraespinal, abriendo la posibilidad de intentar reconectar, aunque con pocos axones fuera, algún centro de control superior

con estas complejas redes moduladoras y efectoras del movimiento. Una vez el axón supraespinal sinptara con las neuronas centrales del patrón generador de la locomoción, y en consecuencia de la plasticidad morfológica y funcional que el SNC posee, se daría una reestructuración de la circuitería espinal con el subsiguiente restablecimiento del control sensiomotor del paciente (Bregman 1998, Freed 2000).

Con el objetivo de conseguir el mantenimiento y recuperación funcional del SNC dañado, se han diseñado distintas estrategias experimentales con el propósito de proteger y promover la viabilidad, el funcionamiento y la regeneración de las neuronas centrales.

#### 4.1 Neuroprotección

El término neuroprotección engloba a todas aquellas estrategias terapéuticas que tienen como finalidad mitigar los efectos de la lesión secundaria y así proteger al sistema nervioso del aumento y expansión de la lesión.

Actualmente existe un gran número de compuestos farmacológicamente activos que han dado experimentalmente excelentes resultados, reduciendo la expansión de la lesión por medio de la actuación sobre diferentes compuestos o reacciones lesivas. Ejemplos de estos fármacos son los anti-inflamatorios, como la metilprednisolona o el gangliósido GM1, los inhibidores de la peroxidación lipídica, como el tirilazad mesilato, los secuestradores de radicales libres, como las vitaminas A y C o la PBN ( -fenil-n-tert-butilnitrona) , los anti-excitotóxicos como la gaciclidina, la memantina o el MK-801, así como los moduladores del metabolismo del ácido araquidónico (Dumont et al., 2001, Legos et al., 2002).

No obstante, de todos ellos son muy pocos los que han llegado a las fases más avanzadas de los ensayos clínicos. Las causas responsables de esta discordancia están siendo ampliamente investigadas, y se propone que las variables intrínsecas a la especie animal, modelo experimental así como la metodología experimental desarrollada sean las causantes de tal disparidad (Keyser et al., 1999).

La metilprednisolona y el gangliósido GM1 son, actualmente, los únicos fármacos que se administran a los pacientes, ya que ejercen un efecto nueroprotector sobre la médula lesionada, favoreciendo su posterior recuperación funcional. La metilprednisolona es un derivado glucocorticoide que actúa eliminando radicales libres de oxígeno, inhibiendo la peroxidación de lípidos y disminuyendo la actividad inflamatoria. Los efectos promotores de la recuperación funcional que ejerce han sido documentados en animales de experimentación tras su administración (Oudega et al., 1999) o combinación con injertos celulares (Chen et al., 1996, Nash et al., 2002) La evaluación de los efectos tras su administración en lesionados medulares ha sido llevada a cabo a partir de varios ensayos clínicos multicéntricos (National Acute Spinal Cord Injury Study, NASCIS). El primer estudio sobre

las lesiones agudas de la médula espinal comenzó en 1979 y su objetivo fue comprobar si la administración de dosis altas de metilprednisolona disminuía el desarrollo de lesiones secundarias. Para ello, se administraron 48 horas después de la lesión dosis bajas (100mg) o altas (1000mg) del fármaco a pacientes con lesiones medulares incompletas. A pesar de que los resultados no fueron concluyentes, se apreció una tendencia a la mejora en los pacientes tratados con dosis altas (Bracken et al., 1984). A partir de las críticas que surgieron se desarrolló el segundo estudio nacional que se llevó a cabo entre 1985 y 1989. Los resultados obtenidos mostraron que la administración de una dosis alta de metilprednisolona (30mg/kg) dentro de las ocho horas postlesión y mantenidas durante 24 horas mejoró significativamente la recuperación neurológica de los pacientes (Young et al., 1992). En el mismo estudio se valoró el efecto de la administración de naloxona, un antagonista opiáceo, sin encontrar ningún efecto positivo sobre la recuperación del lesionado. En 1997 se publicaron los resultados del tercer estudio NASCIS. Es éste se evidenció, de nuevo, el efecto neuroprotector ejercido por la administración de dosis altas del fármaco en una ventana temporal muy corta después de la lesión (Bracken et al., 1997). Asimismo se demostró la ineficiencia de la administración de mesilato de tirilazad, un bloqueador de radicales libres, ya que su administración no supuso ninguna mejora a los pacientes.

El segundo fármaco que ha llegado a la última fase clínica el gangliósido Monosialico (GM1). Se ha considerado que disminuyen el daño sobre el tejido del SNC impidiendo la excitotoxicidad inducida por el glutamato (Constantini y Young, 1994). La administración de este fármaco a dosis de 100 mg/día iniciado a las 48-72 horas después del accidente y continuado durante 18-32 días mejoraba la recuperación funcional de los pacientes (Geisler, 1991). No obstante, en un estudio más reciente pone en duda su aplicabilidad, ya que no ha demostrado concluyentemente que produzca ningún beneficio en los pacientes tratados (Hall, 1992).

En el estudio NASCIS-2 también se ha valorado los efectos de la administración de tirilazad mesilato, observándose un efecto similar a la metilprednisolona (Bracken et al., 1997). Este fármaco ejerce un papel anti-peroxidación lipídica por dos mecanismos, son secuestradores de radicales libres superóxido e hidroxilo, a la vez que son estabilizadores de las membranas biológicas, ya que se incorporan a ellas evitando el ataque de estos radicales libres (Kavanagh y Kam, 2001).

#### 4.2 Potenciación de las capacidades regenerativas intrínsecas de las neuronas centrales

La incapacidad de las neuronas centrales no sólo es debida a la ausencia de factores tróficos y a la presencia de factores inhibitorios para el crecimiento axonal sino que también depende de su propio estado regenerativo. Así por ejemplo, la activación de las vías de AMPc supone que los axones conviertan el efecto repulsivo de MAG en atractivo, permitiendo el crecimiento a lo largo de la mielina

(Song et al., 1998, Cai et al., 2001). Estudios recientes han demostrado que la administración de una única dosis de dibutiril AMPc (un análogo permeable del AMPc) permitió a los axones sensoriales de las columnas dorsales atravesar la zona de lesión y crecer caudalmente unos pocos milímetros (Neumann et al., 2002). Esta estrategia no está ausente de críticas y dificultades ya que el AMPc desempeña una gran variedad de funciones celulares y tanto la concentración como la frecuencia de administración puede, en según que situaciones, ser más perjudicial que beneficiosa.

Paralelamente, estudios *in vitro* han permitido establecer el papel desempeñado por la familia de GTPasas Rho en la dinámica del citoesqueleto (Mithchinson y Kirschner, 1988). Rho puede ser específicamente inactivada por C3, que es una transferasa bacteriana (Jalink et al., 1994), su tratamiento promueve el crecimiento de neuritas *in vitro*, en un substrato inhibitorio formado por mielina (Jin y Strittmater, 1997) o proteoglicanos (Winton et al., 2002). También se ha valorado *in vivo*, y los resultados obtenidos han mostrado la promoción de la regeneración junto con la neuroprotección que induce (Derghamm, 2002).

Está ampliamente aceptado, que la administración de factores tróficos promueve tanto la supervivencia neuronal como el crecimiento axonal. La administración intratecal de NGF (Bowes et al., 2000), BDNF o CNTF (Ye y Houle, 1997, Houle y Ye, 1999) atenúan los déficits funcionales observables tras una lesión medular, a la vez que promueven la supervivencia neuronal y la regeneración axonal. La infusión de NT-3 promueve el crecimiento de fibras mielínicas sensoriales después de una lesión por compresión de las columnas dorsales (Bradbury et al., 1999), mientras que la inyección directa de diversos factores neurotróficos (BDNF, NT3, NT4, CNTF) en la zona de lesión también favorece la regeneración axonal (Bregman et al., 1997). Otro método de administrar los factores neurotróficos es la utilización de células modificadas genéticamente para la expresión de un determinado factor. Así, el trasplante de fibroblastos genéticamente modificados para la expresión de BDNF (Liu et al., 1999) promueven la regeneración de axones rubroespinales y la recuperación funcional motora. También los fibroblastos modificados genéticamente para la expresión de NT3 y BDNF promueven la proliferación de oligodendrocitos y la remielinización de los axones regenerativos tras una contusión de la médula espinal (McTigue et al., 1998).

#### 4.3 Bloqueo de los componentes de la cicatriz glial

Para erradicar la cicatriz glial, una de las opciones es eliminar a las células que la componen. El mayor inconveniente de esta estrategia es que no existe un único tipo celular que inhiba la regeneración, sino que la mayoría de células que la componen oponen resistencia al crecimiento axonal. Debido a esto, las estrategias tendrían que ir dirigidas a la eliminación de una gran población

celular. Para ello se ha utilizado la irradiación con rayos X (Ridet et al., 2000) o el uso de bromuro de etidio, el cual se une al DNA, dañándolo y produciendo la muerte celular (Moon et al., 2000). En ambos casos la ausencia de células gliales ha favorecido la regeneración axonal. No obstante, esta terapia parece poco factible en el sentido que magnifica la lesión producida. En otro modelo experimental, se estudió la ablación selectiva de astrocitos en una cepa de roedores transgénica, donde el producto tóxico de un gen tenía como promotor a la secuencia promotora del GFAP (Bush et al., 1999). De tal manera que al lesionar el SNC, la hipertrofia astrocitaria fue acompañada de la sobreexpresión de GFAP y también del producto tóxico que les llevó a la muerte. Este experimento pone de relieve las múltiples funciones que juegan los astrocitos, ya que así como se generó un ambiente propicio para la elongación axonal, también fueron generados una serie de déficits, tales como la disfunción de la barrera hematoencefálica o la infiltración masiva de células sanguíneas. Otra estrategia es el uso de toxinas específicas para determinadas células gliales. Por ejemplo, la administración de L-alpha-amino-adipate (L-AAA) específicamente induce la muerte de astrocitos, pero no de neuronas. Su aplicación permite tener durante un corto periodo de tiempo un ambiente libre de astrocitos, generando un ambiente favorable para el crecimiento axonal (Khurgel, 1996). Otra línea de investigación menos agresiva es la atenuación del desarrollo de la astrogliosis. En este caso, se busca inhibir a los factores responsables de desencadenar y estabilizar el desarrollo de la cicatriz glial. Por ejemplo, el factor TGF-beta-1, es un potente inductor de la astrogliosis y su administración en el SNC induce a una aumentada reactividad glial. La aplicación de su anticuerpo, bloquea su acción por lo que se reduce la expresión de moléculas de la cicatriz glial (Logan et al., 1999). En esta misma línea se ha intentado potenciar la aplicación de moléculas antiinflamatorias como IL-10 (Balasingam y Yong, 1996).

No sólo las células gliales que conforman la matriz presentan moléculas inhibitorias para el crecimiento. La matriz extracelular, formada por la secreción de proteínas de las células de la cicatriz, también presentan un gran número de estas moléculas. Es por ello que existen diferentes estrategias que buscan neutralizar sus efectos. Una aproximación se basa en interferir en la síntesis de estos componentes. Sirva como ejemplo la beta-xilosidasa, un fármaco que inhibe la síntesis de proteoglicanos. Tras su administración, se genera un ambiente libre proteoglicanos por lo que aumenta la permisividad para el crecimiento axonal (Smith-Thomas et al., 1995). Resultados similares se han obtenido al administrar fármacos que inhiben el ensamblaje de las cadenas individuales de procolágeno para formar colágeno (Stichel et al., 1999). Otra estrategia alternativa, que ha conseguido muy buenos resultados, es la degradación enzimática. Experimentos *in vitro* como *in vivo* han puesto de manifiesto que la administración tópica de la condroitinasa ABC degrada parcialmente los proteoglicanos, generando un ambiente favorable para la extensión de las neuritas y axones respectivamente (Zuo et al.,

1998, Bradbury et al., 2002). A diferencia de las proteínas inhibitorias de la mielina, el bloqueo con anticuerpos de los proteoglicanos ofrece muchas dudas, ya que estas moléculas participan en una gran variedad de funciones en el SNC. Sería necesario la producción de anticuerpos específicos contra cada uno de los distintos componentes de esta familia molecular.

#### 4.4 Neutralización de los efectos bloqueantes de la mielina

A partir de la identificación de las glucoproteínas Nogo, MAG y OMgp como componentes inhibitorios de la mielina, el hecho de que las tres utilicen el mismo receptor p75<sup>ntr</sup> en el cono de crecimiento y al creciente conocimiento de las vías responsables de la transducción de la señal evocadas tras la unión de ligando-receptor, se está desarrollando una gran variedad de estrategias experimentales que persiguen la neutralización de estas moléculas inhibitorias con el subsiguiente ensalzamiento de la regeneración axonal.

La primera estrategia desarrollada fue el uso de anticuerpos (IN-1) que reconocen la proteína Nogo-A. Su aplicación tanto *in vitro* (Caroni y Schwab, 1988) como *in vivo* (Schnell y Schwab 1990, Bregman et al., 1995) bloqueó el efecto inhibitorio de NOGO-A y permitió el crecimiento de neuritas y axones respectivamente.

Los estudios *in vivo* consistieron en seccionar selectivamente el tracto corticoespinal de la médula espinal y paralelamente inyectar en la corteza frontoparietal células hibridoma productoras y secretoras del anticuerpo IN-1. Éstos se difundieron por el parénquima cortical, entraron en el flujo del líquido cerebroespinal para finalmente llegar al segmento medular lesionado. Tres semanas después, los axones corticoespinales atravesaron la zona de lesión mayoritariamente circunvalándola por zonas laterales preservadas. No obstante sólo los animales productores de IN-1 presentaron axones corticoespinales regenerativos que se extendieron caudalmente varios milímetros de la lesión. Por el contrario, en los animales control (con un injerto de células hibridomas no productoras de IN-1) los axones no se extendieron más de un milímetro de la zona de lesión (Schnell y Schwab, 1990). No obstante, el número de axones regenerativos fue bajo, seguramente debido a la acción inhibitoria de los otros componentes bloqueantes de la mielina. Estudios posteriores, mostraron que el bloqueo de Nogo-A permitía la regeneración de no sólo de axones corticoespinales si no también de axones del tronco del encéfalo, y que este crecimiento axonal iba acompañado de la recuperación funcional de los animales (Bregman et al 1995, Merkler et al 2001).

El bloqueo de IN-1 permite la regeneración de axones lesionados e induce a cambios plásticos de los axones no afectados tras la lesión. En una serie de experimentos Raineteau realizó una piradotomía bulbar y observó que el bloqueo de NOGO-A permitía la ramificación de axones

rubroespinales intactos, que fue acompañada de un aumento de las funciones motoras de los animales. Estos experimentos ponen de relieve la capacidad de NOGO-A de inhibir tanto el crecimiento de axones regenerativos como de colaterales de axones no afectados, por lo que su bloqueo permite el crecimiento de ambos y la restitución de parte de las funciones motoras (Thallmair et al., 1998, Raineteau et al 2001)

Pese a esto, la presencia de más moléculas inhibitorias en la mielina implica que el bloqueo de la actividad de Nogo sea insuficiente para permitir el crecimiento axonal. Sería necesario la combinación de diferentes fármacos o anticuerpos para bloquear la actividad de todas las moléculas inhibitorias. Por otro lado, el hecho que todas éstas se unan a un mismo receptor del cono de crecimiento da pie a un abordaje alternativo, donde la diana terapéutica fuese la inactivación de tales receptores. Esta ha sido, por ejemplo, la estrategia desarrollada en las investigaciones de GrandPré y colaboradores (2002), quienes bloquearon el receptor con un fragmento proteico de NOGO-A. Al administrar este fragmento a roedores con una hemisección torácica, observó la extensión de los axones corticoespinales varios milímetros por debajo de la lesión.

El uso de moléculas bloqueantes supone la necesidad de tener un sistema que permite la síntesis y secreción continua de tales moléculas. El método original del transplante de células híbridomas no está exento de críticas, por lo que han surgido técnicas alternativas de administración, como es el caso del uso de mini-bombas que inyectan periódicamente bolos del bloqueante (Brösamle et al., 2000) o, más recientemente, el desarrollo de inducir la inmunidad contra tales moléculas, por medio de la vacunación (Huang et al., 1999)

En otro orden de cosas, se han desarrollado extensos trabajos para inhibir la acción de MAG. Estudios *in vitro* han revelado la acción inhibitoria de MAG, y la administración de bloqueadores ha resultado en el crecimiento de las neuritas. En cambio, los estudios realizados *in vivo* son controvertidos, ya que lesiones en roedores “knock out” para el gen de MAG, no se ha observado un aumento en el crecimiento axonal, seguramente debido en parte, a la presencia de los demás inhibidores de crecimiento (Bartsch et al., 1995). Es necesario el estudio comparativo de la inhibición parcial ejercida por cada molécula en concreto. Estudios realizados *in vitro* han mostrado que ambas proteínas desarrollan actividades equivalentes (Prinjha et al., 2000). No obstante, es imprescindible que en el futuro se desarrollen modelos animales “knock out” para Nogo y comparar de nuevo los resultados.

#### 4.5 Modulación del ambiente glial: el transplante celular

El trasplante celular es una de las aproximaciones experimentales que más desarrollo y expectativa ha generado en los últimos años. No sólo por la infinidad de funciones que el injerto celular puede desempeñar en el tejido nervioso lesionado, si no además por el gran abanico de tipos celulares que se pueden utilizar y la extensa naturaleza de patologías nerviosas a las que se puede aplicar. En este sentido diferentes tipos celulares tales como las células de Schwann, precursores de oligodendrocitos y de astrocitos, células de la médula adrenal, tejido fetal, células madre, macrófagos y microglía reactiva, células serotoninérgicas, fibroblastos modificados genéticamente, y por supuesto glía envolvente han sido transplantadas en diferentes paradigmas experimentales de lesión medular. En la mayoría de los estudios realizados, el trasplante celular promueve en cierta forma la regeneración, remielinización o preservación de los axones centrales con la subsiguiente mejora funcional del animal.

El objetivo principal del trasplante celular es que éstas desempeñen alguna o varias de las funciones siguientes, por lo que promoverían tanto la protección como la regeneración neural.

1) El injerto celular podría funcionar como una estación de relevo entre las estructuras supraspinales y los núcleos medulares caudales a la lesión. De este modo la imposibilidad de los axones supraespinales de atravesar la zona de lesión sería compensada por la presencia de nuevas neuronas con las propiedades plásticas necesarias para generar contactos sinápticos no sólo con los axones aferentes sino emitiendo asimismo prolongaciones que sinaptarán con las neuronas diana correspondientes. Es evidente que las células candidatas a realizar esta función han de poseer una altísima plasticidad morfológica y funcional para poder acoplarse a la circuitería y metabolismo neurotransmisor requerido. Es por ello que las células madre, los injertos de tejido nervioso fetal o los neuroblastos sean las más indicadas para esta función (Zompa et al., 1997).

2) El injerto celular puede servir como una factoría de síntesis y secreción de diferentes factores que promuevan la supervivencia y el crecimiento neuronal, confiriendo un soporte físico y trófico para la regeneración axonal. En este sentido, las células transplantadas pueden liberar al medio extracelular una serie de productos que, ya sea porqué las sintetizen de forma natural o bien porqué sean transgénicas y estén modificadas para que lo hagan de forma constitutiva, modifiquen y modulen la respuesta de las neuronas o de las células gliales. En esta línea, por medio de la potenciación o de la atenuación de las respuestas fisiológicas de las células de la médula espinal se puede modular el ambiente glial, haciendo que sea favorable tanto para la neuroprotección como para la elongación axonal. Con este propósito se han evaluado un gran abanico de células. Por ejemplo, los trasplantes de células de Schwann realizados por el equipo de Bunge con el propósito de mimetizar los fenómenos del sistema nervioso periférico. También se está estudiando el posible papel de las células inmunitarias en la regeneración, ya que se postula que el inmunoprivilegio del SNC podría ser un impedimento añadido

para la regeneración ya que a diferencia del SNP el detrito celular tarda mucho más tiempo en ser eliminado del parénquima nervioso, pudiendo ser una barrera física para el crecimiento axonal (Lazarov-Spiegler et al., 1998)

Las propiedades plásticas, exclusivas y únicas en el SNC, que posee el sistema olfatorio hacen que sea el centro de atención de numerosos investigadores. A diferencia del resto de neuronas centrales, las neuronas sensoriales olfatorias presentan un continuo reemplazo a lo largo de toda la vida del individuo (Farbman, 1990). Posiblemente, el contacto de sus dendritas con el medio externo las hace muy vulnerables a agentes químicos y físicos presentes en la atmósfera, y que su presencia induzca a la muerte neuronal (Costanzo, 1991). Con tal de evitar la pérdida crónica de estas neuronas y por tanto la pérdida del sentido del olfato, en el epitelio nasal existen células de soporte que se diferencian en neuronas y que las reemplazan cuando éstas mueren. Estas neuronas sensoriales recién formadas extienden su axón a lo largo del trayecto del nervio olfatorio, penetran en el bulbo olfatorio y realizan sinapsis funcionales con las respectivas neuronas de segundo orden del procesamiento sensorial. Estudios experimentales muestran que esta capacidad regenerativa no sólo se da en situaciones fisiológicas, sino que al dañar el nervio o bulbo olfatorio, los axones crecen y sinaptan de nuevo con sus células diana, restableciendo la función sensorial (Costanzo, 1985). Estos motivos hacen que el sistema olfatorio y las células que lo componen estén recibiendo un intenso estudio por parte de muchos laboratorios con el fin de replicar estas propiedades en zonas lesionadas del SNC. Ha quedado postulado que, en gran medida, las capacidades regenerativas de este sistema están potenciadas por la GE que la compone (Doucette 1984, Ramón-Cueto y Valverde, 1995).

3) El injerto celular puede remielinizar los axones desmielinizados por la lesión. Están ampliamente evidenciados los déficits funcionales que comportan el bloqueo de la conducción inducido por la desmielinización segmentaria de los tractos espinales (Nashmi y Fehlings, 2001). Además los oligodendrocitos, juntamente con las neuronas, son células que han mostrado poseer una gran vulnerabilidad a los procesos apoptóticos, lo que les conduce a la muerte celular. El trasplante de progenitores de oligodendrocitos, de células de Schwann, de células estromales de la médula ósea y de GE han demostrado su potencial para remielinizar a los axones desnudos de mielina y restablecer las funciones de conducción (Imaizumi et al., 2000, Akiyama et al., 2001, 2002).

Los excelentes resultados que se están obteniendo en los modelos experimentales abren la posibilidad de una futura aplicación clínica. No obstante, así como en otras patologías del SNC está constatado que a los pacientes se les ha realizado trasplantes celulares, no sucede lo mismo con los traumatismos de la médula espinal (Freed, 2000). Y sólo en unos trabajos puntuales realizados el Dr. Katunian en el Brain Research Institute of the Moscow Academy of Medicine se ha descrito el

transplante de piezas de la corteza cerebral de fetos en lesionados medulares (Reier et al., 1994). Los resultados descritos por el investigador son esperanzadores. Aunque los pacientes sólo presentaran una leve mejora motora, en ningún caso se empeoró el estado del paciente, lo que sugiere la accesibilidad del abordaje quirúrgico. Actualmente una empresa privada está subvencionando un programa para el transplante de macrófagos activos. De momento se encuentran en las fases iniciales del estudio (Blight, 2002).

Aunque los datos obtenidos experimentalmente son esperanzadores, y los distintos tipos de células transplantadas ofrecen selectivamente una serie de ventajas, aún queda un largo camino experimental por recorrer hasta que fiablemente podamos transplantar células o aplicar cualquier otra terapia reparadora en la médula espinal lesionada de los pacientes. Por este motivo, los estudios realizados en la presente tesis pretenden profundizar y aportar nuevos datos sobre los efectos del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio, ya que es necesaria una amplia investigación experimental que permita elucidar los mecanismos moleculares, celulares, así como a los posibles cambios plásticos que induce el transplante glial en el sistema nervioso central antes de poder transplantarla en lesiones medulares humanas.

## **OBJETIVOS**

La presente tesis doctoral tiene dos objetivos principales: en primer lugar caracterizar un modelo de lesión fotoquímica en la médula espinal de la rata, y en segundo lugar, evaluar en el modelo experimental estandarizado, los efectos a corto y a largo plazo del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio.

Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Desarrollar un modelo de lesión fotoquímica, basado en la aplicación tópica en la médula espinal del agente fotoactivo rosa de bengala y su subsiguiente excitación por medio de la irradiación con una fuente de luz fría.
2. Evaluar, a corto plazo, los efectos del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en animales sujetos a una lesión fotoquímica severa de la médula espinal.
3. Valorar el grado de afectación motora producida al realizar una lesión fotoquímica en distintos segmentos de la médula espinal (T8 y L2).
4. Evaluar, a largo plazo, los efectos del transplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en animales sujetos a una lesión fotoquímica leve de la médula espinal.
5. Comparar, a largo plazo, los efectos neuroprotectores ejercidos por el transplante de glía envolvente o células de Schwann en animales sujetos a una lesión fotoquímica de la médula espinal.
6. Estudiar la influencia del método de transplante celular sobre los efectos ejercidos por las células transplantadas en la médula espinal lesionada.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Caracterización funcional y morfológica de la lesión fotoquímica en la médula espinal.

#### (Trabajos 1 y 2)

#### Objetivos

- Valorar si el procedimiento quirúrgico propuesto de la médula espinal induce una lesión con características similares a los ya estandarizados.
- Evaluar a corto plazo y por medio de técnicas neurológicas, electrofisiológicas e histológicas el grado de lesión medular inducido por el método propuesto.
- Estudiar la influencia del tiempo de irradiación sobre el grado de lesión medular.

#### Materiales y Métodos

Lesión fotoquímica en la médula espinal (T13).

Grupos experimentales:

RB0; Médula espinal bañada con Rosa de Bengala sin irradiar.

RB1; Iluminación de la médula espinal, con Rosa de Bengala, durante 1 minuto.

RB2.5; Iluminación de la médula espinal, con Rosa de Bengala, durante 2.5 minutos.

RB5; Iluminación de la médula espinal con, Rosa de Bengala, durante 5 minutos.

RB10; Iluminación de la médula espinal, con Rosa de Bengala, durante 10 minutos.

SS10; Médula espinal bañada con suero fisiológico, e irradiada durante 10 minutos.

#### Evaluación neurológica

Prueba de deambulación en campo abierto (escala BBB): 0, 3, 5, 7, 9, 11, 15 dpo.

Prueba de sensibilidad termoalgésica: 0 y 15 dpo.

Evaluación electrofisiológica: 0 y 15 dpo

Potenciales motores y somatosensoriales evocados.

Conducción motora periférica: Ondas M y H.

Evaluación histológica (15 dpo)

Descripción con microscopía electrónica de la zona de lesión.

Cuantificación de la cavidad producida.

Descripción cuantitativa y/o cualitativa de las distintas poblaciones neurales de la médula espinal

Inmunocitoquímica: Astrocitos (GFAP y Proteoglicano (3PE8)), Motoneuronas (CGRP),

Interneuronas (Calbindina D-28) y Microglía (Lectina del tomate).

Estudio a corto plazo los efectos del trasplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en animales sujetos a una lesión fotoquímica severa de la médula espinal. (Trabajo 3)

Objetivos

- Valorar si el modelo de lesión es válido para evaluar el trasplante celular como estrategia reparadora de la médula espinal lesionada.
- Valorar funcionalmente el grado de recuperación funcional tras el trasplante celular.
- Evaluar el grado de preservación de parénquima medular y de reactividad glial tras el trasplante celular.

Materiales y Métodos

Lesión Fotoquímica severa (5 minutos de irradiación) en T13.

Trasplante agudo de glía envolvente del bulbo olfatorio en DMEM (180.000 células/animal).

Grupos Experimentales:

RB5: Animales con 5 minutos de irradiación.

RB5 + OEC: Animales con 5 minutos de irradiación y trasplante de glía envolvente.

Evaluación neurológica (0, 3, 5, 7, 9, 11, 15 dpo)

Prueba de deambulación en campo abierto (escala de Tarlov).

Prueba de Nocicepción (pinprick).

Evaluación histológica (15 dpo)

Estudio cualitativo y cuantitativo de la reactividad astrocitaria en la zona de lesión y en las zonas rostrales y caudales a ésta, por medio del inmunomarcaje contra GFAP y el proteoglicano 3PE8 .

Estudio del grado de afectación motora producida al realizar una lesión fotoquímica de la médula espinal en los segmentos espinales T8 y L2. (Trabajo 4)

Objetivos

- Comparar la habilidad locomotora de los animales con lesiones en los segmentos T8 o L2 medulares.
- Evaluar las propiedades electrofisiológicas de los circuitos espinales motores después de la lesión.
- Evaluar el grado de afectación de las motoneuronas lumbares.

Materiales y Métodos

Lesión fotoquímica, de 2.5 minutos de irradiación, en los segmentos T8 o L2 de la médula espinal.

Grupos Experimentales:

CNT: Animales intactos.

iT8: Animales con la lesión en el segmento T8 espinal.

iL2: Animales con la lesión en el segmento L2 espinal.

Evaluación neurológica

Prueba de deambulación en campo abierto (escala BBB): 0, 3, 5, 7, 9, 11, 15 dpo.

Evaluación electrofisiológica: 0 y 15 dpo

Potenciales motores evocados.

Conducción motora periférica: Ondas M y H.

Evaluación histológica (15 dpo)

Evaluación del parénquima preservado en la zona de lesión.

Evaluación de la supervivencia y estado funcional de las motoneuronas lumbares:

- Tinción con Violeta de Cresilo.
- Inmunomarcaje contra CGRP.

Estudio, a largo plazo, de los efectos del trasplante del glía envolvente de bulbo olfatorio en animales sujetos a una lesión fotoquímica leve de la médula espinal. (Trabajo 5)

Objetivos

- Evaluar el grado de recuperación neurológica y electrofisiológica de los animales con trasplante celular.
- Valorar histológicamente el grado de afectación neural, así como la reactividad glial en la zona de lesión.

Materiales y Métodos

Lesión fotoquímica, de 2.5 minutos de irradiación, en la médula espinal (T8).

Grupos experimentales:

Grupo DMEM: Animales con inyección del vehículo.

Grupo OEC: Animales con trasplante de glía envolvente (180.000 células/animal).

Evaluación neurológica (0, 7, 14, 30, 60, 90 dpo)

Prueba de deambulación en campo abierto (escala BBB).

Prueba del plano inclinado.

Prueba de sensibilidad termoalgésica.

Evaluación electrofisiológica (0, 14, 30, 60, 90 dpo)

Potenciales motores y somatosensoriales evocados.

Conducción motora periférica: Ondas M y H.

Evaluación Histológica (90 dpo)

Cuantificación del parénquima medular preservado en la zona de lesión.

Descripción cualitativa de la reactividad astrocitaria (inmunomarcaje contra GFAP) en la zona de lesión .

Comparar a largo plazo, los efectos neuroprotectores ejercidos por el trasplante de glía envolvente o de células de Schwann en animales sujetos a una lesión fotoquímica de la médula espinal. (Trabajo 6)

### Objetivos

- Valorar el efecto neuroprotector ejercido por cada tipo celular transplantado, y su relación con la recuperación funcional de los animales transplantados.
- Valorar histológicamente el grado de afectación neural, reactividad glial y conectividad medular de los animales.

### Materiales y Métodos

Lesión fotoquímica, de 2.5 minutos de irradiación, en la médula espinal (T8).

Grupos experimentales:

Grupo DMEM: Animales con inyección del vehículo.

Grupo SC: Animales con trasplante de células de Schwann (180.000 células/animal).

Grupo OEC: Animales con trasplante de glía envolvente (180.000 células/animal).

Evaluación neurológica (0, 7, 14, 30, 45, 60, 90 dpo)

Prueba de deambulación en campo abierto (escala BBB).

Prueba del plano inclinado.

Prueba de sensibilidad termoalgésica.

Evaluación electrofisiológica (0, 14, 30, 60, 90 dpo)

Potenciales motores y somatosensoriales evocados.

Conducción motora periférica: Ondas M y H.

Evaluación histológica (90 dpo)

Cuantificación del parénquima medular preservado en la zona de lesión.

Cuantificación de la reactividad glial: GFAP, CSPG.

Valoración de la conectividad espinal: tracto corticoespinal y tractos serotoninérgicos.

Estudio de la influencia del método de trasplante celular sobre los efectos ejercidos por el trasplante en la médula espinal lesionada. (Trabajo 7)

Objetivos

- Evaluar el grado de recuperación neurológica y electrofisiológica de los animales con trasplante celular.
- Valorar histológicamente el grado de afectación neural, así como la reactividad glial en la zona de lesión.

Materiales y Métodos

Lesión fotoquímica, de 2.5 minutos de irradiación, en la médula espinal (T8)

Grupos experimentales:

Grupo DMEM: Animales con inyección del vehículo.

Grupo OEC: Animales con trasplante de glía envolvente (180.000 células/animal).

Evaluación neurológica (0, 7, 14, 30, 60, 90 dpo)

Prueba de deambulación en campo abierto (escala BBB).

Prueba del plano inclinado.

Prueba de sensibilidad termoalgésica.

Evaluación histológica (90 dpo)

Cuantificación del parénquima medular preservado en la zona de lesión.

Descripción cualitativa de la reactividad astrocitaria (inmunomarcados contra GFAP) en la zona de lesión.

## **RESULTADOS**



# Functional and Electrophysiological Characterization of Photochemical Graded Spinal Cord Injury in the Rat

GUILLERMO GARCÍA-ALÍAS,<sup>1</sup> ENRIQUE VERDÚ,<sup>1</sup> JOAQUIM FORÉS,<sup>1,2</sup>  
RUBEN LÓPEZ-VALES,<sup>1</sup> and XAVIER NAVARRO<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**This study characterizes by functional and electrophysiological methods changes following photochemically induced injuries to the spinal cord in adult rats. The spinal cord was exposed by laminectomy and bathed with 1.5% rose bengal solution for 10 min (T12–L1 vertebrae). The excess dye was removed by saline rinse and the spinal cord was irradiated with “cold” light for 0, 1, 2.5, 5, and 10 min in different groups of rats. During the first 15 days postlesion, locomotion activity, pain sensibility, motor and somatosensory evoked potentials, and motor and nerve action potentials were evaluated. Graded locomotor and nociceptive recovery was observed in irradiated rats depending on the photoinduction time. At 15 days, the amplitude of motor and sensory evoked potentials was significantly lower in irradiated groups with respect to control rats. The amplitude of compound muscle action potentials and of reflex H wave after sciatic nerve stimulation decreased significantly in irradiated animals with respect to control rats, while the latency did not show significant differences. In irradiated groups, significant differences were seen between pre- and postoperative values for most functional and electrophysiological parameters analyzed. A significant negative relationship was found between the area of cystic cavity of the spinal cord and the functional and electrophysiological impairment.**

**Key words:** algometry; electrophysiology; open field walking; photochemical injury; rose bengal; spinal cord

## INTRODUCTION

**F**UNCTIONAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL DEFICITS and their possible recovery are related to the severity of spinal cord injury. After graded spinal cord contusion, using a weight-drop device, several studies reported that the greatest locomotor recovery was observed in animals that received the lowest cord impact lesion (Basso et al., 1996; Magnuson et al., 1999; Metz et al., 2000; Raines

et al., 1988; Van de Meent et al., 1996). Using clip compression, Fehlings and Tator (1995) also reported that the highest inclined plane and locomotor Tarlov scores were seen in rats that received the lowest closing forces. In rats whose spinal cords were lesioned by the weight-drop technique, the amplitude of somatosensory evoked potentials (SSEPs) decreased when the dynamic force injury increased (Baskin and Simpson, 1987; Raines et al., 1988). Motor evoked potentials (MEPs) could be

---

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>Hand Unit, Hospital Clínic i Provincial, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

recorded in animals that received mild or moderate spinal cord contusion but were abolished in animals with a severe contusion. The amplitude of MEPs decreased depending on the impact force (Baskin and Simpson 1987; Levy et al., 1986, 1987; Shiau et al., 1992; Van de Meent et al., 1996). Similar results were observed after graded spinal cord clip compression (Fehlings et al., 1987). Changes of lumbar reflex excitability were viewed in adult rats after spinal contusion at T8 level (Thompson et al., 1992, 1998). Recently, Chiba and co-workers (2000) reported that the H-reflex, evoked in tibial and gastrocnemius muscles by magnetic cortical stimulation, disappeared and that the properties of M and F waves changed depending on the depth of impact spinal cord injury at L1–L2 level. These findings suggest that electrophysiological properties of lumbosacral spinal neurons were altered after spinal cord injury.

Functional impairments are well characterized after graded mechanical cord injuries, but less is known after graded photochemical cord injury. Graded neurological deficits have been found in rats that received a photochemical injury in the spinal cord. The neurological abnormalities were related with the time of laser irradiation (Prado et al., 1987). In addition, changes in lumbar reflex excitability and peripheral nerve conduction have not been studied using this experimental injury model. In a previous study we demonstrated by histological techniques that rose bengal, a photosensitive dye, applied topically over the spinal cord, penetrated the cord parenchyma and after illumination with visible light by means of fiberoptics connected to a halogen lamp caused a graded spinal cord injury depending on the time of illumination (Verdú et al., 2003). In the present work, we describe the effects of photochemical graded spinal cord injury on functional and electrophysiological responses during the first 15 days postoperation (dpo). Locomotor activity, evaluated using open-field walking, and nociceptive sensitivity of the hindpaw were used as functional tests. Motor and somatosensory evoked potentials were used for evaluating the integrity of spinal cord pathways. Motor and sensory sciatic nerve conduction and the Hoffman (H) reflex were tested for evaluating peripheral nerve conduction and excitability of lumbar reflexes. Furthermore, correlations between functional, electrophysiological, and histological outcomes were analyzed.

## MATERIALS AND METHODS

### *Spinal Cord Injury*

Female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), placed in a stereotactic frame, the skin and muscles cut

longitudinally and the spinal cord was exposed by a dorsal laminectomy at T12–L1 vertebrae. The dura was carefully cut to facilitate penetration of solutions. Rose bengal (RB; 1.5% in saline; Sigma, St. Louis, MO) was applied directly on the exposed spinal cord during 10 min. The excess dye was removed by a double saline rinse. The lesion was induced by illuminating the exposed dorsal surface of the spinal cord by means of two optic fibers positioned 10 mm on top of the cord. The optic fibers were connected to a halogen lamp (Raypa, Barcelona, Spain). The spinal cord was illuminated at maximal intensity of 120 kLux during 0, 1, 2.5, 5, and 10 min in groups RB0 ( $n = 5$ ), RB1 ( $n = 5$ ), RB2.5 ( $n = 6$ ), RB5 ( $n = 10$ ), and RB10 ( $n = 5$ ), respectively. In a control group, the spinal cord was bathed with saline solution alone and illuminated for 10 min (group SS10,  $n = 5$ ). To prevent damage by the calorific source of the halogen lamp, during the illumination time the spinal cord was bathed with saline solution. Finally, the wound was closed and the animals were kept in a warm environment until full recovery. Amitriptyline (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was administered in the drinking water to prevent neuropathic pain (Navarro et al., 1994) from 2 weeks before spinal cord injury to 15 days postoperation. The experimental procedures adhered to the recommendations of the European Union and the U.S. Department of Health for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethics Committee of our institution.

### *Functional Methods*

Functional tests were performed before operation and during 15 dpo. Locomotor activity was evaluated daily using the open-field walking scoring system and measuring the locomotor ability during 15 min. One animal at a time was allowed to move freely inside a plastic tray (60 cm  $\times$  90 cm  $\times$  24 cm). Two independent examiners observed the hind-limb movements of the rat, and scored the locomotor function according to the BBB scale (Basso et al., 1995). The final score of each animal was the mean value of both examiners. The BBB scale ranges from 0 (no hindlimb movement) to 21 (normal movement-coordinated gait). Scores from 0 to 7 indicate the return of isolated movements in the three joints (hip, knee, and ankle). Scores from 8 to 13 indicate the return of paw placement and coordinated movements with the forelimbs, whereas scores 14–21 show the return of the toe clearance during stepping, predominant paw position, trunk stability and tail position.

Nociceptive sensitivity was evaluated at 15 dpo by a heat-radiation method using a plantar algesimeter (Hargreaves et al., 1988). Briefly, the rat was placed into a plastic box with an elevated glass floor. From the bottom of the box, the light of a projection lamp (150 W) was

focused directly onto the plantar surface of the hindpaw. The time to withdrawal of the heated paw (withdrawal latency) was measured through a time-meter coupled with infrared detectors directed to the plantar surface. The maximal time of stimulation was limited to 40 sec to avoid skin damage. The value for a test was the mean of three trials separated by 30-min resting periods.

### *Electrophysiological Methods*

Motor and somatosensory evoked potentials were tested to evaluate the integrity of spinal cord descending and ascending tracts. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg, i.p.), and placed in a prone position over a warmed flat coil controlled by a hot water circulating pump to maintain skin temperature above 32°C. Motor evoked potentials (MEPs) were recorded using monopolar needle electrodes placed at tibialis anterior and plantar (at the third metatarsal space) muscles, while the contralateral sensorimotor cortex was stimulated by single rectangular pulses of 0.1 msec duration, delivered through needle electrodes inserted subcutaneously, the cathode over the skull overlying the sensorimotor cortex and the anode at the nose. This configuration produces transcranial stimulation that activates subcortical efferent pathways (Adamson et al., 1989; Zappulla et al., 1988). For somatosensory evoked potentials (SSEPs), electrical stimuli of 0.1 msec duration and 6 mA intensity were applied at 5 Hz to the tibial nerve by means of two needle electrodes inserted at the ankle. Evoked responses were recorded using two needle electrodes placed subcutaneously on the skull (same sites as stimulation needles for MEPs). A total of 256 responses were recorded during 100 msec following each stimulus and averaged. The signals were amplified, filtered (band-pass 1 Hz/5 kHz for MEPs and 10 Hz/1 kHz for SSEPs), and displayed on the oscilloscope (Sapphire 4ME, Vickers) to measure the amplitude and the latency of the evoked potentials (Nuwer, 1998).

For nerve conduction studies, the sciatic nerve was stimulated percutaneously through a pair of needle electrodes near the sciatic notch. Square pulses of 0.1 msec duration and supramaximal intensity were applied, and the compound muscle action potentials (CMAP) evoked by stimulation of motor nerve fibers, were recorded from the lateral gastrocnemius, tibialis anterior and plantar muscles by using monopolar needles. Compound nerve action potentials (CNAP), elicited by stimulation of large sensory fibers, were recorded with needle electrodes inserted near the nerve from the digital nerves of the fourth toe and from the tibial nerve at the ankle. Compound action potentials were amplified and displayed on the oscilloscope (Sapphire 4ME, Vickers) to measure the am-

plitude of the negative peak and the latency to the onset (Navarro et al., 1999). The spinal H reflex was assessed during motor nerve conduction tests. The amplitude and the latency to peak of the H-wave were measured for the three muscles tested (Navarro et al., 1999; Valero-Cabré and Navarro, 2001).

To ensure reproducibility the recording and stimulating needles were placed under a microscope to secure the same placement on all animals guided by anatomical landmarks.

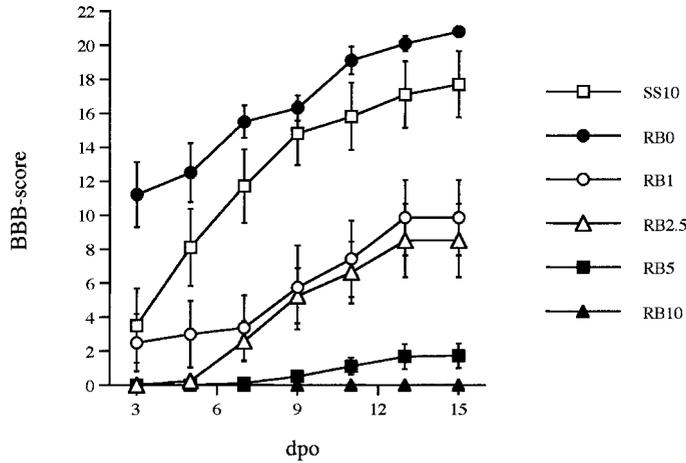
### *Statistical Analysis*

All functional and electrophysiological measurements were performed in a blinded manner. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Scheffé test for multiple comparisons. To examine differences between pre- and postoperative times, a paired t-test was used. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . The relationships between results of different tests were analyzed using linear regression.

## RESULTS

### *Functional Results*

Photochemical injuries of increasing severity produced graded impairment of the locomotor performance as measured by the BBB score (Fig. 1, Table 1). Group RB0 showed the greatest locomotor recovery; animals in this group progressed from frequent weight-supported plantar step to normal gait and tail consistently up. Groups RB1 and RB2.5 had an intermediate level of recovery. By 3 dpo, most RB1 rats showed extensive movements of two joints, while RB2.5 rats did not show noticeable hindlimb movements. During the following postoperative days, the BBB-score of both groups increased progressively up to plantar placement of the paw with weight support in stance only or occasional weight-supported plantar steps without fore- and hindlimb coordination. The rats of group RB5 had no hindlimb movements until 7 dpo and later limited recovery in most cases to only slight joint movements. No hindlimb movements were seen in rats of group RB10. Surprisingly, group SS10 had a lower though not significantly locomotor recovery than group RB0; animals in this group progressed from movements of hindlimb joints to normal locomotion occasionally hampered by trunk instability. Significant differences in the BBB score were found between RB1, RB2.5, and RB5 groups with respect to SS10 and RB0 rats; and for RB10 with respect to all other experimen-



**FIG. 1.** Open field walking scores over time in the experimental groups studied.

tal groups (Table 1). Scores at 15 dpo were significantly lower than preoperative control values in all irradiated groups, but not in groups RB0 and SS10.

Nociceptive response evaluated by plantar algesimetry showed that, at 15 dpo, the time to withdrawal of the heated paw was similar to control values (mean of 10 sec) in group SS10, slightly increased in groups RB0, RB1, and RB2.5, and significantly longer in groups RB5 and RB10 (Table 1). Significant differences were found in groups RB2.5, RB5, and RB10 between pre- and post-

operative values. All animals of groups SS10, RB0, RB1, and RB2.5 showed withdrawal movement of the hindpaws, while only four of 10 animals (40%) in group RB5 and none in group RB10 showed positive responses.

*Electrophysiological Results*

The MEPs recorded prior to operation showed a single wave with a mean latency of about 6 msec in tibialis anterior muscle and 8 msec in plantar muscle. The mean

**TABLE 1. FUNCTIONAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL RESULTS OF MOTOR AND SOMATOSENSORY EVOKED POTENTIALS OBTAINED AT 15 DAYS AFTER PHOTOCHEMICAL INJURY IN THE EXPERIMENTAL GROUPS STUDIED**

Parameter	Intact	SS10	RB0	RB1	RB2.5	RB5	RB10
BBB-score	21.0 ± 0.0	17.7 ± 1.9	20.8 ± 0.1	9.8 ± 2.2*ab	8.5 ± 2.2*ab	1.7 ± 0.7*abcd	0.0 ± 0.0*abcd
ALG (sec)	10.2 ± 0.5	9.3 ± 0.3	12.5 ± 1.1	13.3 ± 1.1	17.4 ± 1.1*	36.8 ± 2.2*abcd	39.9 ± 0.1*abcd
MEP Ampl (mV) TA	14.4 ± 0.6	15.6 ± 2.9	14.6 ± 1.2	4.1 ± 1.6*ab	0.4 ± 0.3*ab	0.2 ± 0.1*ab	0.0 ± 0.0*ab
MEP Lat (msec) TA	6.0 ± 0.04	5.8 ± 0.3	6.2 ± 0.06	8.8 ± 1.1	8.0 ± 1.9	16.9 ± 3.6*abcd	—
MEP Ampl (mV) PL	0.2 ± 0.02	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.04 ± 0.01*	0.03 ± 0.02* <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0* <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0* <sup>a</sup>
MEP Lat (msec) PL	8.1 ± 0.1	7.9 ± 0.2	8.7 ± 0.3	10.7 ± 1.5	16.0 ± 4.7	—	—
SSEP Ampl (μV) N1	8.4 ± 0.6	8.2 ± 1.9	8.1 ± 1.1	0.5 ± 0.2*ab	0.3 ± 0.2*ab	0.0 ± 0.0*ab	0.0 ± 0.0*ab
SSEP Ampl (μV) N2	16.2 ± 0.5	18.1 ± 1.2	16.0 ± 0.9	1.7 ± 0.8*ab	1.8 ± 0.7*ab	0.0 ± 0.0*ab	0.0 ± 0.0*ab
SSEP Ampl (μV) N3	16.1 ± 0.5	17.1 ± 1.5	16.0 ± 0.6	3.2 ± 1.7*ab	3.3 ± 1.7*ab	0.0 ± 0.0*ab	0.0 ± 0.0*ab
SSEP Lat (msec) N1	14.6 ± 0.2	14.5 ± 0.7	15.6 ± 0.3	16.2 ± 0.2	16.5 ± 2.3	—	—
SSEP Lat (msec) N2	21.6 ± 0.2	22.0 ± 0.6	21.8 ± 0.6	21.6 ± 0.5	22.5 ± 0.3	—	—
SSEP Lat (msec) N3	30.7 ± 0.2	30.5 ± 0.8	31.3 ± 0.5	31.4 ± 0.7	31.8 ± 0.9	—	—

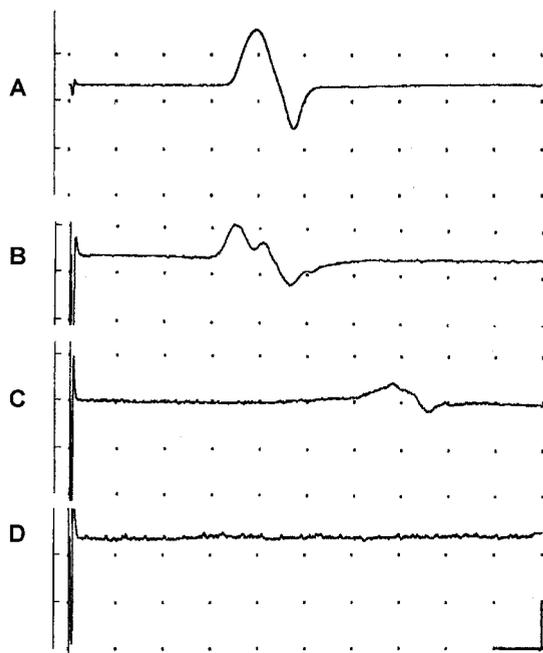
\*p < 0.05 versus preoperative values of the same group; <sup>a</sup>versus SS10; <sup>b</sup>versus RB0; <sup>c</sup>versus RB1; <sup>d</sup>versus RB2.5.

ALG, algesimetry, time to withdrawal; MEP Ampl, amplitude of the motor evoked potential; MEP Lat, latency of the motor evoked potential; TA, tibialis anterior muscle; PL, plantar muscle; SSEP Ampl, amplitude of the somatosensory evoked potential; SSEP Lat, latency of the somatosensory evoked potential; N1, first negative wave complex; N2, second negative wave complex; N3, third negative wave complex; intact, mean of the preoperative values.

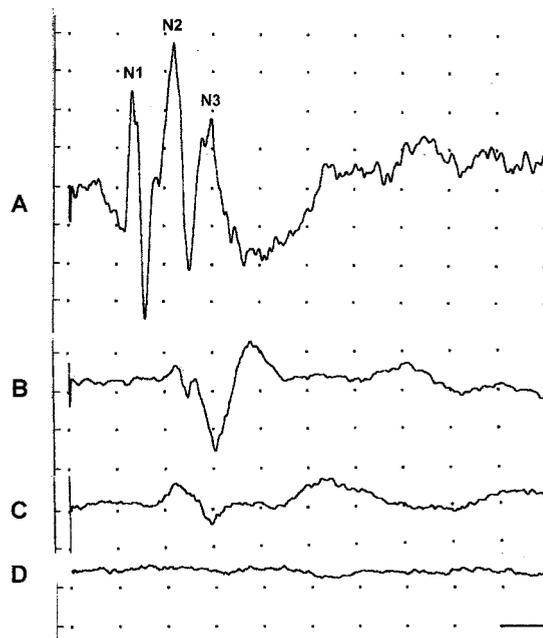
Values for intact spinal cords were obtained from preoperative tests in the 36 rats.

amplitudes were 14 and 0.22 mV in tibialis anterior and plantar muscles, respectively. After photochemical injury, the amplitude of MEPs recorded in both muscles decreased significantly in illuminated rats with respect to preoperative values, while in groups RB0 and SS10 there were no significant differences (Fig. 2, Table 1). At 15 dpo, the MEPs amplitude was significantly lower in irradiated groups with respect to groups RB0 and SS10, except for the plantar MEP in group RB1. The latency of MEPs increased slightly in injured rats but not in RB0 and SS10 rats with respect to control values (Table 1). After spinal cord injury, tibialis anterior-MEPs were recorded in all animals of groups SS10 and RB0, but only in three of five rats (60%) of group RB1, three of six rats (50%) of RB2.5, three of 10 rats (30%) of RB5, and none (0%) of RB10.

Control SSEPs showed a series of well defined negative peaks at latencies of 15, 22, and 31 msec, named as N1, N2, and N3 waves, with mean amplitudes about 8, 16, and 16  $\mu$ V, respectively (Fig. 3). At 15 dpo, the amplitude of SSEPs decreased significantly in all injured groups with respect to preoperative values, but did not change in groups RB0 and SS10 (Table 1). No significant differences were found between pre- and postoper-



**FIG. 2.** Sample of electrophysiological recordings of motor evoked potentials (MEPs) recorded in tibialis anterior muscle in rats of groups RB0 (A), RB1 (B), RB5 (C), and RB10 (D) at 15 days postinjury. Horizontal bar = 2 msec for all traces; vertical bar = 10, 5, 2, and 1 mV for RB0, RB1, RB5, and RB10 traces, respectively.



**FIG. 3.** Sample of electrophysiological recordings of somatosensory evoked potentials (SSEPs) in rats of groups RB0 (A), RB1 (B), RB5 (C), and RB10 (D) at 15 days postinjury. Horizontal bar = 10 msec; vertical bar = 4  $\mu$ V. N1, first negative wave complex; N2, second negative wave complex; N3, third negative wave complex.

ative values in SSEP latencies. SSEPs were recorded in all animals of groups SS10 and RB0, in three of five rats (60%) of group RB1, three of six rats (50%) of RB2.5, but in none (0%) of groups RB5 and RB10.

The mean amplitude of compound muscle action potentials (CMAPs) recorded prior to operation in tibialis anterior, gastrocnemius and plantar muscles after sciatic nerve stimulation were about 42, 55 and 8 mV, respectively. The mean latencies averaged 1.6, 1.3, and 2.8 msec in the same muscles, respectively. At 15 dpo, the amplitude of CMAPs decreased significantly in groups RB2.5, RB5, and RB10 with respect normal values and to values of groups SS10, RB0 and RB1 for all three muscles tested (Table 2). The amplitude of CMAPs recorded in tibialis anterior and gastrocnemius muscles also decreased significantly in RB1 rats with respect to preoperative values. No significant differences were found between SS10, RB0, and RB1 animals for any CMAP values. At 15 dpo the latency of CMAPs did not show differences between groups (Table 2).

The H wave recorded prior to operation showed a single wave with a mean latency of 7.1, 6.6, and 7.7 msec, and mean amplitude of about 3.0, 5.0, and 0.6 mV in tibialis anterior, gastrocnemius and plantar muscles, respectively. At 15 dpo, the mean amplitude of the H wave

**TABLE 2. ELECTROPHYSIOLOGICAL RESULTS OF PERIPHERAL NERVE CONDUCTION AT 15 DAYS AFTER PHOTOCHEMICAL INJURY IN THE EXPERIMENTAL GROUPS STUDIED**

Parameter		Intact	SS10	RB0	RB1	RB2.5	RB5	RB10
CMAP Ampl (mV)	TA	41.5 ± 0.6	47.2 ± 0.9	43.4 ± 1.6	32.4 ± 2.1 <sup>*a</sup>	27.4 ± 2.8 <sup>*ab</sup>	23.6 ± 1.6 <sup>*ab</sup>	15.6 ± 4.7 <sup>*abc</sup>
CMAP Lat (msec)	TA	1.6 ± 0.02	1.6 ± 0.03	1.7 ± 0.06	1.6 ± 0.08	1.5 ± 0.08	1.5 ± 0.04	1.6 ± 0.06
CMAP Ampl (mV)	GM	54.8 ± 0.4	56.9 ± 2.8	51.8 ± 3.2	45.3 ± 2.5 <sup>*</sup>	34.2 ± 2.9 <sup>*ab</sup>	31.5 ± 2.1 <sup>*ab</sup>	17.9 ± 5.4 <sup>*abcd</sup>
CMAP Lat (msec)	GM	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.03	1.3 ± 0.02	1.3 ± 0.05	1.3 ± 0.02	1.3 ± 0.03	1.4 ± 0.04
CMAP Ampl (mV)	PL	8.1 ± 0.1	8.1 ± 0.6	8.1 ± 0.1	6.8 ± 0.8	4.7 ± 0.4 <sup>*ab</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>*ab</sup>	2.9 ± 0.9 <sup>*abc</sup>
CMAP Ampl (msec)	PL	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.04	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.07	2.9 ± 0.06	2.9 ± 0.2
H-Ampl (mV)	TA	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.6	3.2 ± 0.4	2.9 ± 0.3	2.2 ± 0.2 <sup>*</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>*ab</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>*a</sup>
H-Lat (msec)	TA	7.1 ± 0.1	6.9 ± 0.2	7.5 ± 0.3	7.9 ± 0.4	7.7 ± 0.2 <sup>*</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>*</sup>	8.3 ± 0.6 <sup>*</sup>
H-Ampl (mV)	GM	5.1 ± 0.2	6.0 ± 0.5	4.7 ± 0.4	3.3 ± 0.4 <sup>*a</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>*a</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>*ab</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>*ab</sup>
H-Lat (msec)	GM	6.6 ± 0.1	6.1 ± 0.5	6.5 ± 0.2	7.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.2 <sup>*a</sup>	7.5 ± 0.2 <sup>*a</sup>	7.9 ± 0.3 <sup>*ab</sup>
H-Ampl (mV)	PL	0.6 ± 0.04	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2 <sup>*</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>*</sup>	1.0 ± 0.4
H-Lat (msec)	PL	7.7 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.3	6.9 ± 0.7	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1	8.3 ± 0.4

\* $p < 0.05$  versus preoperative values of the same group; <sup>a</sup>versus SS10; <sup>b</sup>versus RB0; <sup>c</sup>versus RB1; <sup>d</sup>versus RB2.5.

CMAP Ampl, amplitude of the compound motor action potential; CMAP Lat, latency of the compound motor action potential; H-Ampl, amplitude of the H wave; H-Lat, latency of the H wave; TA, tibialis anterior muscle; GM, gastrocnemius muscle; PL, plantar muscle; intact, mean of the preoperative values.

recorded in gastrocnemius and tibialis anterior muscles decreased progressively in relation to the time of photoinduction. Significant differences were found for the amplitude and the latency of gastrocnemius muscle H wave of groups RB1, RB2.5, RB5, and RB10 with respect to SS10 and RB0 groups (Table 2). The amplitude and latency of H wave recorded in tibialis anterior and plantar muscles did not show significant changes between groups. Significant differences between pre- and postoperative values were seen in RB2.5, RB5 and RB10 groups for tibialis anterior and gastrocnemius muscle H wave (Table 2).

The control compound nerve action potentials (CNAP) recorded in the tibial nerve had a mean latency of 1.2 msec and mean amplitude of 180  $\mu$ V, and in the digital nerve of 2.1 msec and 16  $\mu$ V. The latency and amplitude of CNAPs were similar in all groups studied at 15 days postinjury, without significant differences between pre- and postoperative values.

### Functional and Histological Correlation

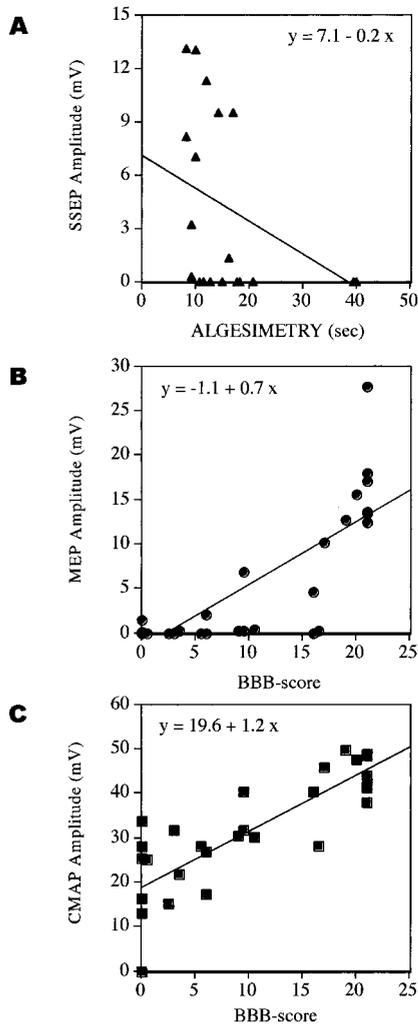
Figure 4 illustrates the relationships between different functional and electrophysiological results. Pain sensitivity, evaluated by the algometry test, was significantly correlated with the amplitude of somatosensory evoked potential ( $r = 0.57$ ;  $p < 0.0001$ ). Animals with high values of SSEP amplitude (9–12  $\mu$ V) also showed a short

time to withdrawal. However, there were animals with a short withdrawal time but abolished SSEP (Fig. 4A). The BBB-score was also significantly correlated with the amplitude of MEPs ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.0001$ ), and with the amplitude of CMAPs ( $r = 0.78$ ;  $p < 0.0001$ ). Rats with high values of BBB-score also showed high MEP and CMAP amplitudes, but some with BBB score of 10–15 points had no recordable MEPs (Fig. 4B), indicating that electrophysiological tests are more sensitive to the effects of injury than functional behavior.

Significant negative correlations were also observed between the maximal area of cavity in the spinal cord and the functional parameters studied (Fig. 5), further indicating that the degree of functional impairment was related to the severity of the injury performed.

## DISCUSSION

In a previous study, we reported that after dorsal laminectomy and topical application of rose bengal, the irradiation of spinal cord with a fiber-optic light source caused damage to the spinal cord parenchyma. At the lesion site, we observed that the maximal area of lesion cavity increased with increasing photoinduction time (Verdú et al., 2003). In the present work, we show that this graded cord lesion was accompanied by a progressive loss of func-

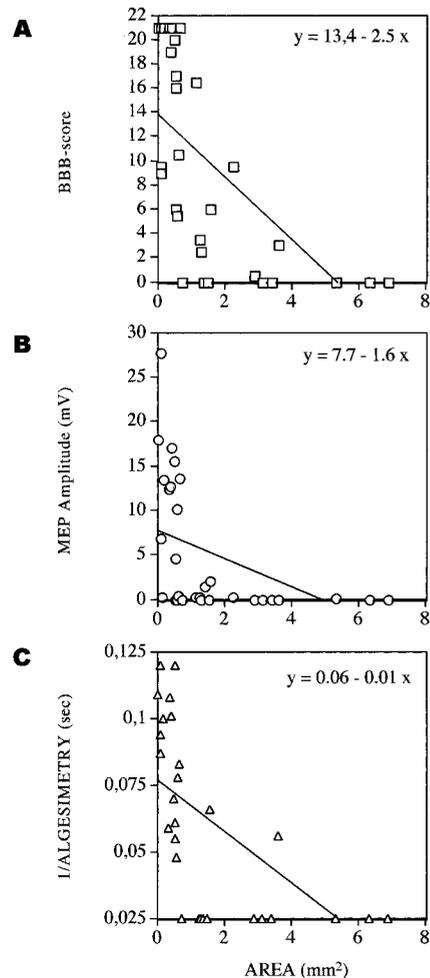


**FIG. 4.** Relationship between algesimetry results and (A) amplitude of the SSEP recorded. Relationship between the BBB score and (B) amplitude of MEP and (C) amplitude of CMAP recorded in the tibialis anterior muscle. The lines each represent the best fit as determined by linear regression. The *r* values for A, B, and C are 0.57, 0.79, and 0.78, respectively. In all cases,  $p < 0.0001$ .

tional and electrophysiological responses postinjury. Our results indicate that locomotor and nociceptive behaviors showed gradual degree of impairment related to the severity of spinal cord injury. In addition, motor and somatosensory evoked potentials were unchanged with respect to preoperative controls in SS10 and RB0 groups, while in lesioned rats they were partially or completely abolished, indicating involvement of descending and ascending spinal pathways. Similar neurological and electrophysiological deficits were reported by Prado et al. (1987) after laser-induced photochemical damage of the rat spinal cord. At 2 weeks postlesion, SSEPs were absent in rats irradiated during 1–10 min. In animals irradiated 1

min normal responses to pain and minimal motor impairment were seen, while in animals irradiated 5 and 10 min complete nociceptive and locomotor loss was found.

At 3 dpo, all rats studied showed a locomotor BBB score lower than normal values, then increased progressively up to normal gait only in groups SS10 and RB0. These results suggest that functional activity is depressed during the first days following operation, and that light illumination by itself adds slight effects on the spinal cord. Contusion and compression injuries on the rat spinal cord have been demonstrated to produce graded functional and histological consequences in adult rats (Basso et al., 1996; Gruner et al., 1996). In a recent study, Sun et al. (2000) reported that the BBB score in the open field



**FIG. 5.** Relationship between maximal area of cavity at the lesion site, and the BBB score (A), the MEP amplitude recorded in tibialis anterior muscle (B) and the inverse function of the withdrawal latency found in algesimetry test (C). The lines represent the best fit as determined by linear regression. The *r* values for A, B, and C are 0.63, 0.47, and 0.64, respectively. In all cases,  $p < 0.01$ .

walking test was also severely affected after bilateral cord hemisection, but recovered during the first 14 postoperative days. The lowest BBB score was observed in rats with the ventral funiculus preserved, while the highest BBB score corresponded to rats with the dorsolateral funiculus preserved (Sun et al., 2000). The persistence after spinal cord injury of axons in non-pyramidal tracts, particularly in rubrospinal, raphespinal and vestibulospinal tracts, is strongly associated with residual hindlimb locomotor function (Eidelberg et al., 1981; Fehlings and Tator, 1995; Little et al., 1988; Sun et al., 2000). Complete or partial locomotor recovery was seen in our rats in which one ventrolateral quadrant of the cord was preserved at the lesion site, especially in groups RB1 and RB2.5.

Our results also demonstrate that the amplitude of MEPs recorded in tibialis anterior and plantar muscles decreased significantly after photochemical injury. Contusion injuries of the rat spinal cord, made by a weight-drop device with impact forces of 20–80 g-cm, also produce a decline of the amplitude of pyramidal and extrapyramidal MEPs with increasing impact forces (Shiau et al., 1992). Decreased MEP amplitudes were reported when ventral or lateral funiculi, but not when the dorsal funiculus were sectioned (Adamson et al., 1989). However, complete loss of MEPs was only seen when spinal pathways were interrupted by bilateral hemisection. Regarding the relationship between locomotor pattern and MEPs after spinal cord injury in adult rats, locomotor activity was significantly impaired after either lumbar spinal cord contusion or kainic acid injection, however, reduction of MEPs was observed only after kainic acid injection (Magnuson et al., 1999). These results suggest that after spinal cord injury, recovery of MEPs is mainly correlated to the preservation of gray matter, while locomotor recovery requires preservation also of descending tracts in the white matter. In the present study locomotion was moderately affected in RB1 and RB2.5 rats, severely in RB5 and abolished in RB10 animals, while MEPs recorded in tibialis anterior muscle were moderately decreased in group RB1, severely in groups RB2.5 and RB5 and abolished in RB10.

Ascending somatosensory pathways were also affected after photochemical injury. The amplitude of the SSEPs was reduced significantly in irradiated animals, and no SSEPs were obtained in any rat from groups RB5 and RB10. Similar reduction of the amplitude of SSEPs with no change in latency was seen after spinal cord contusion (Raines et al., 1988), compression (Fehlings et al., 1989), or photochemical injury (Prado et al., 1987). The amplitude of both MEPs and SSEPs was significantly correlated with the severity of cord compression and the posttraumatic spinal cord blood flow (Fehlings et al., 1989). Our results indicate that when the dorsal white

matter was completely destroyed (RB5 and RB10 groups) SSEPs could not be elicited (Schlag et al., 2001).

Nociceptive and thermal sensory information is conducted by ascending pathways in the ventrolateral funiculus forming spinoreticular and spinothalamic tracts (Tracey, 1995). The latency of paw withdrawal to noxious heat stimulus increased after spinal cord injury in RB2.5 and RB5 groups and was abolished in animals irradiated for 10 min. Ventrolateral funiculi were preserved in RB2.5 and RB5 animals, but completely destroyed in RB10 rats (Verdú et al., 2003). The functional findings suggest that ventrolateral pathways were at least functionally involved in RB2.5 and RB5 rats. Mechanical and thermal hyperalgesia has been reported after moderate contusion (Hulsebosch et al., 2000) and after ischaemic spinal cord lesion (Xu et al., 1992). In contrast, no intense pain responses were observed in our animals during the first 15 days postoperation, and there was a tendency to increase the latency time for paw withdrawal. Even at longer follow-up times up to 3 months, we have not seen evidence of allodynia or hyperalgesia in rats after photochemical spinal injury. Differences in strains of rats used, spinal cord injury model and level of injury may explain differences in nociceptive responses. In addition, we administered amitriptyline and topical anesthetic blockade to prevent the development of neuropathic pain.

Electrophysiological tests of peripheral nerves and spinal cord reflexes showed some interesting changes in relation to the severity of the induced injury. The amplitude of CMAPs evoked by stimulation of the sciatic nerve decreased in lesioned groups with respect to controls. The CMAP amplitude correlated with the area of cystic cavity at L4–L6 spinal cord. Our results also show a significant decrease of the H wave amplitude in groups RB2.5, RB5 and RB10. In agreement with our results, Chiba et al. (2000) reported that the amplitude of both M and H waves recorded in tibialis anterior and gastrocnemius muscles decreased after spinal cord contusion at L1–L2. These findings indicate that motoneurons and spinal motor reflexes lying at lumbar levels are altered after injuries applied at higher levels of the spinal cord. In contrast, the conduction properties of sensory nerve fibers in the sciatic nerve did not show noticeable changes. The preservation of primary sensory neurons is attributable to their location in dorsal root ganglia, more distant from the injury site.

A loss of lumbar motoneurons may explain the decreased amplitude of CMAPs observed in groups RB2.5, RB5, and RB10, which showed cavities in transverse sections of lumbar segments (Verdú et al., 2003). A significant decrease in the number of motoneurons counted in ventral horns of L4–L5 segments has been reported in adult rats after complete transection at T8–T10 (Eidelberg et al., 1989). However, when we counted the number of nerve cells located in ventral horns in L4 sections

labeled with cresyl violet, we found that the number of motoneurons was similar in all experimental groups studied (data not shown). The decreased CMAPs amplitude observed in illuminated rats with respect to normal values may be explained by functional depression of spinal motoneuron activity in lumbar cord segments. The expression and axonal transport of motoneuron neurotransmitters are under the influence of supraspinal impulses (Dahlstrom et al., 1978; Marlier et al., 1990).

In summary, the present study shows that graded spinal cord injuries can be induced by a photochemical lesion induced in adult rats by topically applying RB and a "cold" light source. Our results demonstrate that, by increasing the illumination time, functional and electrophysiological consequences are progressively more severe. This experimental model seems adequate for investigating different therapeutic strategies to promote neuroprotection and central regeneration. We recently studied the influence of olfactory ensheathing cells transplanted into the photochemically damaged spinal cord, and found that they exert a neuroprotective role by reducing astrogliosis and cystic cavitation (Verdú et al., 2001) and increase functional and electrophysiological recovery during the 3 months following lesion (manuscript in preparation).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Albert Brillas and Mónica Espejo for technical assistance. This research was supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (FISss 00/0031-02), Societat Catalana de Neurologia-Fundació Uriach, and Sociedad Española de Neurología, Spain.

## REFERENCES

- ADAMSON, J., ZAPPULLA, R.A., FRASER, A., et al. (1989). Effects of selective spinal cord lesions on the spinal motor evoked potential (MEP) in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **74**, 469–480.
- BASKIN, D.S., and SIMPSON, R.K. (1987). Corticomotor and somatosensory evoked potential evaluation of acute spinal cord injury in the rat. *Neurosurgery* **20**, 871–877.
- BASSO, D.M., BEATTIE, M.S., and BRESNAHAN, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**, 1–21.
- BASSO, D.M., BEATTIE, M.S., and BRESNAHAN, J.C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* **139**, 244–256.
- CHIBA, A., HIRUMA, S., HASHIMOTO, S., et al. (2000). Relationship between the state of spinal impact injuries and magnetically evoked EMGs in rats. *Neurol. Res.* **22**, 727–732.
- DAHLSTROM, A., HEIWALL, P.O., BOOJ, S., et al. (1978). The influence of supraspinal impulse activity on the intraxonal transport of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in rat motor neurons. *Acta Physiol. Scand.* **103**, 308–319.
- EIDELBERG, E., NGUYEN, L.H., POLICH, R., et al. (1989). Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions. *Brain Res. Bull.* **22**, 39–45.
- EIDELBERG, E., STORY, J.L., WALDEN, J.G., et al. (1981). Anatomical correlates of return of locomotor function after partial spinal cord lesions in cats. *Exp. Brain Res.* **42**, 81–88.
- FEHLINGS, M.G., and TATOR, C.H. (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.
- FEHLINGS, M.G., TATOR, C.H., and LINDEN, R.D. (1989). The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **74**, 241–259.
- FEHLINGS, M.G., TATOR, C.H., LINDEN, R.D., et al. (1987). Motor evoked potentials recorded from normal and spinal-injured rats. *Neurosurgery* **20**, 125–130.
- GRUNER, J.A., YEE, A.K., and BLIGHT, A.R. (1996). Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res.* **729**, 90–101.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., et al. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77–88.
- HULSEBOSCH, C.E., XU, G.Y., PEREZ-POLO, J.R., et al. (2000). Rodent model of chronic central pain after spinal cord contusion injury and effects of gabapentin. *J. Neurotrauma* **17**, 1205–1217.
- LEVY, W., McCAFFREY, M., and HAGICHI, S. (1987). Motor evoked potentials as a predictor of recovery in chronic spinal cord injury. *Neurosurgery* **20**, 138–142.
- LEVY, W., McCAFFREY, M., and YORK, D. (1986). Motor evoked potential in cats with acute spinal cord injury. *Neurosurgery* **19**, 9–19.
- LITTLE, J.W., HARRIS, R.M., and SOHLBERG, R.C. (1988). Locomotor recovery following subtotal spinal cord lesions in a rat model. *Neurosci. Lett.* **87**, 189–194.
- MAGNUSSON, D.S.K., TRINDER, T.C., ZHANG, Y.P., et al. (1999). Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Exp. Neurol.* **156**, 191–204.

- MARLIER, L., RAJAOFETRA, N., PERETTI-RENUCCI, R., et al. (1990). Calcitonin gene-related peptide staining intensity is reduced in rat lumbar motoneurons after spinal cord transection: a quantitative immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* **82**, 40–47.
- METZ, G.A.S., MERKLER, D., DIETZ, V., et al. (2000). Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* **883**, 165–177.
- NAVARRO, X., BUTÍ, M., and VERDÚ, E. (1994). Autotomy prevention by amitriptyline after peripheral nerve section in different strains of mice. *Restor. Neurol. Neurosci.* **6**, 151–157.
- NAVARRO, X., VALERO, A., GUDIÑO, G., et al. (1999). Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann. Neurol.* **45**, 207–215.
- NUWER, M.R. (1998). Spinal cord monitoring with somatosensory techniques. *J. Clin. Neurophysiol.* **15**, 183–193.
- PRADO, R., DIETRICH, W.D., WATSON, B.D., et al. (1987). Photochemically induced graded spinal cord infarction. Behavioral, electrophysiological and morphological correlates. *J. Neurosurg.* **67**, 745–753.
- RAINES, A., DRETCHEN, K.L., MARX, K., et al. (1988). Spinal cord contusion in the rat: somatosensory evoked potentials as a function of graded injury. *J. Neurotrauma* **5**, 151–160.
- SCHLAG, M.G., HOPF, R., and REDL, H. (2001). Serial recording of sensory, corticomotor, and brainstem-derived motor evoked potentials in the rat. *Somatosensory Motor Res.* **18**, 106–116.
- SHIAU, J.S., ZAPPULLA, R.A., and NIEVES, J. (1992). The effect of graded spinal cord injury on the extrapyramidal and pyramidal motor evoked potentials of the rat. *Neurosurgery* **30**, 76–84.
- SUN, T., SCHLAG, M.G., HOPF, R., et al. (2000). Brainstem-evoked muscle potentials: their prognostic value in experimental spinal cord injury in the rat. *Somatosensory Motor Res.* **17**, 317–324.
- THOMPSON, F.J., PARMER, R., and REIER, P.J. (1998). Alteration in rats modulation of reflexes to lumbar motoneurons after midthoracic spinal cord injury in the rat. I. Contusion injury. *J. Neurotrauma* **15**, 495–508.
- THOMPSON, F.J., REIER, P.J., LUCAS, C.C., et al. (1992). Altered patterns of reflex excitability subsequent to contusion injury of the rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* **68**, 1473–1486.
- TRACEY, D.J. (1995). Ascending and descending pathways in the spinal cord, in: *The Rat Nervous System*. G. Paxinos (ed), Academic Press: San Diego, pps. 67–80.
- VALERO-CABRÉ, A., and NAVARRO, X. (2001). H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res.* **919**, 302–312.
- VAN DE MEENT, H., HAMERS, F.P.T., LANKHORST, A.J., et al. (1996). New assessment techniques for evaluation of posttraumatic spinal cord function in the rat. *J. Neurotrauma* **13**, 741–754.
- VERDÚ, E., GARCÍA-ALÍAS, G., FORÉS, J., et al. (2001). Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *Neuroreport* **12**, 2303–2309.
- VERDÚ, E., GARCÍA-ALÍAS, G., FORÉS, J., et al. (2003). Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma* **20**, 483–499.
- XU, X.J., HAO, J.X., ALDSKOGIUS, H., et al. (1992). Chronic pain-related syndrome in rats after ischemic spinal cord lesion: a possible animal model for pain in patients with spinal cord injury. *Pain* **48**, 279–290.
- ZAPPULLA, R.A., HOLLIS, P., RYDER, J., et al. (1988). Non-cortical origins of the spinal motor evoked potential in rats. *Neurosurgery* **22**, 846–852.

Address reprint requests to:

*Enrique Verdú, Ph.D.*

*Departament de Biologia Cel·lular*

*Fisiologia i Immunologia*

*Unitat de Fisiologia Mèdica*

*Edif. M*

*Universitat Autònoma de Barcelona*

*E-08193 Bellaterra, Spain*

*E-mail: Enric.Verdu@uab.es*