



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA

**“EXPRESIÓN DE C-FOS EN EL CEREBELO DESPUÉS
DE LA LESIÓN ESPINAL DE LA RATA MACHO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN NEUROETOLOGÍA**

P R E S E N T A:

Psic. Eduardo Chang Moya

**Director de Tesis:
Dr. César Antonio Pérez Estudillo**

Xalapa de Enríquez, Ver.

Diciembre de 2013

Dedicatoria

A Renato, que has llegado a mi vida para hacerla más valiosa y mis acciones más importantes, desde que naciste todos mis actos van dedicados a tí.

Agradecimientos

A mi familia:

A mis padres; Hipólito, quien me dejó un gran ejemplo y a Esperanza, quien toda mi vida me ha dado amor y cariño.

A mis hermanos; los de sangre que les amo tanto y siempre me hacen fuerte; Isra, Poncho y Fel. También a los que han decidido incluirme dentro de sus vidas a lo largo de los años; Raúl, César, Rafa, Tere, Martín, Hassibe, Manuel, Vicky y Lety.

A mis guías académicos:

Al Dr. César A. Pérez E. por todo el apoyo brindado y a mis Sinodales; Dra. Ma. Leonor López M., Dr. Juan Francisco Rodríguez L., Luis I. García H. y al Dr. Jorge Manzo D.

Así mismo, al Dr. Armando J. Martínez Ch. por su orientación y a la Dra. Celia Reyes L. además de QFI. Silvia Mariscal T.

A mis compañeros de clases, de los cuales obtuve aprendizajes, apoyo y buenos momentos; Luisa, Félix, Pedro, Génesis, José y Paul.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.	3
2.1. La medula espinal.	3
2.2. El cerebelo.	9
2.3. Lesión de medula espinal.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Particulares.....	35
6. METODOLOGÍA.....	36
7. RESULTADOS.....	41
8. DISCUSIÓN.....	52
9. CONCLUSIONES.....	62
10. PERSPECTIVAS.....	63
11. MODELO.....	65
12. BIBLIOGRAFÍA.....	67
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	75
ÁPENDICE A. Fundamento de inmunohistoquímica.....	77
ÁPENDICE B. Escala Tarlov.....	81
ÁPENDICE C. Tablas de medias con error estándar en cada capa analizada de la corteza de cerebelo.....	82

RESUMEN

Actualmente existen diversas líneas de investigación sobre la patofisiología desencadenada frente a un trauma medular en la propia zona de lesión, así como en sitios distales al mismo que poseen conexiones con la médula espinal. El cerebelo, en particular, es la estructura encargada de integrar información de vías sensoriales y motoras con orígenes espinales de forma directa e indirecta. Es en el vermis del cerebelo donde terminan la mayoría de las señales nerviosas de áreas somáticas del cuerpo, lo que le otorga un papel importante en la integración de mecanismos posturales inconscientes. El cerebelo también envía información que controla a los músculos proximales y a las extremidades a través del núcleo fastigiado a la corteza cerebral y al tronco encefálico. Por lo cual, en el presente trabajo se propuso observar por medio de la expresión de la proteína Fos la actividad celular en los diez lóbulos del vermis cerebelar, así como en el núcleo fastigiado en distintos tiempos (6h y 24h) posteriores a una lesión espinal por contusión de la rata macho. Esto con la intención de tener una comprensión más amplia de los procesos patofisiológicos de la lesión espinal.

Los resultados mostraron una mayor expresión de Fos en la capa granular de los lóbulos 1, 5, 7, 9 y 10 y en la capa de Purkinje de los lóbulos 1, 7 y 9 a las 6 h posterior a la lesión espinal. Mientras que 24 h después de la contusión espinal se observó un aumento en la expresión de Fos en la capa granular de los lóbulos 3 y 4. Así mismo, en el Núcleo Fastigiado se observó un aumento a las 24 h posterior a la lesión espinal. Tales resultados indican una reacción del cerebelo producida por la lesión espinal que estaría relacionada con procesos del daño primario (6 h) y del daño secundario (24 h). Esto significaría, que la afectación dada por la lesión espinal produciría un aumento en la actividad neural (por la expresión de Fos) de los lóbulos y del núcleo medial del cerebelo. Lo que se traduciría en alteraciones motoras y autonómicas que se han observado en sujetos con lesión espinal.

1. INTRODUCCIÓN

La médula espinal, compuesta de neuronas y glía, es una continuación del tallo cerebral que transmite información tanto excitatoria como inhibitoria a los músculos, vasos sanguíneos y glándulas. Dicha información es regulada por estructuras supraespinales como el hipotálamo, el cerebelo, núcleos del tallo cerebral, la corteza cerebral, entre otras. En la médula espinal también se llevan a cabo diferentes funciones autónomas y reflejas que requieren los vertebrados para responder a estímulos inmediatos y urgentes demandados por su ambiente.

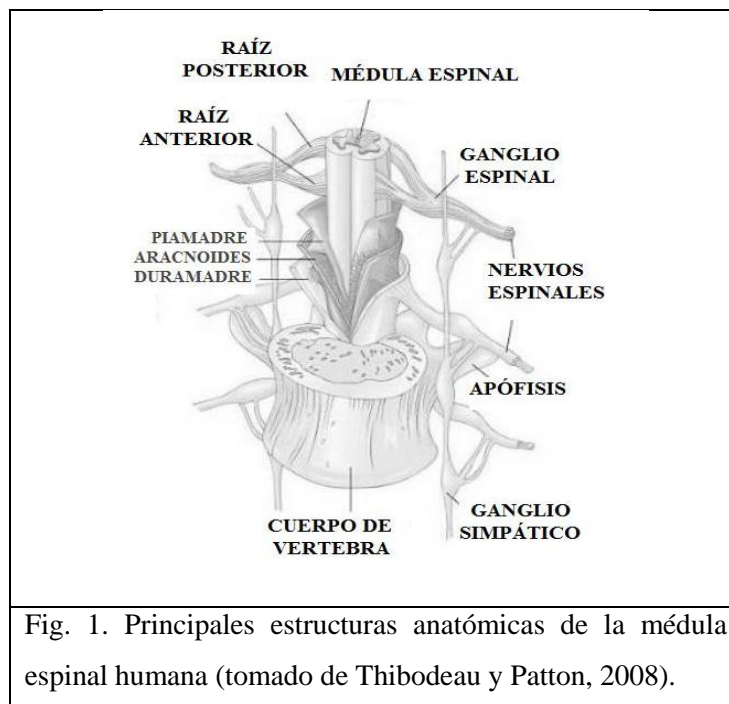
Como se sabe actualmente, la lesión espinal produce dos tipos de daños: *el daño primario*, que se refiere a todos los procesos bioquímicos que se llevan a cabo durante las primeras 24 horas, entre ellos se encuentra la muerte neuronal inmediata generada de forma directa por la lesión, ya sea mecánica o química, y que da como resultado disrupción del tejido nervioso tanto en el axón como en la membrana celular. Los procesos bioquímicos que se llevan a cabo a partir de las 24 horas hasta los siguientes días o semanas después de la lesión es lo que se conoce como *el daño secundario*, entre estos procesos se encuentran la restricción del flujo sanguíneo, excitotoxicidad, inflamación, liberación de radicales libres, apoptosis secundaria; estos procesos que darán como resultado un aumento en el tamaño del área afectada por la lesión espinal. Estas investigaciones del daño primario como del daño secundario suceden en el sitio de lesión espinal.

Sin embargo, estudios recientes han identificado cambios en la expresión de la proteína Fos (la cual es utilizada como un marcador de activación neural) en zonas distales como núcleos del tallo cerebral y del hipotálamo. Al respecto, hasta la fecha no existen reportes sobre los efectos de la lesión espinal en el cerebelo de la rata macho. El cerebelo es una estructura especializada para el aprendizaje y la ejecución motora. Sin embargo, no se conoce la reacción del cerebelo de sujetos que han sufrido una lesión espinal. De esta manera, el principal objetivo de esta Tesis fue el determinar los cambios en la expresión de la proteína Fos en el núcleo fastigiado y los diez lóbulos del vermis del cerebelo después de la lesión de la médula espinal en la rata macho.

2. ANTECEDENTES

2.1. La médula espinal.

Al igual que el resto del sistema nervioso central de los mamíferos, la médula espinal (ME) está constituida por neuronas y glía; las primeras están compuestas por motoneuronas alfa y gama así como las interneuronas 1a y 1b (que comunican información sensitiva y motora), neuronas sensitivas y neuronas autonómicas (Kandel, 2001). Mientras que la glía se constituye por oligodendrocitos, cuya principal función es la mielinización de los axones, astrocitos implicados en la regulación, diferenciación y formación de sinápsis y la microglía que activa o desactiva funciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Bradesi, 2010). La ME al igual que el resto del SNC también se halla protegida por las tres capas de meninges como son la piamadre, la aracnoides y la duramadre (Steinmetz y cols., 2010).



La ME se divide en los denominados **segmentos medulares**. Cada segmento es una división que corresponde en forma aproximada a la distribución de cada uno de los 31 pares de las raíces espinales (Merck, 1999). En el humano se encuentra dividido en 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo. Mientras que en la rata se encuentran 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 coccígeos (Hebel y

Stromberg, 1986). La ME inicia rostralmente conectada con el bulbo raquídeo hasta llegar a las vertebrae lumbares superiores a nivel de L1-L2, aproximadamente en el final del denominado cono medular (Merck, 1999). Concluye al inicio de las raíces nerviosas más caudales; una serie de nervios que salen de las vertebrae espinales y forman la denominada cola de caballo o cauda equina (Steinmetz y cols. 2010).

Al realizar un corte transversal de la ME se observan dos elementos: el centro que está constituida por la sustancia gris, y alrededor de ella se encuentra la sustancia blanca formando los cordones o vías axonales ventrales, laterales y dorsales. De ambas, la sustancia gris es la que posee mayor irrigación sanguínea (Steinmetz y cols., 2010). En ésta es donde podemos encontrar el conducto del epéndimo de la médula espinal (Ganong, 1982) que es el responsable de la producción del líquido cefalorraquídeo (Larsen, 2003). Así mismo, en la sustancia blanca se ubican las fibras nerviosas ascendentes y descendentes de composición principalmente mielínica, las cuales transmiten información sensitiva y motora, respectivamente (Merck, 1999).

Con respecto a la irrigación sanguínea espinal, esta posee una arteria medular anterior y dos posteriores, cada una de ellas con diversas ramas radicales de forma longitudinal. Dichas ramas alcanzan a la médula y nervios espinales para después llegar a las raíces anteriores y posteriores, teniendo un mayor impacto en las últimas (Steinmetz y cols. 2010).

Existen reportes de una amplia variedad de neurotransmisores o neuromodulares que abarcan monoaminas, aminoácidos y neuropéptidos excitatorios e inhibitorios relacionados al procesamiento de información dentro de la médula espinal. En ella, los principales neurotransmisores son el glutamato y la glicina, uno excitatorio y el otro inhibitorio. Así mismo se encuentra la acetilcolina (Purves, D. y cols., 2004), la sustancia P, los CGRP (Bradesi, S., 2010), los péptidos opioides como las encefalinas y endorfinas (Miller, 2008), la sustancia P, el óxido nítrico, la serotonina, la somatostatina, la dopamina, el neuropeptido Y, la vasopresina y la oxitocina, entre otros. Todos ellos con una amplia variedad de receptores a capsaicina (como los vanilloides), nicotínicos, muscarínicos (Budai, 2000), 5-HT₁₋₇, D₂, D_{α2} que actúan en ambas astas y en la materia gris intermedia con procedencias principalmente de los núcleos del tallo cerebral. Otras con procedencia de interneuronas como el aspartato, el glutamato con receptores NMDA, AMPA y kainato, o de células de Renshaw e interneuronas Ia como son la glicina, la nociceptina, la nocistatina y el GABA con

receptores GABA_A y GABA_B modulando aferencias primarias nociceptivas (Nógrádi y Vrbová, 2005).

En 1952, basándose en la citoarquitectura de la materia gris del gato, Rexed estableció 10 láminas dentro de la médula espinal, las cuales a la fecha son consideradas semejantes en el ser humano (Steinmetz y cols. 2010). Estas láminas se presentan diferenciadas en su morfología a lo largo de los segmentos espinales, ya que sus límites pueden ser progresivos o bruscos a lo largo de los segmentos espinales, dependiendo el nivel espinal en el que se encuentren (Steinmetz y cols. 2010). La sustancia gris posee forma de mariposa o de H y se compone de los cuerpos neuronales y de las fibras no mielínicas (Merck, 1999). Se divide en dos astas anteriores ubicadas en la porción ventral y dos astas posteriores en la porción dorsal con una columna intermedia situada de forma lateral en medio de cada asta dorsal y ventral por cada lado (Merck, 1999). Las astas anteriores poseen motoneuronas cuyos axones fungen como fibras eferentes de nervios espinales hacia las fibras y los husos musculares, mientras que en las astas posteriores se localizan fibras sensitivas con orígenes en los cuerpos neuronales de los ganglios de la raíz dorsal, las cuales son las encargadas de la percepción y transmisión de información sensitiva y la conducción de impulsos motores, sensitivos y reflejos entre ambos lados de la sustancia gris y los segmentos adyacentes (Merck, 1999). Por su parte, las columnas intermedias están relacionadas con el sistema nervioso autónomo (Steinmetz y cols. 2010). Las interneuronas (células de Renshaw, por ejemplo) se ubican en toda la materia gris, principalmente en el asta posterior y como su nombre lo indica, se “interponen” entre las neuronas sensitivas y las neuronas motoras para transmitir selectivamente información a las segundas (Willis, 2006). En la médula espinal la existencia de neuronas con axones cortos distribuidas a través de la sustancia gris es rara, probablemente existentes sólo en la sustancia gelatinosa (lámina II). La gran mayoría de neuronas espinales se ubican en las láminas V-VII y son de naturaleza propioespinal pero deben establecer conexiones con células adyacentes por medio de axones colaterales en su camino hacia los cordones o vías ascendentes o descendentes.

En la rata, las principales proyecciones aferentes de la médula espinal tienen sus somas en los pares de los ganglios, al parecer con la excepción de la cervical 1 (C1). Más de dos tercios de los axones en el tracto de Lissauer (posterolateral) de los niveles medio torácico y lumbo-sacro son aferencias primarias. Por lo cual una gran cantidad de

información enviada por la medula a estructuras superiores se ubica dorsalmente (Hebel y Stromberg, 1986).

Como se mencionó anteriormente, la sustancia blanca se divide en tres cordones o fascículos; el anterior, el posterior y el lateral por cada lado. Los cordones anteriores y laterales se dividen en ascendentes y descendentes. Mientras que los cordones ascendentes envían información sensitiva por medio de tractos hacia estructuras supraespinales, los tractos descendentes envían información motriz hacia la médula espinal voluntaria e involuntaria, además de regular procesos autonómicos.

Dentro de los tractos descendentes se encuentra el tracto piramidal que inicia en la corteza motora y es la vía con mayor importancia para el control motor voluntario pues posee vías corticoespinales. A su vez, el tracto extrapiramidal es importante para el movimiento autonómico y aprendido pues posee orígenes del cerebelo, ganglios basales (cuerpo estriado y sustancia negra) y núcleos motores del tallo cerebral (núcleo rojo) (Schuenke y cols., 2007).

En 1981 Kuypers propuso la subdivisión de las vías descendentes del tallo en dos grupos basándose en la distribución de sus terminales y sus propiedades funcionales (Schoenen y Grant, 2004):

Grupo A. Compuesto por los tractos reticuloespinal medial, vestibuloespinal y tectoespinal. Todos localizados ventral y ventrolateralmente con terminaciones frecuentemente bilaterales en la parte ventromedial de la sustancia gris, la cual posee neuronas propioespinales largas e intermedias. Sus aferencias se superponen principalmente con fibras corticoespinales. Estas vías reciben fibras de áreas corticales rostrales al giro precentral y se caracterizan por gozar de muchas colateralizaciones con conexiones directas a motoneuronas del cuello, espalda y músculos de las extremidades proximales. Sus funciones se relacionan con la postura, movimientos sinérgicos de todo el miembro y movimientos de orientación del cuerpo y cabeza (Schoenen y Grant, 2004).

Grupo B. Compuesto por los tractos rubroespinal y pontoespinal del tegmento pontino ventrolateral. Estas vías poseen fibras contralaterales situadas en el fascículo dorsolateral y se caracterizan por sus terminaciones en partes dorsales y laterales de la sustancia gris intermedia, la cual contiene neuronas propioespinales cortas. Este grupo de tractos parecen suministrar el control ejercido por las vías del grupo A y proveen la

capacidad para los movimientos independientes basados en la flexión de las extremidades y hombros, particularmente del codo y mano. Sus vías establecen conexiones monosinápticas con motoneuronas de músculos extremadamente distales en primates y gatos además de mostrar pocas colateralizaciones. Sus áreas de terminación se sobrepone y dirigen a la terminación corticoespinal lateral (tracto piramidal). Sus células, como las del núcleo rojo, reciben aferencias corticales del giro precentral. La distribución espinal de fibras noradrenérgicas y serotonérgicas del tallo cerebral probablemente tenga un papel funcional en el procesamiento sensorial dentro del asta dorsal en actividad autonómica y en el control motor. Por ejemplo, la estimulación eléctrica del núcleo magno del rafe produce un efecto analgésico así como la inhibición en el arco reflejo de flexión espinal (Schoenen y Grant, 2004).

Los tractos ascendentes ubicados en la porción ventrolateral de la sustancia blanca tienen proyecciones espinotalámicas y espinoreticulares. Ambos acarrear información de dolor, temperatura, tacto y presión. En los segmentos más bajos sus axones se localizan con preponderancia dorsolateral y en los niveles más superiores de forma ventromedial. En particular, el tracto espinotalámico tiene su origen principalmente en las láminas I, V, VIII con una decusación en la comisura ventral. Sus terminales axónicas alcanzan al núcleo talámico posterolateral y al núcleo lateral central del complejo intralaminar. En humanos se ha mostrado que tiene implicación en el acarreo de información dolorosa y comezón. Mientras que el tracto espinoreticular asciende en el funículo ventral y lateral terminando en los núcleos de la formación reticular. Se origina bilateralmente en el asta dorsal y ventral. La mayoría de sus fibras son colaterales de neuronas del tracto espinotalámico. Este tracto responde a una serie de estímulos sensoriales. Otros tipos de tractos ascendentes, como el tracto espinotectal posee proyecciones hacia el colículo superior, la sustancia gris central o periependimaria y la formación reticular. En mono se ha reportado en las láminas I y IV-VII. A su vez, el tracto espinocervicotalámico se dirige al núcleo cervical lateral para atravesar posteriormente el lemnisco medio contralateral hacia el núcleo posterolateral ventral y el complejo nuclear posterior del tálamo. La procedencia de dicho tracto se encuentra en todos los niveles espinales del asta dorsal ipsilateral, principalmente en la lámina IV. Sus axones viajan dorsalmente al tracto espinocerebelar. Responde a varios estímulos primarios de receptores cutáneos. Parece contribuir a reflejos condicionados táctiles, discriminación de dos puntos y

discriminación de tamaño. Sobre los tractos espinovestibular y espinoolivario no existen reportes de su existencia en primates, a excepción de la fibra ascendente hacia el grupo Z (núcleo Z) del complejo nuclear vestibular. La función de este tracto es transmitir aferencias de los husos musculares de las extremidades inferiores hacia el tálamo y la corteza. Los tractos espinocerebelares (uno dorsal y uno ventral) proyectan sensación primaria relacionada a las extremidades inferiores y las extremidades superiores (Schoenen y Grant, 2004).

Los cordones posteriores están conformados por el fascículo gracilis y el fascículo cuneiforme, ambos encargados del acarreo de información propioceptiva y táctil discriminatoria ascendente. Particularmente, el fascículo grácil es más medial y está compuesto principalmente de axones aferentes cervicales. Mientras que el fascículo cuneiforme con haces lumbares y sacros es más lateral. Ambos cordones inervan las extremidades inferiores por debajo de T6 (fascículo grácil) y por encima de T6 con una ubicación más lateral (fascículo cuneiforme) (Steinmetz y cols. 2010). Existe evidencia de que ambos fascículos están implicados en tareas de discriminación sensitiva complejas, tales como discriminación entre dos puntos, juzgar la magnitud de la presión cutánea y la habilidad para detectar la velocidad y dirección de un estímulo en movimiento (Schoenen y Grant, 2004).

Como se ha mencionado, la médula espinal posee diversas vías ascendentes que envían información a diversas estructuras supraespinales, entre ellas se encuentran la vía espinotalámica, la espinotectal, la espinoolivario y la espinocerebelosa. Ésta última está comunicada al cerebelo a través de grupos axonales ascendentes que atraviesan diversas estructuras en el tallo y siguen prolongaciones distintas para llegar a su destino final dentro de la capa granular cerebelar. Cabe mencionar que los grupos celulares de la médula espinal que envían proyecciones espinocerebelares han sido estudiados principalmente en gatos, pero diversos trabajos han mostrado que existe una organización similar en otras especies animales como el humano o la rata (Jankowska y Puczynska, 2008).

2.2. El cerebelo.

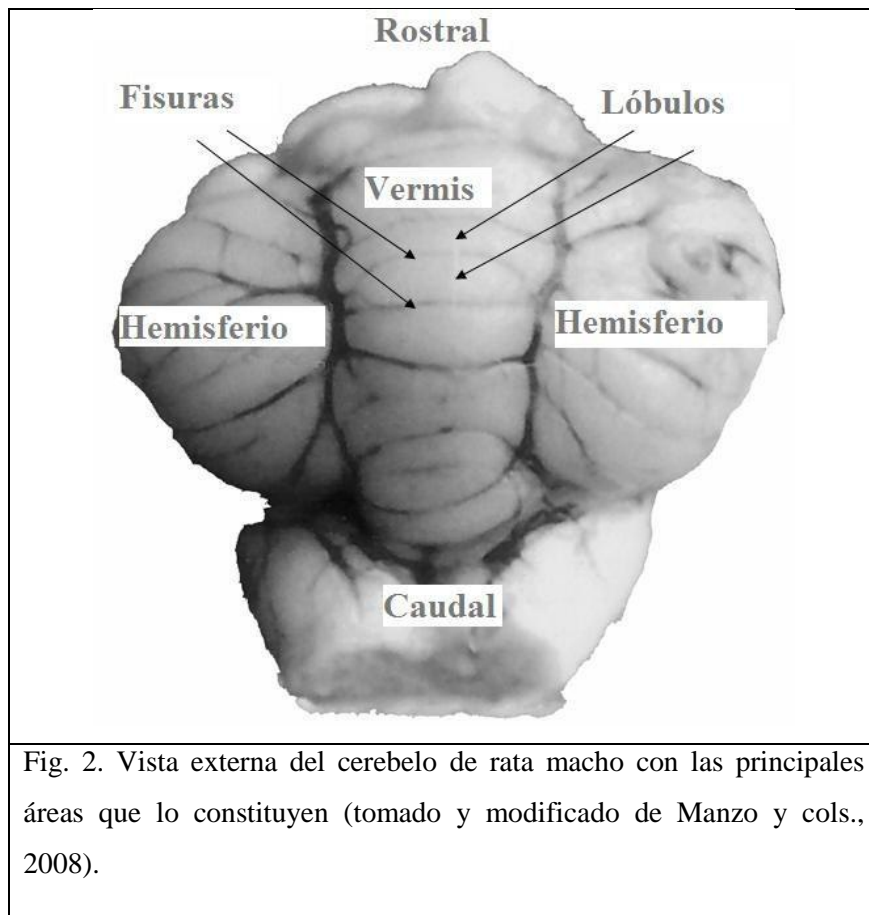
El cerebelo tiene un papel importante en el control motor, la adaptación refleja y el aprendizaje motriz al mediar tanto el ritmo como la coordinación física de las extremidades (Glickstein y Doron, 2008). Esto es posible gracias a distintos tipos de aferencias provenientes del núcleo rojo, la formación reticular, núcleos del puente y del sistema vestibular. Así mismo, de los tractos espinocerebales que llevan información con procedencia de los centros locomotores medulares hacia el cerebelo (Linazasoro, 2002).

Anatómicamente, el cerebelo está colocado en la parte posterior del cuarto ventrículo a nivel del tallo cerebral. Es una masa nerviosa voluminosa que en el humano pesa en promedio 140 g y se encuentra en la parte posterior e inferior de la base del cráneo (Kandel y cols., 2001). Se localiza por debajo de la parte posterior del cerebro del que lo separa un repliegue de la duramadre llamado tienda del cerebelo, el cual se introduce en la cisura transversa. El cerebelo tiene forma ovoide, ligeramente aplanado y con una escotadura central. En la línea media presenta una eminencia longitudinal llamada vermis y a cada lado de éste se encuentran dos eminencias voluminosas denominadas hemisferios cerebelosos. Todo el cerebelo está cubierto por una capa fina de sustancia gris plegada en numerosas circunvoluciones (Figura 2).

División funcional.

A grosso modo cerebelo se divide en tres lóbulos; lóbulo anterior, lóbulo posterior y lóbulo floculonodular. El lóbulo anterior también conocido como paleocerebelo está compuesto por la línula y el lóbulo central. Contiene conexiones recíprocas con la médula espinal y tiene una participación en el control del tono muscular y movimientos axiales y de extremidades. El lóbulo posterior es el más grande y está formado por el culmen, el declive, el folium, el túber, la pirámide y la úvula. El lóbulo floculonodular es la porción más antigua del cerebelo y es llamado también arquicerebelo. Está compuesto por el flóculo y el nódulo y se sabe que su desarrollo está relacionado con el aparato del equilibrio y los núcleos vestibulares. Dicho lóbulo recibe

información a través de las aferencias vestibulares primarias y envía proyecciones a los núcleos vestibulares externos. En los vertebrados superiores controla el equilibrio y los movimientos de los ojos, por lo que recibe el nombre de vestibulocerebelo (Schmahmann, 2004).



De igual forma, el lóbulo posterior está muy crecido en primates, en especial en el humano, formando salientes bilaterales llamadas hemisferios cerebelosos, que también se conocen como neocerebelo ya que representan una zona filogenéticamente reciente. Por otra parte, en los hemisferios cerebelosos terminan la mayor parte de las señales que llegan de los niveles más altos del cerebro, en especial de las áreas motoras de la corteza cerebral (Schmahmann, 2004).

Con respecto al vermis (que significa gusano en latín), posee una medida de dos a tres centímetros de ancho en el humano. Éste se localiza entre dos fisuras

longitudinales en la región ventral que delimitan una cresta elevada en la línea media y se subdivide en 10 lóbulos en dirección rostrocaudal (Larsell, 1948). El vermis recibe señales visuales, auditivas, vestibulares y somatosensitivas de la cabeza y partes proximales del cuerpo. Envía señales a través del núcleo fastigiado a las regiones de la corteza y el tronco encefálico que controlan los músculos proximales del cuerpo y las extremidades. También rige la postura, la locomoción y la mirada, a la vez que recibe aferencias somatosensitivas de las extremidades (Larsell, 1948). El vermis tiene un papel en la integración de los mecanismos posturales inconscientes y es considerado como el cerebelo límbico. En éste terminan la mayor parte de las señales nerviosas que provienen de las áreas somáticas del cuerpo (Schmahmann, 2004).

La Corteza cerebelar

La sustancia blanca del cerebelo esta constituida por los axones que llevan información aferente y eferente al cerebelo, al mismo tiempo que forma parte del tejido de sostén. La corteza cerebelosa o sustancia gris esta constituida por tres capas; de la parte apical hacia la ventral encontramos la capa molecular (M), la capa de Purkinje (Pk) y la capa granular (Gr). En estas capas se hallan distribuidas cinco tipos de neuronas principales: cuatro inhibitorias; células estrelladas o radiadas, células en canasta, células de Purkinje y células de Golgi; y una excitatoria; las células granulares (Apps y Garwicz, 2005). En la Figura 3 se muestra su distribución dentro de la corteza cerebelar.

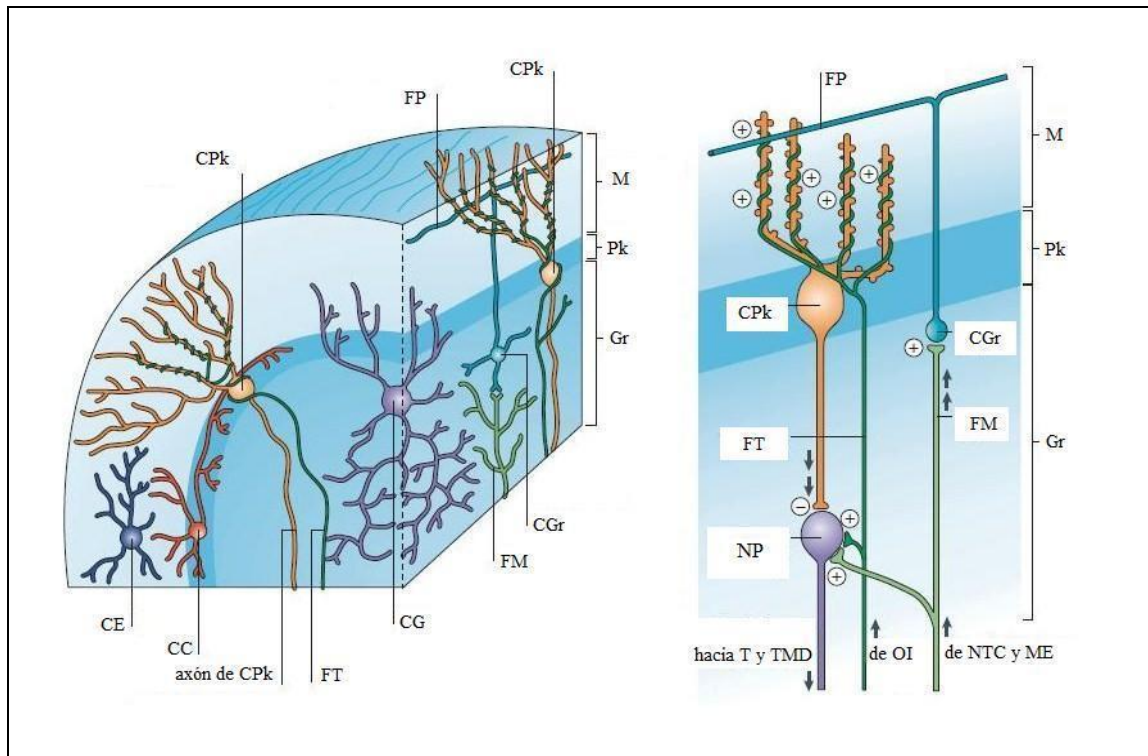


Fig. 3. Estructura básica de la corteza cerebelar con sus tipos celulares con sus aferencias y eferencias. Las abreviaciones de las figuras incluyen: CC, célula de canasta; CE, célula estrellada; CG, célula de Golgi; NP, núcleo profundo; CPk, célula de Purkinje; CGr, célula granular; FM, fibra musgosa; FP, fibra paralela; FT, fibra trepadora; Gr, capa granular; M, capa molecular; ME, médula espinal; NTC, núcleos del tallo cerebral; OI, oliva inferior; Pk, capa de Purkinje; T, tálamo; TMD, tractos motores descendentes (Tomado y modificado de Apps y Gaewicz, 2005).

La capa granular es la más profunda y amplia, se encuentra por debajo de la capa de Purkinje. Esta capa recibe aferencias de las fibras musgosas que tienen su origen en núcleos del tallo y de la médula espinal (Apps y Garwicz, 2005). Al contrario, la capa molecular es la capa más externa de la sustancia gris. En esta capa se localizan dos tipos de interneuronas inhibitoras; las células estrelladas y las células en cesto o de canasta que forman una red de circuitos cuyo blanco principal son las dendritas y los somas de las células de Purkinje, así como los axones excitadores de células granulares (Tohyama y Takatsuji, 1998). Mientras que la capa de Purkinje se halla entre la capa molecular y la capa granular conformada por una hilera de células de Purkinje, tales células están dispuestas de forma uniforme a lo largo de su capa. Éstas células son los blanco de las células granulares, las fibras paralelas y las fibras trepadoras a la vez que sus axones atraviesan la sustancia blanca para alcanzar a los núcleos cerebelosos profundos

(Tohyama y Takatsuji, 1998). Las células de Purkinje procesan la información cortical y son la única eferencia de la corteza del cerebelo (Apps y Garwicz, 2005).

La información espinal llega directamente a la corteza cerebelar a través de las fibras musgosas, las cuales hacen sinapsis con las células granulares que a su vez se bifurcan en la capa molecular para formar las denominadas fibras paralelas que excitan a las células de Purkinje. Al mismo tiempo, las fibras trepadoras proveen eferencia excitatoria a las células de Purkinje a través de la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Ambos receptores se han encontrado presentes tanto en células de Purkinje como en células granulares, por tal motivo estos sistemas aferentes deben obtener efectos más prolongados en la excitación sináptica (Tian y Bishop, 2002). Las células de Purkinje son de naturaleza GABAérgica, por lo cual su función es inhibir a las células de los núcleos profundos del cerebelo para que éstas, a su vez, lleven los impulsos nerviosos al tálamo o a los tractos motores descendentes.

El cerebelo recibe una amplia variedad de aferencias sensoriales y genera proyecciones relacionadas a señales motoras de acuerdo a las reglas internas de la computación. Dichas reglas son determinadas por una conectividad interna de redes neurales y a las propiedades intrínsecas de las neuronas (Apps y Garwicz, 2005). La estimulación de aferencias cerebelares induce la liberación de aminoácidos, monoaminas, y neuropeptidos (Tian y Bishop, 2002). Apps y Garwicz (2005) detallaron un resumen funcional a nivel anatómico y fisiológico basado en los estudios realizados dentro del paravermis cerebelar, el cual que recibe abundantes conexiones con la médula espinal. Los autores analizan la importancia e influencia del paravermis sobre los movimientos voluntarios de los miembros. En ella se discute la integración de recientes hallazgos sobre la conectividad cortical intrínseca cerebelar, así como la especulación sobre cómo ésta organización podría modular el control motor. Bajo este paradigma, la clave principal en el funcionamiento cerebelar es la subdivisión y organización de microcomplejos multizonales (MCMZ). La operatividad de estos microcomplejos se basa en la organización del reflejo de retirada espinal. De forma individual estos microcomplejos podrían mantener informado al cerebelo acerca de los movimientos inapropiados o “errores motores” que están relacionados a los movimientos elementales de un miembro, aquellos que resultan de las contracciones de un músculo simple. Cada MCMZ está compuesto de una tira longitudinal en la corteza

denominada microzona donde las células de Purkinje reciben aferencias por medio de las fibras trepadoras. La microzona es el componente básico del complejo olivo-cortico-nuclear. Las fibras trepadoras median las señales de errores motores en la adaptación de la plasticidad sináptica y del aprendizaje motor al proveer información relacionada a los músculos individuales. Cada microzona podría procesar e integrar información derivada de diferentes fibras musgosas provenientes de la médula espinal y de núcleos del tallo cerebral. Se ha observado similitud entre los campos receptivos del reflejo de retirada espinal (nocioceptivo) por medio de fibras musgosas que terminan en microzonas del paravermis con los de la piel (Apps y Garwicz, 2005).

La importancia del cerebelo como un sitio de almacenamiento de modelos internos del aparato motor depende de su capacidad para transformar cambios adaptativos aferentes y eferentes que incluyen la plasticidad sináptica de las fibras paralelas a las células de Purkinje y de las fibras paralelas a las interneuronas corticales del cerebelo. Las aferencias de las fibras trepadoras y de las fibras musgosas son similares en toda la corteza del cerebelo de todas las especies. Sin embargo, la información no parece derivar de los mismos circuitos espinales. Las similitudes indican que la codificación de información sensitiva es un principio común de las redes espinales. Las células de Purkinje de una microzona tienen campos receptivos inhibitorios relacionados a interneuronas similares a los de las fibras musgosas. En contraste, las fibras paralelas son diferentes y parecen derivarse de fibras musgosas que terminan en regiones no localizadas de la corteza cerebelar (Apps y Garwicz, 2005).

Como se mencionó, la zona media del cerebelo en donde se ubica el vermis recibe aferencias que conducen información visual, auditiva, vestibular y somatosensorial. De igual manera, dicha información regresa mayormente hacia el tallo cerebral (por ejemplo, núcleos vestibulares y reticulares) y un poco más esparcido a las regiones corticales motoras por medio de tálamo (Morton y Bastian, 2003).

En el gato los tractos espinocerebelares ventrales y dorsales, así como las vías espino-retículo-cerebelares proyectan densamente hacia el cerebelo intermedio, además de acarrear signos relacionados a los movimientos rítmicos de las extremidades posteriores. Las eferencias de esas mismas regiones proyectan de vuelta patrones generadores a la médula espinal por medio de los tractos vestibuloespinal, reticuloespinal y rubroespinal (Morton y Bastian, 2003). Por otra parte, la estimulación

en el núcleo interpósito anterior provoca movimientos en las extremidades mediados a través del núcleo rojo y el tracto rubroespinal en dos o tres segmentos de una extremidad ipsilateral (Apps y Garwicz, 2005). Estas vías que se han mencionado se han podido estructurar en base a los experimentos realizados dentro del laboratorio o por medio de padecimientos clínicos reportados en humanos.

Ahora se detallará con mayor énfasis a la vía espinocerebelosa, la cual, como ya se ha mencionado, se divide en dos tractos con orígenes espinales distintos. Como se sabe, es la vía directa de la médula espinal hacia la corteza cerebelar y tiene un papel directo en el acarreo de información sensitiva; tanto propioceptiva, nociceptiva y térmica, entre otras.

Conexiones directas desde la médula espinal hacia el cerebelo

Desde la médula espinal existen dos vías que hacen sinapsis con el cerebelo; el tracto espinocerebeloso dorsal (TECD) y el tracto espinocerebeloso ventral (TECV) que se ubican en ambos lados de la médula espinal. Ambas vías son excitadas monosinápticamente. El TECD es excitado por aferencias primarias y comunica información exteroceptiva y propioceptiva de las extremidades inferiores y está involucrado principalmente en el acarreo de información sensitiva derivada de órganos periféricos como los músculos, articulaciones y piel. Mientras que el TECV recibe entradas dispersas de interneuronas locales y demás sistemas descendentes con una subpoblación que recibe fuertes aferencias musculares. La función del TECV es acarrear información periférica e integrar la actividad de grupos de interneuronas de la médula espinal (Muramatsu y cols., 2009).

En un estudio realizado por Rivero-Melián y Grant (1990) en donde buscaban describir las proyecciones de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) desde segmentos lumbares hacia grupos celulares espinocerebelosos, encontraron que las neuronas con marcaje dentro de la medula espinal se ubicaron mayormente en la lámina V de forma medial y dorsolateral, en el área central de la lámina VII con un marcaje moderado desde L3-L5, en la columna de Clarke (CC) con proyecciones espesas de L1-L6. Las proyecciones del GRD en L1-L3 estaban organizadas somatotópicamente con proyecciones a áreas dorsomediales y de L4-L5 superpuestas sobre la extensión

mediolateral entera en el funículo dorsal, mientras que en el grupo lateral de la lámina IX recibían cantidades pequeñas de marcaje desde L3-L5.

Las conexiones del TECD han sido descritas desde la medula cervical superior, originándose en el núcleo cervical central (NCC) principalmente, desde el ensanchamiento cervical y de un largo número de grupos celulares en la parte más caudal de la médula espinal. Se ha establecido que el NCC entre C1-C3 envía sus axones a través de la línea media de la médula espinal y entra al cerebelo por el pedúnculo cerebeloso superior, principalmente (Boyling y Jull, 2006), pero también a través del cuerpo restiforme o pedúnculo cerebelar inferior. Es importante mencionar que los axones del TECD son directos, es decir, toman un curso espinal sin decusación (Grant y Xu, 1988).

También se ha establecido que las dos terminaciones principales para ambas fibras espinocerebelares son el lóbulo anterior y el lóbulo posterior del cerebelo. Berretta y cols. (1991) analizaron la topografía de las proyecciones al lóbulo anterior del cerebelo e investigaron si las proyecciones a ambos lóbulos provenían de diferentes neuronas espinocerebelosas o de axones de las mismas células. Para ello, utilizaron la peroxidasa de rábano con aglutinina de germen de trigo (WGA-HRP, por sus siglas en inglés), el cual funje como un marcador anterógrado. Usaron además técnicas de doble marcaje retrogrado para calcular la incidencia de neuronas espinocerebelares que proyectan a los dos lóbulos del cerebelo (anterior y posterior) por medio de axones colaterales. El marcaje anterógrado confirmó que, al igual que otras especies de mamíferos, la rata posee proyecciones espinocerebelares a dos diferentes regiones de la corteza cerebelar: los lóbulos 1-5 y 8, principalmente. En el mismo estudio no se observaron diferencias en la distribución aferente proveniente de diferentes segmentos espinales hacia cualquiera de los dos lóbulos. Las células de doble marcaje fueron localizadas principalmente en los segmentos torácicos superiores y lumbar superior, casi exclusivamente en la columna de Clarke y en la parte dorso-lateral de la lámina VII (la región de las células periféricas espinales). Es probable que la mayoría de todas las neuronas espinocerebelares en esas estructuras envíen información a ambos lóbulos. Por lo tanto, los dos lóbulos del cerebelo posiblemente reciben información común de esas células pero diferente de neuronas espinocerebelares que envían sólo a uno u otro lóbulo.

Por otro lado, Matsushita (1999) investigó si las proyecciones de las fibras espinocerebelosas originarias de segmentos medulares lumbares y caudales, consideradas como origen del TECV, proyectaban a los núcleos profundos del cerebelo en la rata. Con el empleo de dextrano amino biotinilado (BDA) descubrió que existe una mayor distribución en el núcleo interposito anterior de forma contralateral principalmente, con una mayor cantidad en la parte ventral de niveles rostrales y escasos en la parte media de dicho núcleo. Mientras que en el núcleo fastigiado tal distribución se halló en partes rostromediales limitadas de la subdivisión media y caudomedia. Por otra parte, hubo una pequeña cantidad en el núcleo interposito posterior de su parte media. Las neuronas de las áreas estudiadas (láminas VII y VIII de los segmentos lumbosacros) poseen aferencias de músculos del piso pélvico, extremidades y cola. Las neuronas de estas regiones envían información necesaria para el balance y mantenimiento de la postura, aferencias musculares y cutáneas de extremidades hacia corteza y núcleos cerebelares así como el tálamo.

En el humano se sabe que las fibras del TECD proyectan a los lóbulos 6 y 7 del hemisferio cerebelar, los lóbulos 2 al 5 del vermis, y al lóbulo 7 del lóbulo posterior a través de los pedúnculos cerebelares inferiores. En las ratas, así como en humanos, las fibras del TECD proyectan ampliamente al lóbulo anterior y posterior del cerebelo ipsilateral a través del pedúnculo cerebelar (Muramatsu y cols., 2009).

Los estudios referidos hasta el momento han servido para hacer una descripción a nivel anatómico de las conexiones espinocerebelosas. Sin embargo, no existen datos acerca de la reacción del cerebelo en un sujeto que sufre una lesión espinal, de tal forma que cualquier lesión podría dañar estas vías espinocerebelosas.

12.3. Lesión de medula espinal.

La médula espinal es considerada como el puente de comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo, ya que transmite información motora y sensorial entre ambos (Maynard y cols., 1997; Merck, 1999). Como se ha mencionado, dicha información es regulada por estructuras supraespinales como el hipotálamo (Pérez y cols., 2005), el cerebelo (Schoenen y Grant, 2004) y la corteza cerebral (Merck, 1999). En ella también se llevan a cabo diferentes funciones autónomas y reflejas que requieren los vertebrados para responder a estímulos inmediatos y urgentes (Schoenen y Grant, 2004).

La lesión de médula espinal (LME) es producida por una gran diversidad de factores, principalmente debido a accidentes automovilísticos, así como caídas, heridas por arma de fuego o punzocortantes (Estrada-Moncada y cols., 2007). Anualmente, la incidencia de lesión espinal en países industrializados se ubica entre 11.5 y 53.4 por millón de habitantes (Steinmetz y cols., 2010). Mientras que en nuestro país existe un estimado de aproximadamente 18.1 por millón de habitantes de lesiones espinales al año, las cuales acontecen en hombres en edad productiva que va de los 16 a los 35 años de edad. En Estados Unidos se calcula que cada año ocurren cerca de 10 mil a 11 mil nuevos casos de lesión espinal. Existe la posibilidad de que dichos datos estén subestimados, ya que no existe un registro exacto, pues se calcula que 20 personas por millón de habitantes mueren antes de llegar al hospital. La mitad de este tipo de lesión es ocasionada por accidentes vehiculares, el 20% por caídas, un 15% en actos de violencia y 14% en accidentes deportivos además de etiologías patógenas como tumores o hernias. Así mismo, los diferentes tipos de lesiones que abarca éste trastorno son muy amplios. La lesión espinal puede ser de tipo completa o parcial; la primera provoca la pérdida de toda sensibilidad y movimiento voluntario por debajo de la lesión, mientras que en la segunda se pueden dañar únicamente algunas vías ascendentes o descendentes (Kandel, 2001).

A nivel emocional, un sujeto con lesión espinal presenta una grave depresión producida por la pérdida del control del cuerpo aunado a problemas sociales, económicos y laborales (Merck, 1999). En Estados Unidos el costo anual para las personas que sufren este tipo de lesión es de 11 mil millones de dólares. Según datos de la Universidad de Alabama en ése país, para el año 2002 el 82% de los pacientes pertenecían al sexo masculino con una edad promedio de 31 años (Estrada-Moncada y cols., 2007).

Los niveles espinales de mayor vulnerabilidad son las vértebras cervicales inferiores y la unión torácica lumbar por su mayor fragilidad a la movilidad. Según el segmento medular donde se encuentre la lesión será el tipo de sintomatología que se presente. De manera general, por encima del segmento T1 se producirá ausencia de movimientos y sensibilidad en las cuatro extremidades (tetraplejía) y por debajo del mismo supone una pérdida de movilidad así como de sensibilidad por debajo de la cintura (paraplejía) (Netter, 2002). Mientras la lesión se encuentre en segmentos

medulares más cercana a estructuras supraespinales, mayor será el riesgo de perder funciones motrices y autonómicas. En base a las estructuras de las que es responsable cada segmento espinal será como se presente la afectación. Las lesiones a nivel cervical tienen generalmente como resultado una tetraplejia total o parcial. Dependiendo de la localización exacta de la lesión se pueden preservar algunas funciones del organismo (NINDS, 2005). En la Tabla 1 se puede observar el área afectada de acuerdo al nivel del segmento medular dañado.

Nivel	Función
C1-C6	Flexores de cuello
C1-T1	Extensores de cuello
C3, C4, C5	Soporte del diafragma (principalmente C4)
C5, C6	Movimiento de los hombros, elevación del brazo (deltoides); flexión del codo (bíceps); C6 rotación externa del brazo
C6, C7, C8	Extensión de codo y muñeca (tríceps y extensores de muñecas); pronación de la muñeca
C7, C8, T1	Flexores de muñeca
C8, T1	Soporte a algunos pequeños músculos de la mano
T1-T6	Músculos intercostales y tronco por encima de la cintura
T7-L1	Músculos abdominales
L1, L2, L3, L4	Flexión del muslo
L2, L3, L4	Aducción del muslo
L4, L5, S1	Abducción del muslo
L5, S1 S2	Extensión de la pierna en la cadera (Glúteo mayor)
L2, L3, L4	Extensión de la pierna en la rodilla (Cuádriceps)
L4, L5, S1, S2	Flexión de la pierna en la rodilla (ligamento de la corva)
L4, L5, S1	Dorsiflexión del pie (tibialis anterior)
L4, L5, S1	Extensión del dedo del pie
L5, S1, S2	Flexión plantar del pie
L5, S1, S2	Flexión de los dedos del pie
Tabla 1. Relación de funciones perdidas en cada segmento vertebral producidas por una lesión espinal en humano. Kirshblum S, y cols. (2001)	

Síndromes espinales.

Las lesiones se pueden producir por compresiones, abscesos o hematomas tanto epidurales como subdurales, siringomielia (quiste o cavidad llena de líquido cefaloraquídeo), trastornos vasculares (infarto medular o malformaciones arteriovenosas), paraparesia espástica hereditaria (debilidad muscular espástica en los miembros inferiores con un desarrollo gradual), mielitis transversa aguda (síndrome donde una inflamación aguda afecta a la sustancia gris y blanca en uno o más segmentos torácicos cercanos) y traumatismos medulares (Merck, 1999).

Una lesión completa produce una parálisis flácida con disminución de la sensibilidad y de los reflejos abarcando funciones autonómicas por debajo del sitio de lesión. En la evolución de la lesión, la parálisis flácida se tornará en espasticidad a las horas o días como producto de una exageración de los reflejos de estiramiento normales (pérdida de inhibición). En caso de no haber sido afectada la medula lumbar, habrá una recuperación de los reflejos tendinosos y autonómicos. Mientras que una lesión incompleta generará deficiencias sensitivas y motoras. Dentro de las deficiencias sensitivas, si se afectan las columnas posteriores el sentido de la posición, la vibración y el tacto fino se verá comprometido (Tator, 1998). Si los tractos espinotalámicos son dañados habrá una deficiencia en la sensibilidad térmica. La hemisección o síndrome de Brown-Sequard, por su parte, produce espasticidad y deterioro sensitivo con respecto a la posición ipsilateralmente por debajo de la lesión y alteración térmica contralateral (Merck, 1999). Mientras que el síndrome de los cordones posteriores produce pérdida bilateral de sensibilidad vibratoria posicional, propioceptiva por debajo de la lesión, discriminación entre dos puntos, tacto y percepción de peso. También existe afectación en los umbrales sensitivos y movimientos de manipulación de presión de dedos. Cabe mencionar que el efecto ipsilateral es producido por una lesión en la médula y el efecto contralateral si es a nivel del tronco encefálico o el tálamo (Steinmetz y cols. 2010). Tator (1998) observó que las lesiones incompletas mejoraban más que las completas, esto es, presentaban una mayor y más extensa recuperación.

La contusión en la médula espinal, un tipo de lesión incompleta, afecta las funciones neurológicas brevemente y de forma mas prolongada si se trata de una compresión, mientras que será permanentemente en una sección completa. En ella aparece inmediatamente un edema medular y se incrementa la presión intradural, lo cual generará una disfunción severa durante algunos días. Posterior a ello, habrá una mejoría

con una incapacidad residual Una lesión en la cola de caballo produce deficiencia motora y sensitiva parcial. En caso de destruirse los arcos reflejos de funciones como la micción, función intestinal, eréctil en varón y respuesta sexual en mujer es difícil su recuperación acabando en impotencia permanente y pérdida del control de esfínter a nivel vesical o rectal. Las vías nerviosas dañadas completa o severamente durante una lesión espinal no pueden regenerarse naturalmente, únicamente en casos de contusión o sección completa. Dicha recuperación se presenta a la primera semana posterior al daño como un indicador de una recuperación favorable pero si se mantiene mas de seis meses la probabilidad es que sea permanente (Merck, 1999).

El cuadripléjico con lesión de C4 posee un buen uso de los músculos esternocleidomastoideo, paraespinal cervical superior y trapecio. Como consecuencia de la lesión está incapacitado para realizar una función voluntaria en brazos, tronco y extremidades inferiores. En cambio, el lesionado con buen funcionamiento en el nivel C5, esta posibilitado para emplear los músculos deltoides y bíceps. Lesionados en los niveles C4-C5 requieren ayuda para su incorporación. En el daño a C6 tiene inervación completa de la musculatura del hombro, flexión del codo y extensión radial de la muñeca. En C7 se pueden utilizar los tríceps y de los flexores intrínsecos de los dedos. A nivel torácico se conserva un funcionamiento normal de las extremidades superiores con una gran estabilización del tórax pero sin un equilibrio completo del tronco. Por ejemplo, en nivel T12 se tiene buen control abdominal y de la espalda. A nivel lumbar, los flexores de la cadera y los extensores de la rodilla en bípedos están inervados, pudiendo ponerse de pie y caminar sin un apoyo externo. La marcha será inestable por la debilidad del glúteo y la poca fuerza del tobillo. Los efectos de una lesión en la región lumbar o sacra de la médula espinal son la disminución del control de las piernas y de la cadera, así como del sistema urinario y el ano (NINDS, 2005).

El daño primario y el daño secundario en la lesión de médula espinal.

Se sabe actualmente que la lesión espinal produce dos tipos de daños: el daño primario que se refiere a la pérdida de sensibilidad y motricidad inmediata por debajo del sitio de lesión, y el daño secundario que se refiere a una serie de procesos relativos a la restricción del flujo sanguíneo, excitotoxicidad, inflamación, liberación de radicales libres, apoptosis, y aumento del tamaño del área afectada por la lesión de la médula espinal (Nieto-Sampedro y cols., 2002) por la invasión de células del sistema inmune

como neutrófilos, células T, macrófagos y monocitos (NINDS, 2005). Dentro de este daño secundario, la lesión de la médula espinal induce respuestas bioquímicas tardías que afectan la pérdida neuronal y por consecuencia su restauración espinal. La modulación de los procesos restaurativos incluye factores involucrados en la facilitación o inhibición de la regeneración de neuritas, los cuales están regulados frecuentemente en varios genes y por proteínas después de la lesión (Wu y cols., 2005). Así, se sabe que después de una lesión de médula espinal hay numerosos cambios en la expresión de genes que parecen contribuir a cualquier neurodegeneración (Muñoz-Quiles, 2007) o a procesos restaurativos (Ruggiero y cols., 1997).

El daño primario es producido por el traumatismo directo. Los desplazamientos óseos y/o ligamentos dentro del canal medular generan un daño comprensivo provocando edema y hemorragias; elongación y/o corte de elementos neurales y vasculares, generando tensión dentro de los tractos axonales y constricción de vasos sanguíneos intramedulares. Cuando se produce una compresión medular dos factores juegan un papel preponderante: la duración y la magnitud de la fuerza, siendo la primera la de mayor preponderancia. Este trauma mecánico inmediato al trauma original se expresa como un proceso pasivo consistente en una disrupción axonal y ruptura de membranas celulares con liberación de electrolitos celulares, metabolitos y lisosomas de los tejidos dañados. A los pocos minutos microhemorragias por ruptura de las vénulas postcapilares o de las arteriolas sulcales provocan edema y aumento de la presión intersticial (hipoxia perilesional). Si el daño no es severo, este sangrado cesará en pocos minutos, a partir de lo cual, comenzará la acción de los macrófagos conformándose la cicatriz glial (Rodríguez, 2004). Existe evidencia experimental donde la rápida resucitación hemodinámica favorece la recuperación neurológica, limitando los eventos en cascada antes mencionados. A su vez, la severidad del daño secundario está influenciada por el edema o inflamación (con liberación de electrolitos K^+ a nivel extracelular y Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} a nivel intracelular), la isquemia o daño a nivel celular producido por la privación del riego sanguíneo seguida de una fase de hiperemia por una reducción del pH perivascular ocasionada por la acumulación de metabolitos ácidos tales como el lactato, liberación de radicales libres superóxidos, acumulación a los 15 minutos de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (lo que facilita el influjo de Ca^{+2} a la célula), lo cual produce una hiperexcitación a las células vecinas (Rodríguez, 2004).

Existen marcadores para la reacción de los radicales libres de oxígeno tras la lesión como son el aumento en los productos de oxidación de ácidos grasos así como un descenso de antioxidantes y productos de la oxidación del colesterol. La peroxidación de lípidos comienza casi de inmediato tras una LME. Esto puede explicar el período crítico en la efectividad de los corticoesteroides en un tiempo menor a 8 horas posterior a la lesión espinal. Así como del aumento de NMDA proporcional a la severidad de la lesión y la parálisis producida, posiblemente debido al glutamato.

También existe una mayor liberación de factores de crecimiento alterando la regeneración y respuestas inmunológicas benéficas y no benéficas después de la lesión. Al respecto de este último, se estudia el papel de las moléculas inflamatorias en el desarrollo del dolor, control y prevención con interleucinas, que regulan la activación, diferenciación o proliferación de anticuerpos para las células del sistema inmune (Rodríguez, 2004). La zona lesionada también es infiltrada por neutrófilos que pueden fagocitar restos tisulares, así como colaborar en la homeostasis. Los neutrófilos se acumulan en mayor medida a las 3 horas hasta los 3 días. Estos leucocitos producen proteasas y especies reactivas de oxígeno, lo cual puede estar estrechamente implicado en el daño secundario (Steinmetz y cols. 2010). Con respecto a la excitotoxicidad, los receptores NMDA, AMPA y kainato son activados por glutamato. Durante la hipoxia existe un aumento en la toxicidad por glutamato. Este neurotransmisor aumenta el Na^+ intracelular provocando edema y acidosis intracelular, así como un aumento de Ca^{+2} que activa proteasas y lipasas dependientes de él como las calpaínas, las fosfolipasas A2, la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (Steinmetz y cols. 2010).

La atracción de macrófagos, así como de monocitos aunados a la activación de la microglía local aumenta a los 7 días y su período de estabilidad ocurre de las 2 a 4 semanas después de la lesión. En estos fenómenos son segregadas sustancias citotóxicas como el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) y la interleucina-1 (IL-1). Ambas participan en la fagocitosis de restos necróticos y pueden estimular la atracción de linfocitos (células inflamatorias) que provocan la expresión de ciclooxigenasa, la que descompone el ácido araquidónico en prostaglandinas para favorecer la lesión tisular y promoción en el aumento de la permeabilidad vascular, además de agregación plaquetaria y trombosis (Steinmetz y cols. 2010).

Ambos eventos, el daño primario y el daño secundario, tienen una misma consecuencia final: la muerte neuronal. La lesión primaria es inmediata e irreversible, y la lesión secundaria es la subsecuente activación de cascadas de muerte celular, mediando la recuperación del tejido dañado, pérdida y atrofia neuronal y la muerte celular retrógrada (Xu y cols., 2006). También los axones dañados se vuelven disfuncionales debido a que perdieron su mielina o quedaron desconectados de estructuras supraespinales. Inmediatamente las células gliales se agrupan para formar cicatriz, lo cual crea una barrera para cualquier axón que podría potencialmente regenerarse y reconectarse.

En otro estudio se utilizó el NADPH-d como un marcador de células productoras de óxido nítrico posterior a una semana de la lesión espinal en la rata. En el mismo se realizó una inmunohistoquímica para la proteína Fos con la intención de identificar los patrones basales de activación en ese tiempo. El uso del gen c-fos como un marcador funcional de neuronas activas en el sistema nervioso central se expresa en condiciones basales (tanto su mRNA como sus niveles de proteína) y su expresión puede ser alterada en respuesta a diversas señales extracelulares como factores de crecimiento, despolarizaciones, iones (incremento de Ca^{2+} y elevación intracelular de Ca^{2+}), neurotransmisores o factores de crecimiento como respuesta a cambios fisiológicos derivados del ciclo circadiano, conductas de apareamiento o lactancia, factores ambientales, respuestas olfativas, aplicación de fármacos o diversos estímulos estresantes (Kovács, 2008). Se examinaron segmentos espinales adyacentes al sitio de la lesión así como distantes. Los datos de este estudio mostraron una reducción significativa de marcaje a NADPH-d en el asta dorsal superficial de los animales con lesión, y un incremento significativo en la expresión del mismo en neuronas bipolares pequeñas y motoneuronas largadas del asta ventral en el sitio de lesión únicamente (Allbutt y cols., 2007). En los niveles de expresión de Fos se observaron reducciones significativas en todas las láminas espinales de los segmentos lesionados y distantes de las ratas. La única excepción fue un incremento dramático en el núcleo parasimpático sacro. Por lo cual se concluye que un incremento en la expresión de NADPH-d está relacionado a las condiciones del sitio de lesión, mientras que los cambios en la expresión de Fos probablemente a cambios más globales de actividad neuronal posterior a la lesión espinal.

Por su parte, Liu y cols. (2002) investigaron de manera más específica la expresión de los genes para tres isoenzimas que sintetizan el óxido nítrico en el tejido de médula espinal a 2, 6, 12, 24 y 48 horas posterior a una lesión por compresión. Particularmente, ellos analizaron la expresión de los genes para nNOS y iNOS, los cuales se detectaron regulados a la alta posterior a la lesión, alcanzando un pico máximo a las 6 horas. Por su parte, la expresión del gen de iNOS fue observada sólo en los grupos de lesión y regulados a la alta gradualmente después de la misma, alcanzando su grado máximo a las 24 horas. A este nivel, la lesión de médula espinal inicia una regulación a la alta temprana de nNOS y tardía de iNOS. Dichos resultados nos dan la pauta de que las diferentes isoenzimas NOS deben jugar papeles diferentes en la lesión espinal secundaria.

Además de los procesos antes mencionados, pueden activarse las vías fosfolipasa A2 y lipasa diacilglicerol/C que producen cambios en la composición de los fosfolípidos que influirán en la integridad de la membrana, es decir, de su permeabilidad y de su fluidez. Esto puede causar disfunción celular, acumulación de electrolitos y o muerte celular (Steinmetz y cols. 2010).

Se ha reportado, que la necrosis y la apoptosis son dos procesos de muerte celular posterior a un traumatismo medular; ambos con diferentes mecanismos fisiopatológicos. El primero es un fenómeno pasivo sin consumo de energía que causa muerte celular de forma pasiva y fuera del control celular. Existe un aumento del tamaño celular que produce disrupción de la membrana celular y lisis generando una respuesta inflamatoria que aumenta la compresión mecánica dentro del estuche óseo así como digestión celular y la liberación del contenido citoplasmático como enzimas destructivas, flujo de iones y alteraciones en las membranas de las células vecinas. Varios eventos después de un trauma espinal llevan a la desintegración de la membrana celular (peroxidación lipídica de la membrana celular). Algunos de esos eventos son la entrada de calcio intracelular, aumento de radicales libres, aumento de ácido araquidónico y su metabolismo produce radicales libres que acaban con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Rodríguez, 2004).

Por otra parte, la apoptosis sucede en forma activa sin compromiso de la membrana celular y por tanto, sin una respuesta inflamatoria o liberación de tóxicos que dañe estructuras vecinas, pero sí condicionado por un medio desfavorable. Es altamente

regulada a nivel genético con una participación activa de la célula en su inicio y progresión, pudiendo afectar tanto neuronas como glía. El pico vinculado a la apoptosis es entre las 4 y las 8 horas al igual que la cascada secundaria (Rodríguez, 2004). Parece ser que puede ser inducida por factores exógenos como el glutámico, iones de calcio o radicales libres, factores proteicos como el Fas ligando e incluso por sustancias excretadas por algunas células como las citoquinas o el óxido nítrico (Zurita y cols., 2002).

La técnica de TÚNEL se usa para detectar células apoptóticas, sin embargo, esta técnica no es capaz de discriminar entre las células apoptóticas y las células necróticas. La CD95 es una glicoproteína de membrana de 48 kD ubicada en la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso y del factor de necrosis tumoral (GNF y TNF, por sus siglas en inglés respectivamente). Ésta glicoproteína se considera un mediador importante en la inducción de apoptosis. En el estudio realizado por Zurita y cols. (2002) se observó que tras una hora de la lesión espinal las células con marcaje positivo a CD95 fueron de naturaleza neuronal. A las ocho horas la apoptosis se extendió entre la sustancia gris y la sustancia blanca y para las 72 horas se localizó fundamentalmente en la sustancia blanca. Después de una semana pocas células expresaron CD95 y a las cuatro semanas este antígeno ya no fue detectado. El pico máximo de expresión se encontró a las ocho horas de la LME. En comparación con otros estudios, se puede concluir que la intensidad de la lesión es un factor que influye de forma significativa en el desarrollo y extensión de la apoptosis. Otros autores reportan también que en segmentos adyacentes a la lesión se observó apoptosis en células oligodendrogiales entre las cuatro y las nueve horas después del trauma.

Katoh y cols. (1996) utilizando técnicas como la fragmentación de ADN, observaron la positividad a CD95 en etapas más tempranas, debido posiblemente a que la proteína CD95 se expresa en el tejido dañado antes de que tenga lugar la fragmentación nuclear. En base a los resultados obtenidos en este estudio parece evidente que un bloqueo de CD95 mediante anticuerpos anti-CD95 podría inhibir la apoptosis inducida por diversos mecanismos, medidas que deberían aplicarse dentro de las primeras ocho horas tras la lesión espinal. También es posible que las caspasas, familia de la cisteína, tengan implicaciones en este proceso. La caspasa-3 puede iniciarse de modo inmediato en la zona de lesión, principalmente en los

oligodendrocitos de forma diferida en sitios cercanos o distales. Los posibles mecanismos pueden ser tanto cambios en el ambiente celular, como degeneración walleriana, una mayor activación microglial o una respuesta a la activación de receptores.

En un estudio realizado por Ruggiero y cols. (1997), cuyo objetivo fue identificar qué poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central y periférico respondían a una lesión espinal severa. Por medio del análisis de la expresión del gen c-fos y teniendo como antecedentes que la actividad simpática es regulada a nivel espinal en ausencia de una dirección supraespinal, aunado a que la conservación de la misma actividad depende en parte de la integridad de las aferencias de la raíz dorsal. En dicho estudio se analizaron los segmentos espinales C1-C5, C7-T4, T6-T10, T12-S1 y los GRD de C3, C5, T1, T6, L2 y L4. Las láminas I, II, III, IV, V y VI de la sustancia gris que transmiten signos sensoriales o estímulos nocivos y que son activadas al caminar no mostraron inmunoreactividad a Fos. Al respecto, los autores sugieren la posibilidad de que la inmunohistoquímica carezca de sensibilidad para detectar c-fos (el cual es un marcador de activación neural) en algunos grupos celulares en el sitio de lesión espinal. Las neuronas que expresaron Fos ocuparon láminas que reciben aferencias somáticas y viscerales, las cuales son responsables de transmitir respuestas a estímulos nocivos con presencia de interneuronas simpáticas. Por tanto, es concebible que las células que responden a una lesión espinal aguda, puedan someterse a modificaciones extensas en estructura y función. Esas alteraciones deben ser responsables del síndrome de hiperreflexia autonómica. Por otra parte, los GRD no expresaron inmunoreactividad a Fos en animales controles ni experimentales, quizás al no ser sensibles sus neuronas a un gen de activación temprana. Los patrones de marcaje en la médula espinal debieron ser resultado de la desinhibición, consecuencia de la interrupción en vías descendentes originadas en el tallo cerebral descendente y médula espinal cervical superior. El desencadenamiento simpático incrementó el nivel vascular posterior a la lesión espinal, sin embargo no existe documentación anatómica de este fenómeno. Los resultados del trabajo, junto con la evidencia fisiológica indican que el desencadenamiento simpático vascular es restaurado rápidamente o, quizás mantenido en la rata a nivel espinal como una respuesta inmediata a una lesión espinal grave. Dado que los anestésicos deprimen las neuronas espinales pero no los receptores sensores periféricos, la respuesta a la lesión medular en el estado de recuperación debe ser mayor que el observado

experimentalmente. Finalmente en este trabajo se postula que el estímulo periférico, procesado por los circuitos reflejos simpáticos espinales, puede regular la salida autonómica en la ausencia de control supraespinal.

Por otro lado y en relación a los tratamientos o terapias para la lesión de médula espinal, no existe ninguno completamente eficaz que pueda contrarrestar los efectos adversos generados por un tipo de daño espinal. Sin embargo, un tratamiento farmacológico aplicado a nivel clínico y que ha brindado resultados medianos para los traumatismos medulares es la metilprednisolona, un corticoide (30 mg/kg i.v. en 1 hora seguido de 5,4 mg/kg/h durante las siguientes 23 h). Tal medicamento ha mostrado tener ciertas ventajas en las primeras 8 h posterior al daño medular (Bracken y cols. 1990; Merck, 1999) y un mejoramiento referente a procesos apoptoticos a las 24 h en las células oligodendrogiales (Vaquero, Zurita y Oya, 2004). Una de las posibles razones por la cual ningún tratamiento ha logrado al día de hoy el objetivo de rehabilitar significativamente a las personas que han sufrido una lesión espinal severa es el abordaje que se le ha dado al estudio de éste padecimiento. La mayoría de los estudios se centran en los fenómenos patológicos dentro y cerca del sitio de lesión. Pero es importante recordar que como ya se ha mencionado, la médula espinal se encuentra comunicada con diversos núcleos y áreas del sistema nervioso ubicadas fuera de la médula espinal y que cumplen diversas funciones autonómicas y motoras, los cuales han mostrado repercusiones frente a un daño medular.

Estudios realizados en áreas distales después de un traumatismo medular espinal.

Se han realizado estudios para analizar los efectos de la lesión espinal en neuronas localizadas en sitios distales como son aquellos hechos en la región lumbosacra donde se encuentran motoneuronas espinales que inervan al músculo Pubococcígeo y que participan en procesos reproductivos y autonómicos (Manzo y cols., 1997; 1999; 2000). Así, en un estudio realizado con ratas macho de 2, 4 y 6 semanas de evolución posterior a una sección completa de la médula espinal a nivel T8 (Pérez y cols., 2005) se ha analizado el efecto producido por la espinalización sobre la morfología de motoneuronas que inervan al músculo pubococcígeo (Pc). En este estudio, se observó que los parámetros morfométricos fueron disminuidos en el grupo

de ratas con la lesión espinal y que el principal parámetro morfométrico afectado se observó en las dendritas. Tales efectos observados por la lesión espinal fueron representados por alteraciones en la distribución intracelular de peroxidasa de rábano. Esta interpretación de resultados permitió determinar que la lesión de la médula espinal parece estar ejerciendo efecto en el circuito endocrino del sistema nervioso central por las vías ascendentes, entre las que se incluyen a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) que envían sustancias como la oxitocina, la cual promueve el transporte neuronal hacia las regiones en donde se encuentran las motoneuronas que inervan al Pc (Tabla 2).

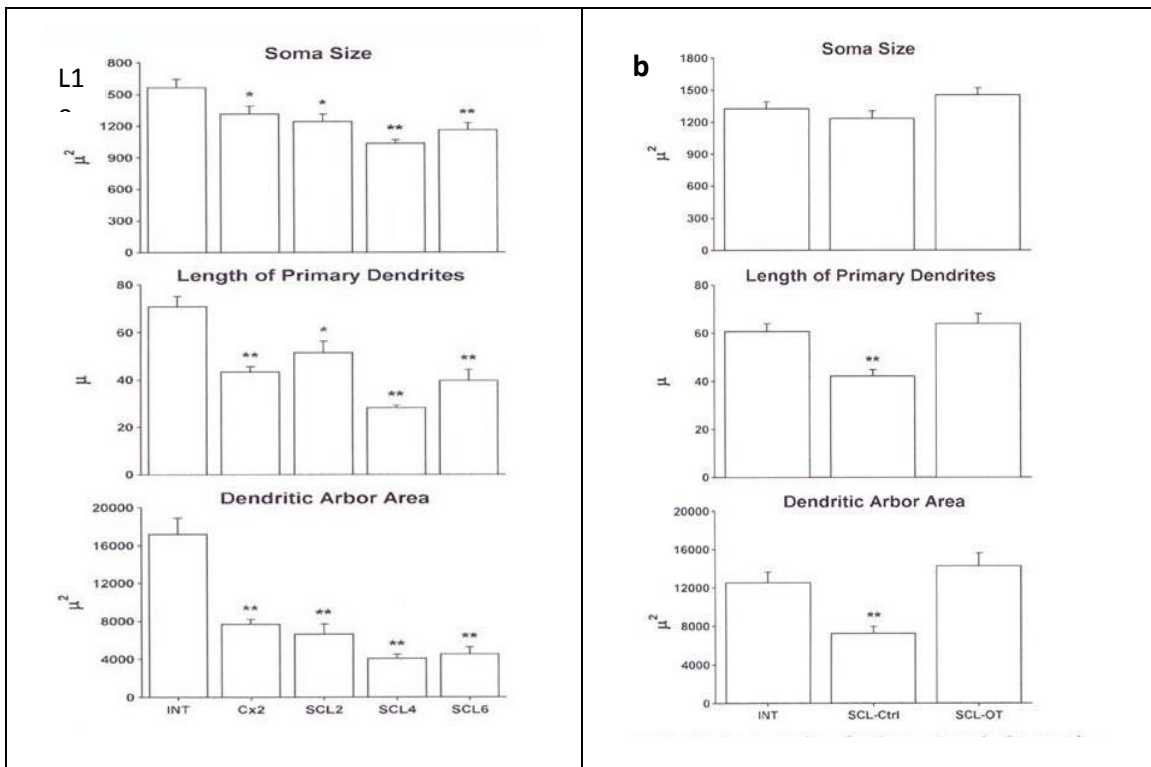


Fig 4. Gráfica donde se muestran tres características morfométricas (tamaño del soma, longitud de las dendritas primarias y área de arborización dendrítica) de las motoneuronas del Músculo Pubococcígeo de ratas: Intacto (INT), Castrado de 2 semanas (CX2), con 2 (SCL2), 4(SCL4) y 6 (SCL6) semanas de lesión espinal. **b.** Gráfica donde se muestran tres características morfométricas (tamaño del soma, longitud de las dendritas primarias y área de arborización dendrítica) de las motoneuronas del Músculo Pubococcígeo de ratas intactas (INT), LME-Salina (SCL-Ctrl) y LME-Oxitocina (SCL-OT) (Pérez y cols., 2005)

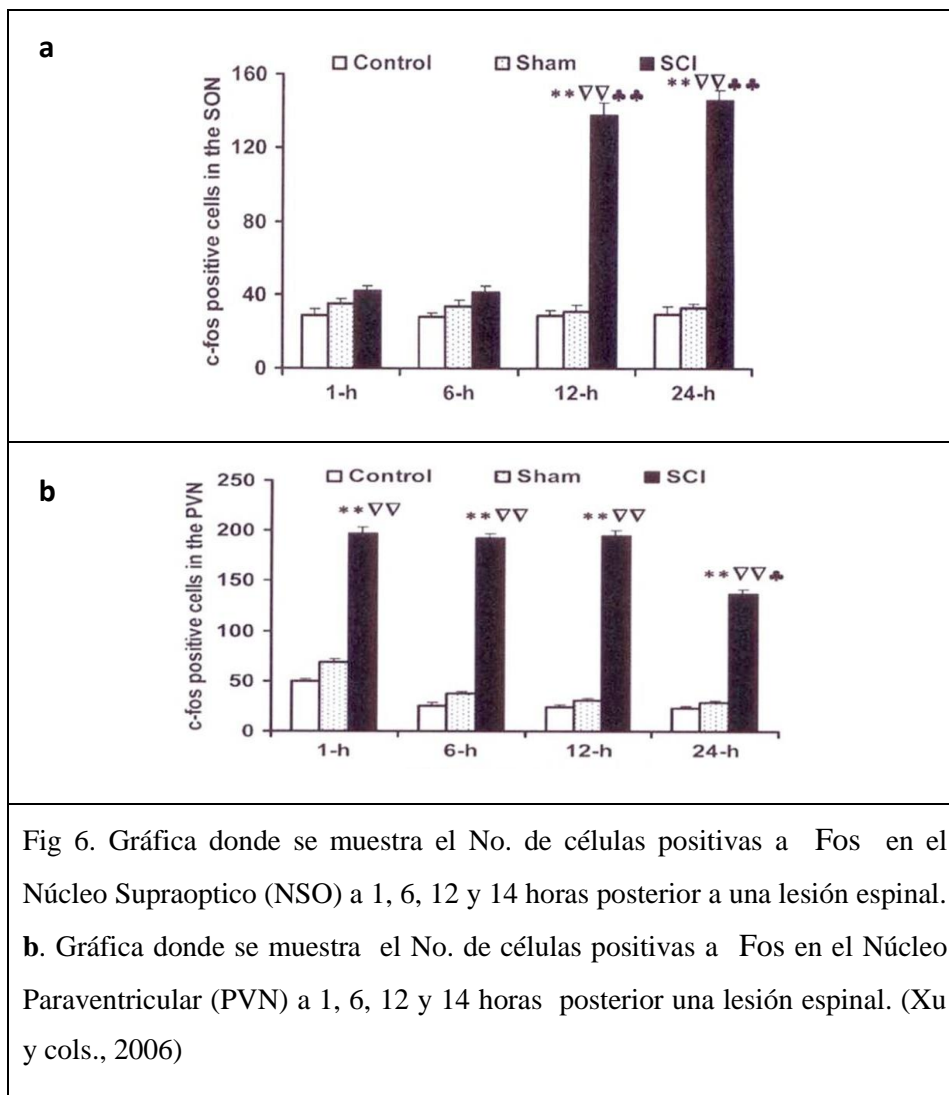
Por otra parte, utilizando inmunohistoquímica para Fos para analizar activación neural ante un estímulo nocivo, en este caso, la lesión espinal. La proteína Fos representa el producto inmediato cercano al gen. El cual es expresado rápidamente en las neuronas siguiendo varias estimulaciones nocivas. Por tanto, esta herramienta es usada como un indicador de la actividad neuronal a la respuesta neuronal de la LME. Del-Bel y cols. (2000) decidieron analizar cuáles eran los efectos distales de una LME en núcleos del tallo cerebral de control autonómico. Para ello realizaron una contusión en el segmento T10-L1 a diferentes tiempos (9 h y 12 h). También analizaron la función sensoriomotora de acuerdo a la escala propuesta por Tarlov y modificada por Bohlman. Las áreas establecidas para analizar bilateralmente en el sitio de lesión fueron las láminas I, II y V de la sustancia gris. Mientras que los núcleos del tallo cerebral analizados fueron la formación reticular, el núcleo del tracto solitario y el área postrema. Después de la lesión espinal todos los animales mostraron paraplejía total o parcial. Extrañamente en este experimento no se detectó expresión a la proteína Fos en el grupo control y solamente se observó inmunoreactividad a Fos en una cantidad reducida del grupo sham. Mientras que en los animales lesionados los segmentos torácicos mostraron el mismo patrón con la misma intensidad; en el sitio de la LME se observó Fos alrededor del epéndimo, en las láminas I, II y X del asta dorsal y en las láminas V, VI, VII, VIII y IX/núcleo accesorio del asta ventral (Tabla 3). Así mismo, se observó Fos en los centros de tallo cerebral relacionados con el control autónomo, tales como el área reticular ventromedial de la medula oblonga, el área postrema y el núcleo del tracto solitario. En este estudio se pudo observar que el efecto de la anestesia utilizada (uretano) no afectó la expresión de Fos y que el estrés quirúrgico no fue significativo para los resultados de la investigación. En general, los animales que sufrieron la contusión espinal presentaron inmunoreactividad a Fos en áreas que regulan el sistema nervioso autónomo como la formación reticular, área postrema y núcleos del tracto solitario. Las células de la columna intermediolateral representan fibras preganglionares simpáticas que emergen de las raíces ventrales para proyectar a ganglios simpáticos. De tal manera que la respuesta aumentada a la estimulación sensorial por debajo de la lesión podría resultar en un aumento del tono muscular y movimientos aberrantes, elevación de la presión arterial junto con dolor de cabeza, crisis convulsivas y accidentes cerebrovasculares. Todo esto por ausencia de inhibición. Por lo que la patofisiología de la médula espinal no sólo involucra cambios en médula espinal sino también en áreas supraespinales, pues tanto la actividad neural del tallo

cerebral como de áreas autonómicas simpáticas de la médula espinal son activadas por la contusión espinal. Como se ha mencionado anteriormente, las lesiones traumáticas o isquémicas del sistema nervioso central producen reacciones bioquímicas, algunas relacionadas con procesos degenerativos y otras con propiedades neuroprotectoras. La proteína Fos expresada podría ser sintetizada en respuesta a la lesión y podría participar en la respuesta neuronal secundaria al daño, aunque no es posible distinguir si es en relación a procesos degenerativos y/o protectivos.

	Spinal cord		Brain stem		
	Laminae I-II	Lamina X	Nucleus of the reticular formation	Solitary tract nucleus	Area postrema
Laminectomy group	0.0 ± 0.0	6.0 ± 6.0	44.0 ± 9.0	47.3 ± 5.2	61.0 ± 29.0
Contusion group	37.7 ± 1.2*	15.0 ± 3.2	70.7 ± 15.9*	73.0 ± 5.6*	226.0 ± 16.5*

Fig 5. Efecto de la contusión espinal en el número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en el sitio de lesión y estructuras del tallo cerebral (Del-Bel, 2000).

Otro estudio realizado por Xu y Col. (2006), donde éstos investigadores compararon la expresión de la proteína Fos en el Núcleo Paraventricular (NPV) y el núcleo supraóptico (NSO) en ratas después de una lesión de médula espinal. Los resultados del presente estudio sugieren que las celular del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal son activadas por la LME, por lo cual dicho eje esta directamente relacionado con los cambios patofisiológicos y la cascada de reacciones dentro del daño secundario (Tabla 4).



La relevancia de estos resultados se basa en que dicho daño provoca aun mayores perjuicios a la médula espinal y sus diversas conexiones distales que los generados directamente por la lesión de médula espinal. Una estructura que comparte vías de comunicación importantes con respecto a la coordinación motora y el aprendizaje es el cerebelo, el cual no ha sido estudiado en su relación con un daño espinal.

3. JUSTIFICACIÓN.

Estudios recientes demuestran que la LME ocasiona cambios a distintos niveles; tanto estructurales, celulares, moleculares o expresión de genes en sitios distales al daño.

Con ello se empieza a considerar la participación de diversas estructuras supraespinales que poseen funciones relacionadas a procesos autonómicos y motrices, dentro de las cuales podemos mencionar a los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo así como el área postrema y el núcleo del tracto solitario, éstos últimos ubicados en el tallo cerebral.

Estos descubrimientos permiten suponer la participación de nuevas estructuras del sistema nervioso durante el desarrollo de los procesos patofisiológicos propios a una LME, las cuales hasta el momento no han sido tomadas en cuenta.

Al respecto, no se han estudiado las posibles repercusiones del cerebelo después de la LME, siendo que éste es considerado como una estructura con un papel primordial dentro de la motricidad, al ser el área responsable de la coordinación y del aprendizaje motriz; condiciones que se ven comprometidas severamente al presentarse una lesión espinal.

A la fecha no existen estudios acerca de la reacción del cerebelo al producirse una lesión espinal por contusión, ni de su posible respuesta ante los procesos bioquímicos que ocurren dentro del daño primario, que ocurre en las primeras horas de lesión y procesos del daño secundario que ocurren después de 24 horas.

4. HIPÓTESIS

1) “La expresión de Fos aumenta en la corteza del vermis y el núcleo fastigiado del cerebelo de ratas macho 6 horas después de la lesión espinal”.

2) “La expresión de Fos aumenta en la corteza del vermis y el núcleo fastigiado del cerebelo de ratas macho 24 horas después de la lesión espinal”.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Identificar cambios en la expresión de la proteína Fos en la corteza del vermis del cerebelo y del núcleo fastigiado a 6 h y 24 h posterior a una lesión espinal.

5.2. Objetivos Particulares.

1. Realizar un conteo de las células inmunoreactivas a Fos en la capa granular en el vermis del cerebelo a 6 h y 24 h después de una lesión espinal moderada.

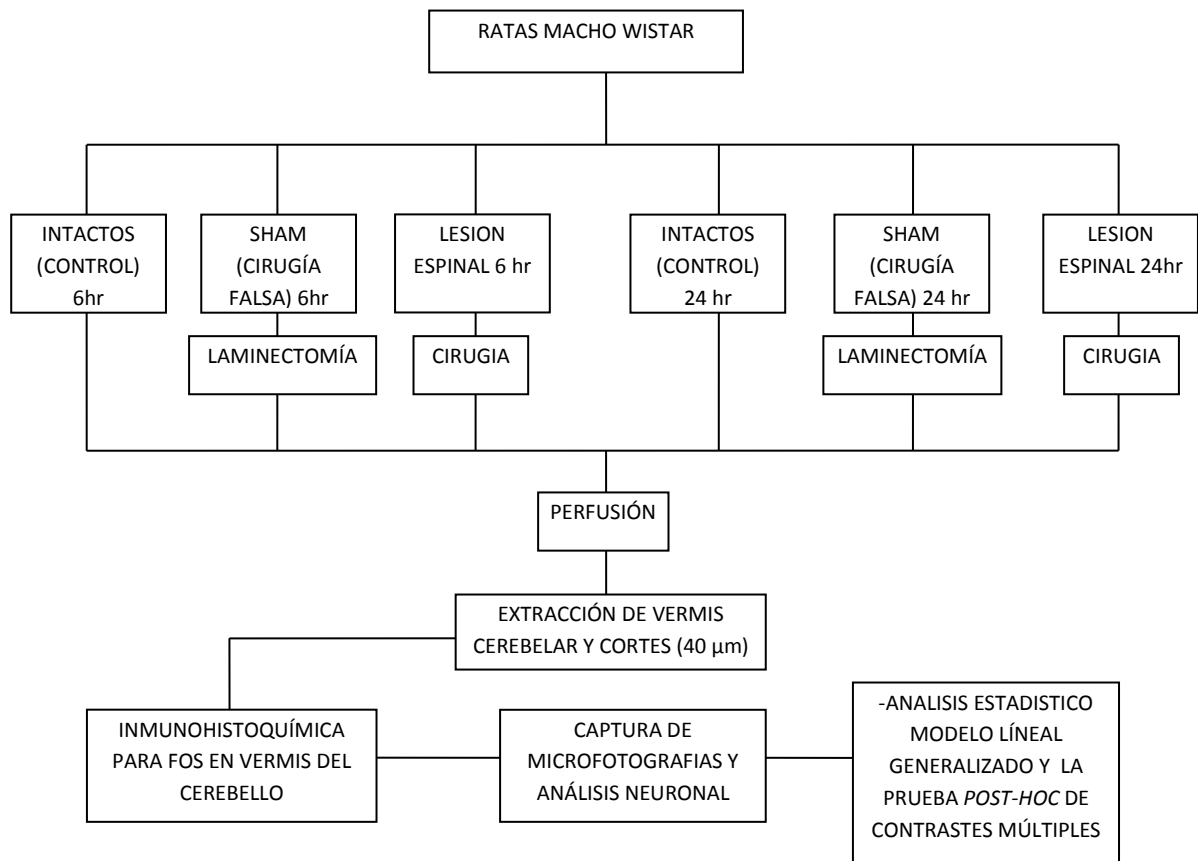
2. Realizar un conteo de las células inmunoreactivas a Fos en la capa de Purkinje en el vermis del cerebelo a 6 h y 24 h después de una lesión espinal moderada.

3. Realizar un conteo de las células inmunoreactivas a Fos en el núcleo fastigiado a 6 h y 24 h después de una lesión espinal moderada.

6. METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso de 250-350 g alojadas en jaulas de acrílico colectivas (50x30x20cm), previamente acondicionadas con una capa de aserrín (cuatro ratas por jaula). Las jaulas permanecieron en un bioterio a temperatura ambiente, con un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12:00h (encendido de la luz 20:00hr). Se les proveía agua para beber purificada (Ciel México) y alimento (Nutricubos para roedores, Purina de México) *ad libitum*. Todos los animales fueron tratados siguiendo la norma de cuidado de la NOM-062-Z00-1999 (NOM, 1999).

Diseño Experimental: animales (n=6 por grupo tratamiento)



Lesión espinal por contusión

Las ratas anestesiadas previamente con pentobarbital (30 mg/kg) i.p. fueron colocadas en una unidad espinal para roedores, en la posición decúbito ventral. Se les realizó un corte longitudinal de la piel a nivel de la caja torácica, seguida de la separación de los músculos paravertebrales y de la apófisis espinosa. Posteriormente se les separó el periostio de la lámina vertebral y se cortó la lámina vertebral para exponer la médula espinal en las vértebras T7-T8, correspondiente al segmento medular T8. La cirugía se realizó con el apoyo de un microscopio de disección (Leica GZ6) para verificar que la lesión de la médula estuviera bien realizada. La laminectomía consistió en exponer la vértebra y visualizar el segmento de médula a lesionar, teniendo cuidado de no dañar materia blanca ni meninges. Posteriormente se le dejó caer un cilindro de acero inoxidable de 10 g a través de un tubo guía desde una altura de 15 cm para provocar una contusión severa. Después de 1 m se le retiró el mismo y se confirmó el sitio del impacto a través de la presencia de un hematoma central al nivel de la zona de contusión. Se procedió a suturar. Al animal se le administró benzilpenicilina (10 unidades) por vía intramuscular, así como biodipirona (8 unidades). Una vez que el animal se hubo recuperado de la anestesia, se mantuvo en una jaula individual. Después de la cirugía, a la rata se le realizó la evacuación manual de la orina pues presentaba vejiga neurogénica. También se les realizó la prueba de la escala de Tarlov para constatar que la cirugía de la lesión espinal estuviera bien realizada.

Perfusión transcardíaca.

A la rata se le inyectó una sobredosis de pentobarbital sódico (30 mg/kg) i.p. Posteriormente se le colocó en una caja con tapa en rejilla (colector de sangre y soluciones) decúbito dorsal, se cortó la piel a nivel del estomago, el diafragma, las costillas a 1 cm aproximadamente del esternón en ambos lados y finalmente el pericardio, dejando al descubierto el corazón (activo). Se realizó una pequeña incisión en la cavidad ventricular izquierda, donde se le colocó la aguja de perfusión, conectada a la venoclisis, la cual quedó pinzada para poder introducir las sustancias y evitar la fuga de las mismas. Inmediatamente se le realizó una incisión en la aurícula derecha para la salida de sangre y sustancias. Primero se le administrará 500 ml de solución

salina (0.9%) a temperatura ambiente. Al término de ésta, se le pasaron 800 ml de solución fijadora compuesta de Paraformaldehído (4%), disuelta en un amortiguador de fosfato a 0.2 M (PB 0.2M con un pH=7.4) a temperatura ambiente. Terminada la perfusión, se decapitó al animal, se extrajo el cerebelo y se depositó en 50 ml de solución amortiguadora de fosfato a 0.1 M (PB 0.1M), más sacarosa (10%) durante 12 h, luego al 20% durante 12 h y finalmente al 30% durante 24 h o hasta su hundimiento en estas soluciones a 4°C. En el criostato (Leyka), se realizaron los cortes sagitales a 40 µm en la región del vermis a una temperatura de -24°C para proteger el tejido. Los cortes fueron separados en lado izquierdo y derecho y colectados en tinas para lavados con rejillas en solución de PB 0.1M.

Inmunohistoquímica para la proteína Fos.

La técnica inmunohistoquímica realizada para Fos ha sido estandarizada previamente en el laboratorio de Neurobiología. Este procedimiento se realizó en libre flotación (en tinas para lavados con rejillas) de acuerdo a la metodología. Los cortes del cerebelo fueron lavados tres veces por espacio de 5 m en solución PB 0.1M y un último lavado en solución PB 0.1M más Tritón al 0.1% (PB 0.1%) por espacio de 10 min, al término de cada procedimiento (incubación). Después se realizó la eliminación de la peroxidasa endógena en 10 ml PB0.1M más 180 µl de peróxido de hidrógeno al 30% por espacio de 10 m en agitación constante a temperatura ambiente. El primer anticuerpo para Fos (Santa Cruz) se agregó a una dilución de 1:2500, en solución PBT 0.3% más suero normal de cabra (NGS) a una dilución de 35:1000 incubándose por 72 h a 4°C. Mientras que el segundo Ac contra conejo (Ac puente o secundario) se añadió con PBT 0.3% a una dilución de 4:1000, incubándose por 90 m en agitación constante a temperatura ambiente. Posterior a ello, con 30 m de anticipación se preparó el complejo abidina-biotina (Kit A B) en PB 0.1M a una dilución de 5:1000. Posteriormente se puso a incubar por 90 m en agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, el revelado se realizó al añadir a 15 ml de PB0.1M, 500 µl de diamino-benzidina (DAB) a una concentración de 1gr/100 ml, más 250 µl de cobalto a una concentración de 0.05 mg/ 5 ml de agua destilada (tono rojo), más 200 µl de níquel a una concentración de 0.05 mg/ 5 ml de agua destilada (tono azul). Inmediatamente se filtró y se agregó 3 gotas de peroxido de hidrógeno (al 30%) en agua destilada a una dilución de 35:1000.

Al colocar los tejidos en la solución, se observó una reacción que tomó un color tabaco 7 m, inmediatamente se paró la reacción, y se realizaron ocho lavados, cada uno por cinco minutos en PB 0.1M. Posteriormente se montaron los cortes en los portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar en la cámara fría por 12 h.

Deshidratación del tejido

Una vez secos los cortes en los portaobjetos, se hicieron dos lavados con agua destilada (1 m en cada uno), posteriormente se pasó en una serie ascendente de soluciones de etanol (50, 70, 90, 95, 100%; 1 m en cada uno y un último al 100% por 2 m). Terminado el proceso se aplicó Permout y el cubreobjeto para su análisis posterior.

Análisis del tejido en Microscopía.

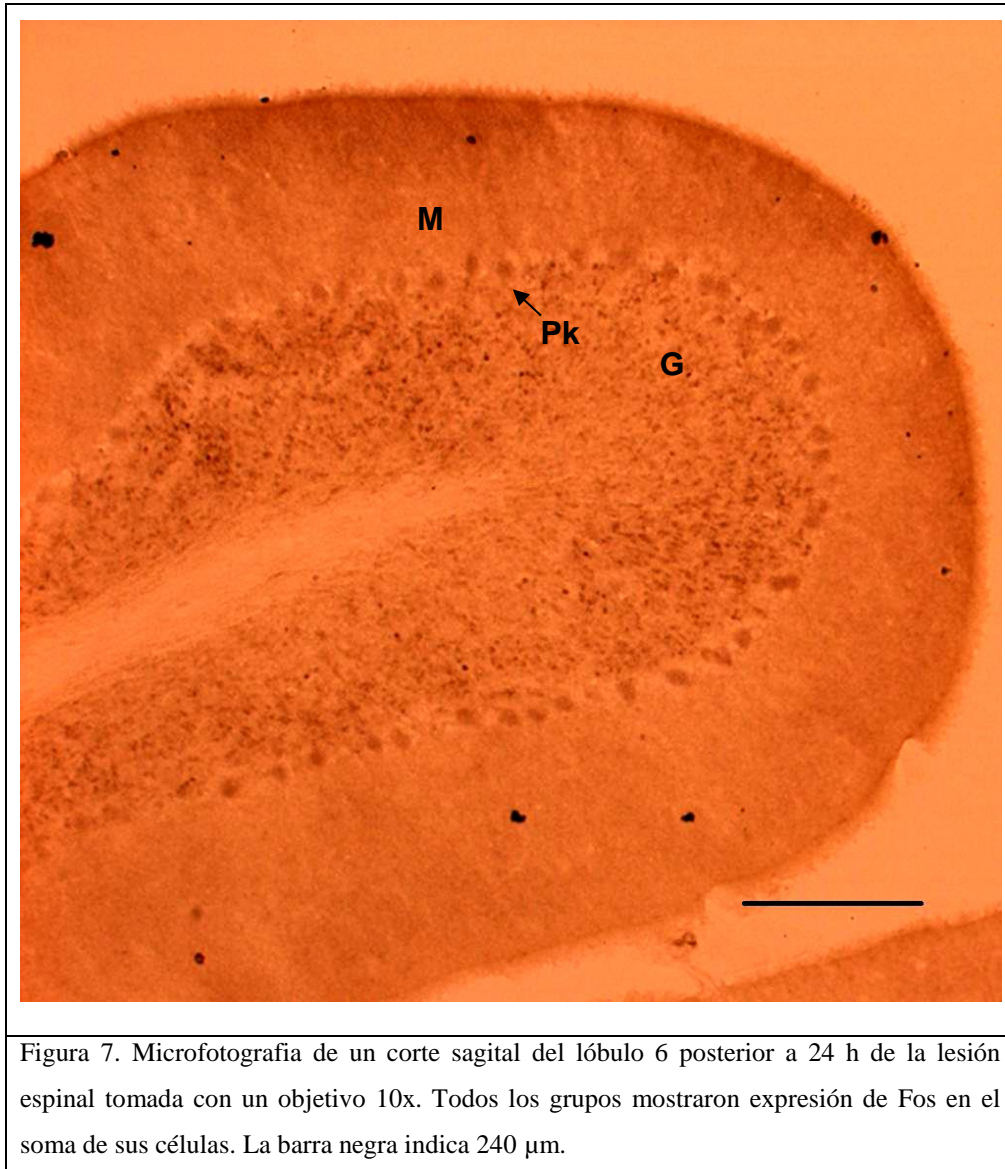
Se realizó la identificación anatómica de la distribución y conteo de las células inmunoreactivas a Fos en la región del vermis que tuvieran visualizados los diez lóbulos y el núcleo fastigiado en el cerebelo. Esto se realizó con un microscopio Olympus, usando los objetivos 10x y 40x. Se seleccionaron tres cortes en el eje medio lateral del vermis del lado izquierdo y tres del vermis derecho con un rango de coordenadas de la línea media hacia la región lateral que correspondió de 0.9 μm a 1.3 μm , siguiendo las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1997). Posteriormente con el software Image pro-Plus se realizó el conteo de áreas preestablecidas en los diez lóbulos de dos capas cerebelares (capa de Purkinje y capa granular) a analizar y el núcleo fastigiado. Para la selección de células que cumplieran los parámetros de consideración se usó un filtro rojo. En la capa del Purkinje y el núcleo fastigiado se midió un área rectangular total de 450, 000 μm^2 con un objetivo de 10x en la zona apical de cada lóbulo. Mientras que en la capa granular se midió un área cuadrada de 55, 000 μm^2 , procurando la zona más apical de dicha capa. Así mismo se usaron filtros de intensidad de luz para evitar conteos erróneos como el de basura del conteo real de las células. El rango de intensidad para el objetivo de 10x osciló entre los 2600 y los 2900 lúmenes mientras que para el objetivo de 40x fue de 1800 a los 2100 lúmenes. El conteo de la expresión a la proteína Fos se realizó en áreas apicales de los diez lóbulos y en el núcleo fastigiado.

Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Como se mencionó anteriormente, los datos de la capa granular del vermis cerebelar se analizaron por cada lóbulo. Se analizó la variable respuesta con un Modelo Lineal Generalizado (MLG, por sus siglas en inglés) para un diseño unifactorial ANOVA con un ajuste de distribución de error tipo Poisson y de Contrastes Múltiples para determinar las diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas a Fos con el paquete estadístico JMP 6. Los niveles de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que existe un nivel basal de células inmunoreactivas a Fos (grupos Control y Sham). También se observó que dicho marcaje se ubicó principalmente en las células de las tres capas de la corteza del cerebelo: molecular, Purkinje y granular, tal como se muestra en la Figura 7.



EXPERIMENTO 1.

Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 6 h en la capa granular.

Los resultados mostraron diferencias significativas en los lóbulos 1, 5, 7, 9 y 10 de los animales con lesión espinal con respecto a los animales intactos ($p < 0.05$).

Los resultados se presentaron de la siguiente manera: Lóbulo 1 ($p = 0.02$), Lóbulo 5 ($p = 0.05$), Lóbulo 7 ($p = 0.00$), Lóbulo 9 ($p = 0.01$) y Lóbulo 10 ($p = 0.00$) cuando se compararon con el Control. Mientras que en la figura 8 se muestran los resultados de las pruebas Modelo Líneal Generalizado realizadas a los diez lóbulos del vermis cerebelar de los animales Intacto, Sham y Lesión Espinal en referencia a la cantidad de células con expresión a Fos. En ella podemos observar las diferencias significativas en los lóbulos 1, 5, 7, 9 y 10 de los grupos con lesión espinal.

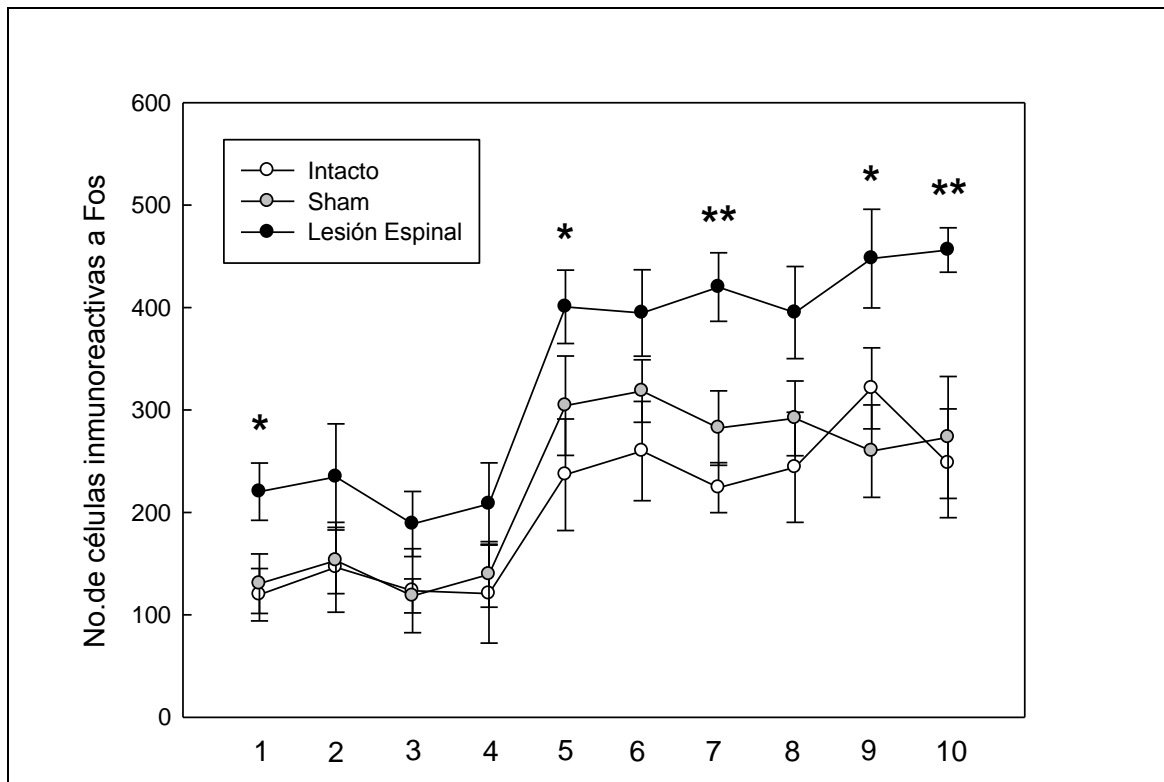


Fig 8. Representación de los valores obtenidos de la capa granular de ratas Control (punto blanco), Sham (punto gris) y Lesión espinal (punto negro) posterior a 6 h de la lesión espinal. El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la expresión de Fos en los lóbulos 1, 5, 9 ($p < 0.05$), 7 y 10 ($p < 0.01$) en el grupo de ratas con lesión espinal. La expresión de Fos fue similar en los grupos Control y Sham.

En la Figura 9 se presentan cortes de los tejidos que fueron sometidos a la inmunotinción para Fos dentro de las primeras 6 h posterior a la lesión espinal con un Control y un Sham mostrando la capa granular y la capa de Purkinje:

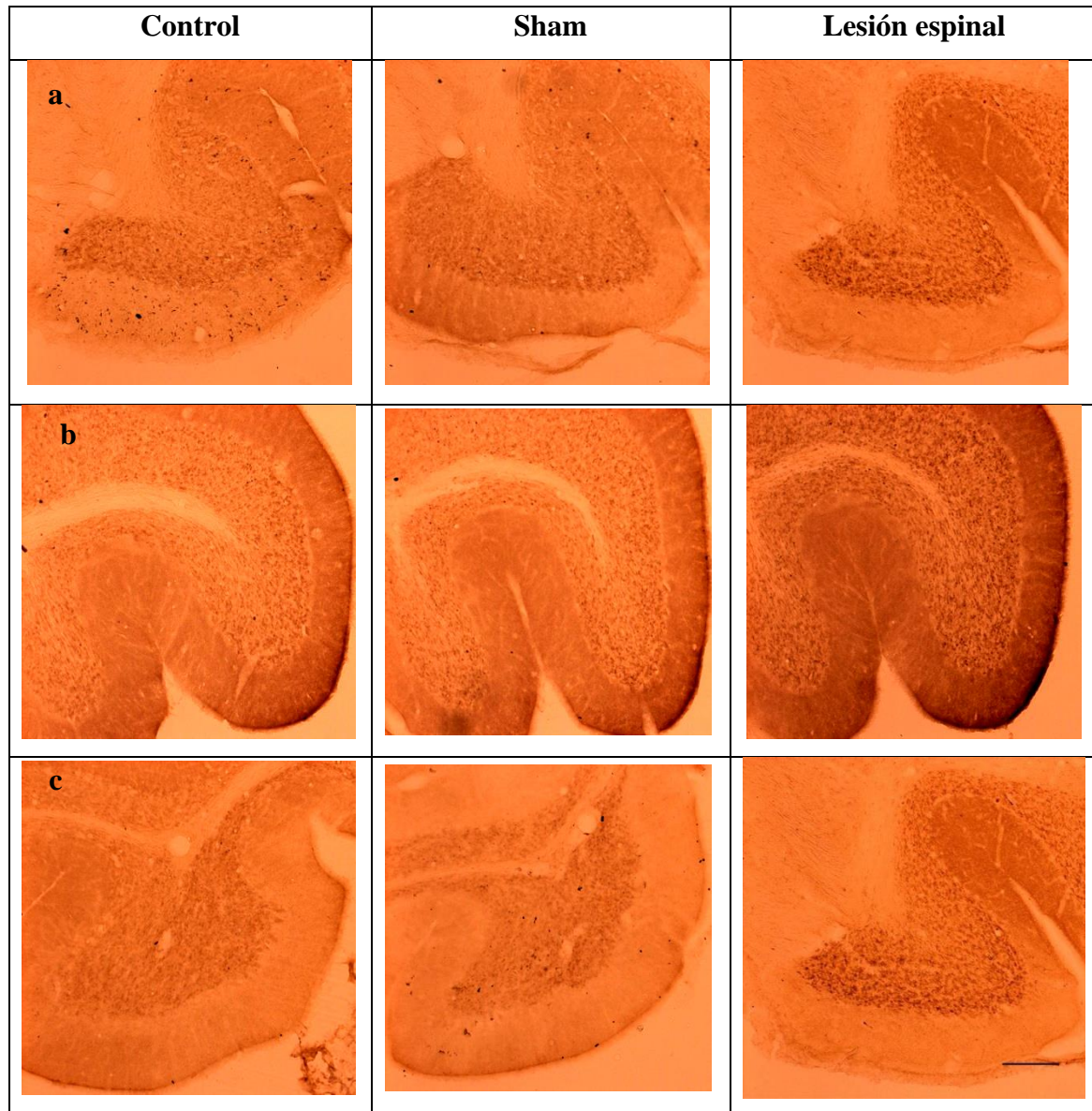


Figura 9. Cortes sagitales de los lóbulos 1 (a), 5 (b), y 10 (c) posterior a 6 h de la lesión espinal en tres grupos (Control, Sham y Lesión espinal) con un objetivo 10x. Se observa un mayor marcaje en la capa granular en el animal con Lesión espinal. La barra negra indica 240 μ m.

Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 6 h en la capa de Purkinje.

Para la capa de Purkinje, los resultados de la prueba del Modelo Lineal Generalizado mostraron diferencias significativas en los lóbulos 1, 7 y 9 de los animales lesionados ($p < 0.05$) con respecto a los animales Intactos. Los resultados se presentaron de la siguiente manera: Lóbulo 1 ($p = 0.02$), Lóbulo 7 ($p = 0.01$) y Lóbulo 9 (0.00) cuando se compararon con el Control. Mientras que en la figura 10 se muestran los resultados de las pruebas Modelo Lineal Generalizado realizadas a los diez lóbulos del vermis cerebelar de los animales Intacto, Sham y Lesión Espinal en referencia a la cantidad de células con expresión a Fos. En ella podemos observar las diferencias significativas en los lóbulos 1, 7 y 9 de los grupos con lesión espinal.

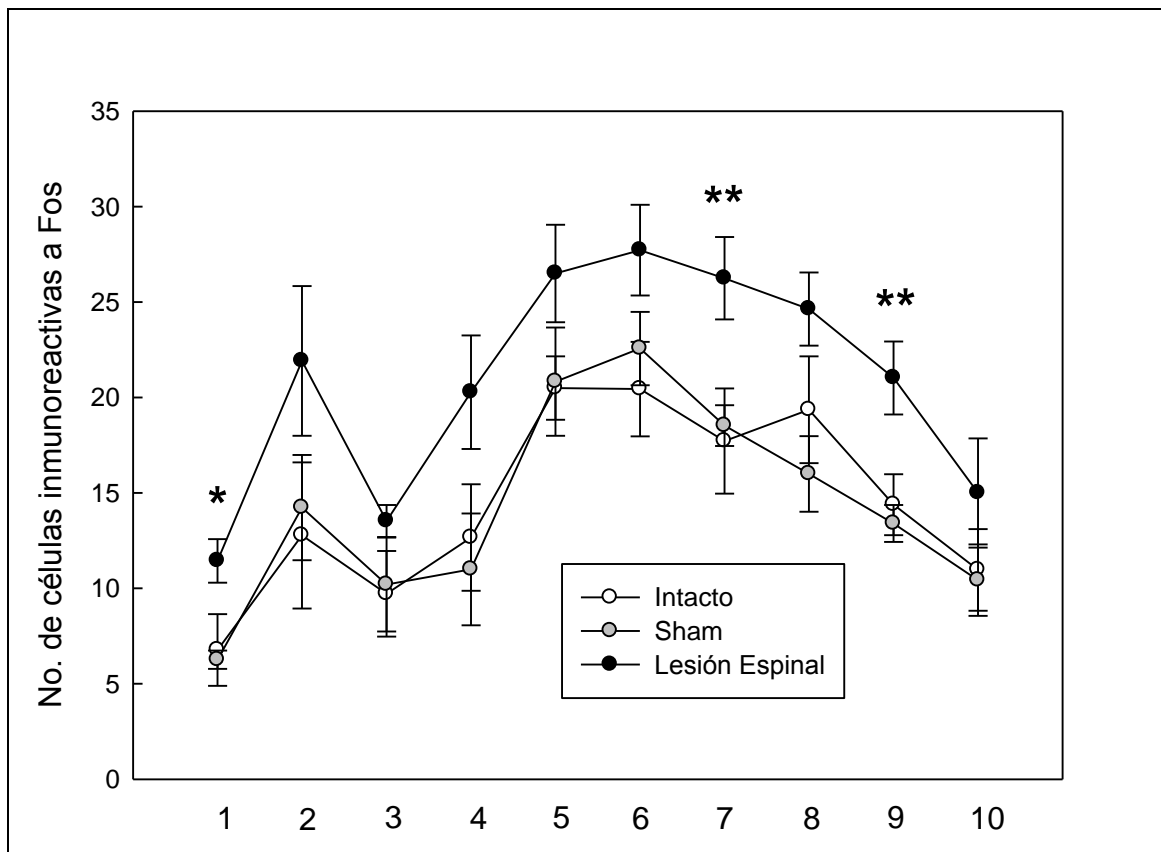


Fig 10. Representación de los valores obtenidos de la capa de Purkinje de ratas Control (punto blanco), Sham (punto gris) y Lesión espinal (punto negro) posterior a 6 h de la lesión espinal. El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la expresión de Fos en los lóbulos 1 ($p < 0.05$), 7 y 9 ($p < 0.01$) en el grupo de ratas con lesión espinal. La expresión de Fos fue similar en los grupos Control y Sham.

En la Figura 11 se presentan cortes de los tejidos que fueron sometidos a la inmunotinción para Fos dentro de las primeras 6 h posterior a la lesión espinal con un Control y un Sham mostrando la capa granular y la capa de Purkinje:

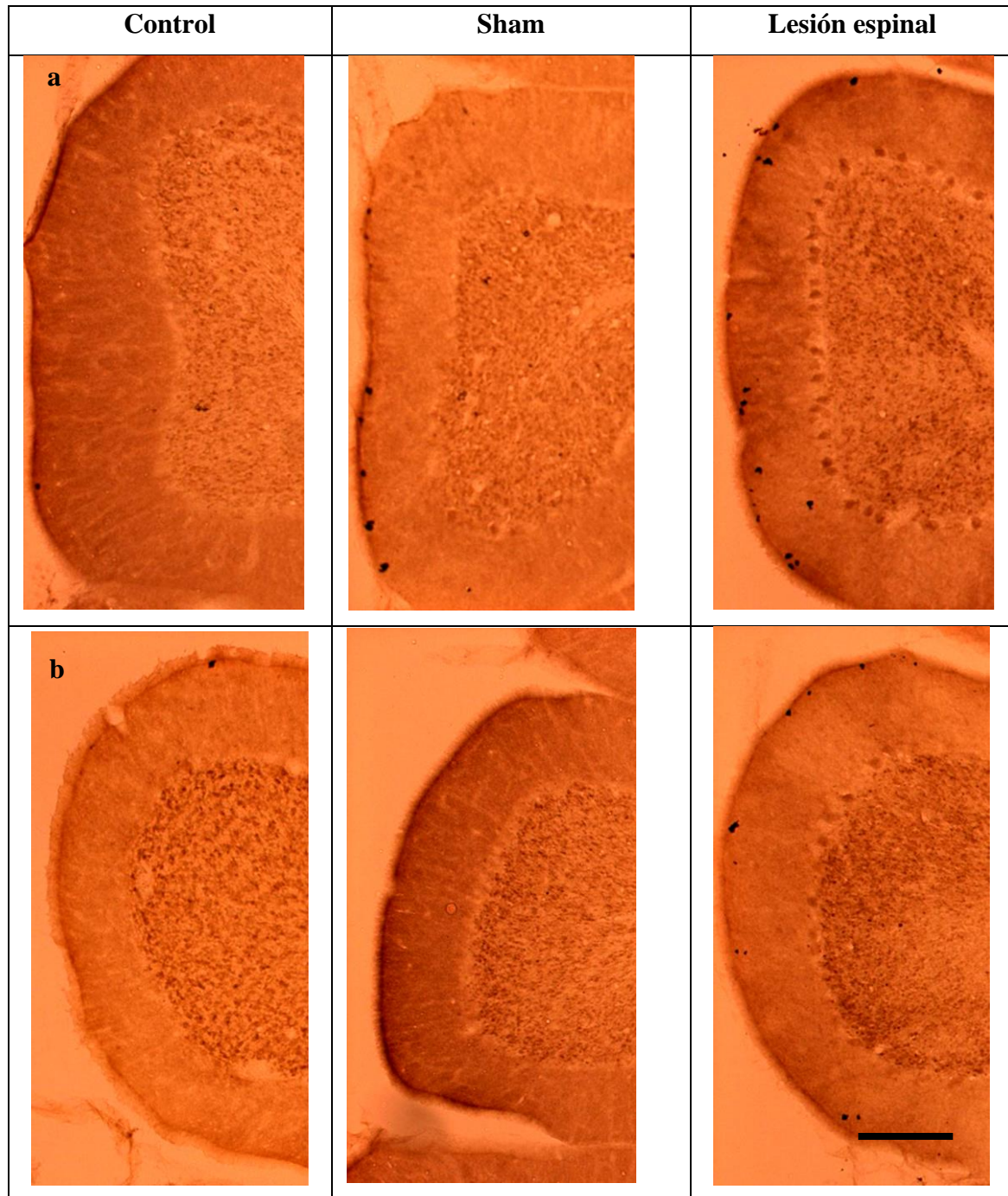
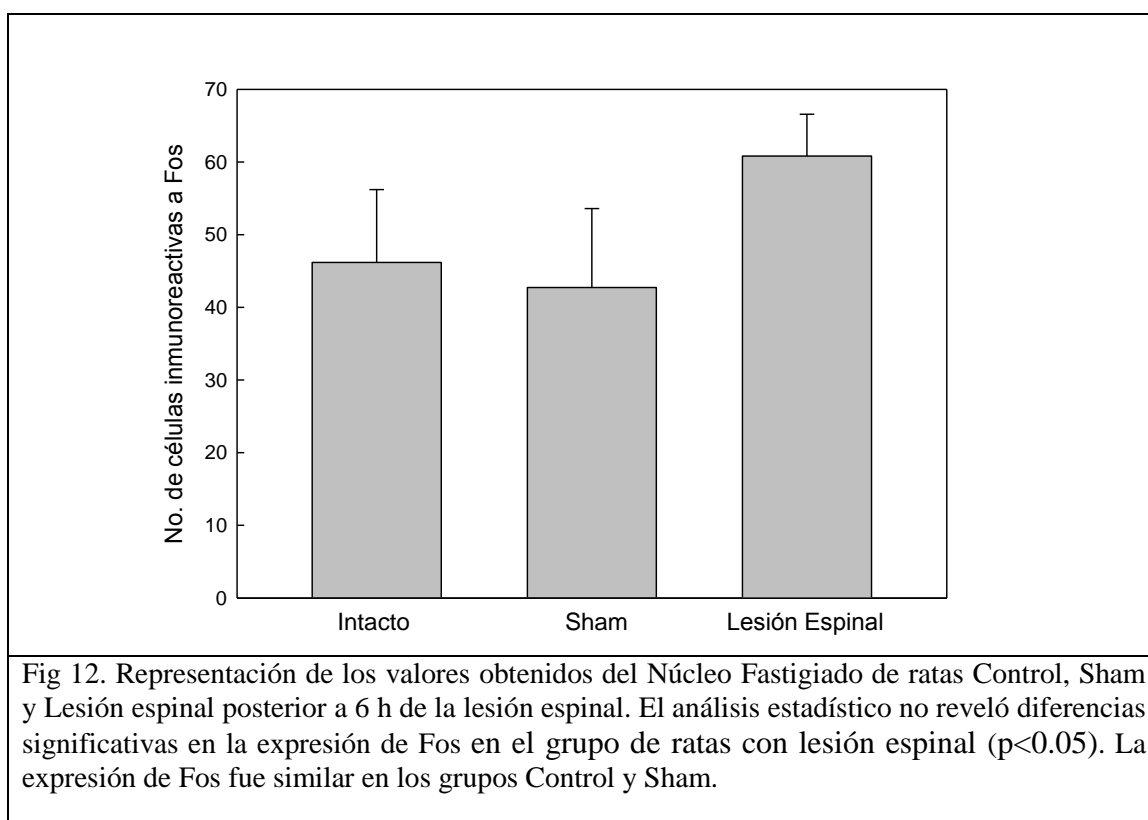


Figura 3. Cortes sagitales de los lóbulos 7 (a) y 9 (b) posterior a 6 h de la lesión espinal en tres grupos (Control, Sham y Lesión espinal.) con un objetivo 10x. Se observa un mayor marcaje en la capa de Purkinje en el animal con Lesión espinal. La barra negra indica 240 μ m.

Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 6 h en el núcleo fastigiado.

La tercera área analizada en su expresión para Fos dentro del cerebelo fue el núcleo fastigiado. En esta prueba no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tres tratamientos ($p < 0.05$).

También se muestra la figura 12 con las medianas y su error estándar de los resultados obtenidos en el núcleo fastigiado para cada tratamiento:



EXPERIMENTO 2.

Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 24 h en la capa granular.

Por otro lado, 24 h después de realizar la contusión espinal los lóbulos 3 y 4 de los animales con lesión espinal mostraron diferencias significativas en relación a los animales intactos ($p < 0.05$), mientras que los demás lóbulos únicamente presentaron una tendencia mayor sin llegar a ser significativa.

Los resultados se presentaron de la siguiente manera: Lóbulo 3 ($p=0.00$) y Lóbulo 4 (0.00) cuando se compararon con el Control. En la figura 13 se pueden apreciar los resultados de dicha prueba:

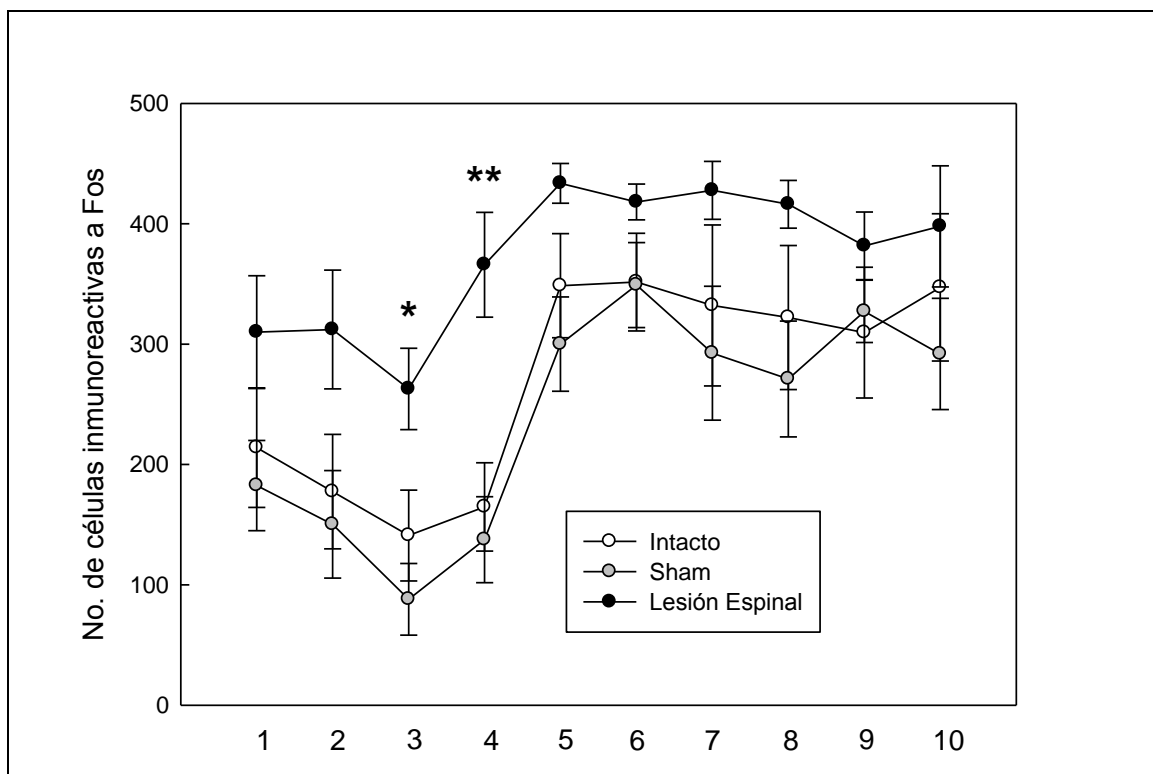
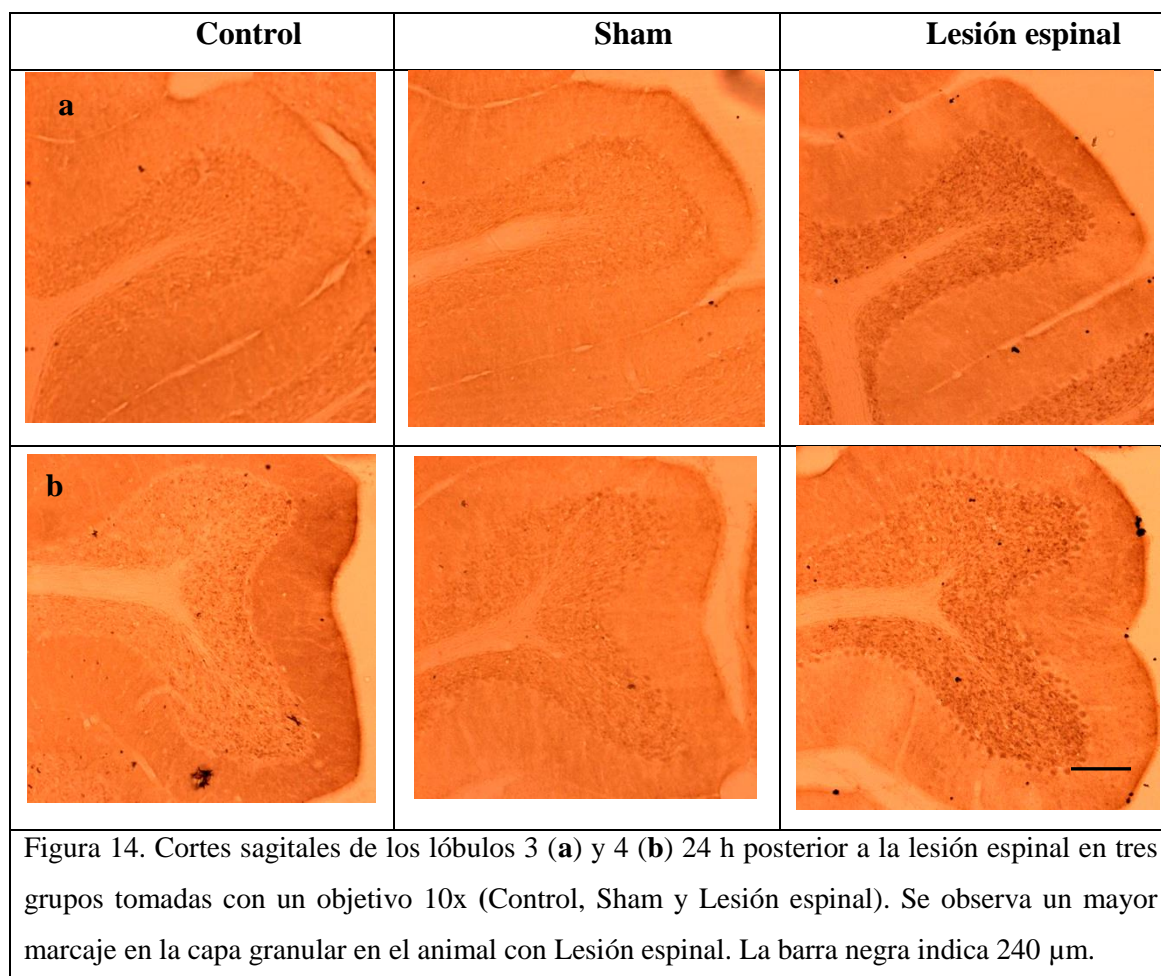


Fig 13. Representación de los valores obtenidos de la capa granular de ratas Control (punto blanco), Sham (punto gris) y Lesión espinal (punto negro) posterior a 24 h de la lesión espinal. El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la expresión de Fos en los lóbulos 3 ($p < 0.05$) y 4 ($p < 0.01$) en el grupo de ratas con lesión espinal. La expresión de Fos fue similar en los grupos Control y Sham.

Asimismo, se presentan cortes de los tejidos que fueron sometidos a la inmunorreactividad para Fos dentro de las primeras 24 h posterior a la lesión espinal y su comparativo con el grupo Control y Sham mostrando la capa granular y la capa de Purkinje (Figura 14).



Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 24 h en la capa de Purkinje.

Mientras que después de 24 h de la lesión espinal, los resultados de la prueba Modelo Líneal Generalizado en la capa de Purkinje no mostraron diferencias significativas en ninguno de los lóbulos ($p < 0.05$).

Mientras que en la figura 15 se muestran los resultados de las pruebas Modelo Líneal Generalizado realizadas a los diez lóbulos del vermis cerebelar de los animales Intacto, Sham y Lesión Espinal en referencia a la cantidad de células con expresión a Fos. En ella podemos observar que no existen diferencias significativas en ningún lóbulo de los grupos con lesión espinal.

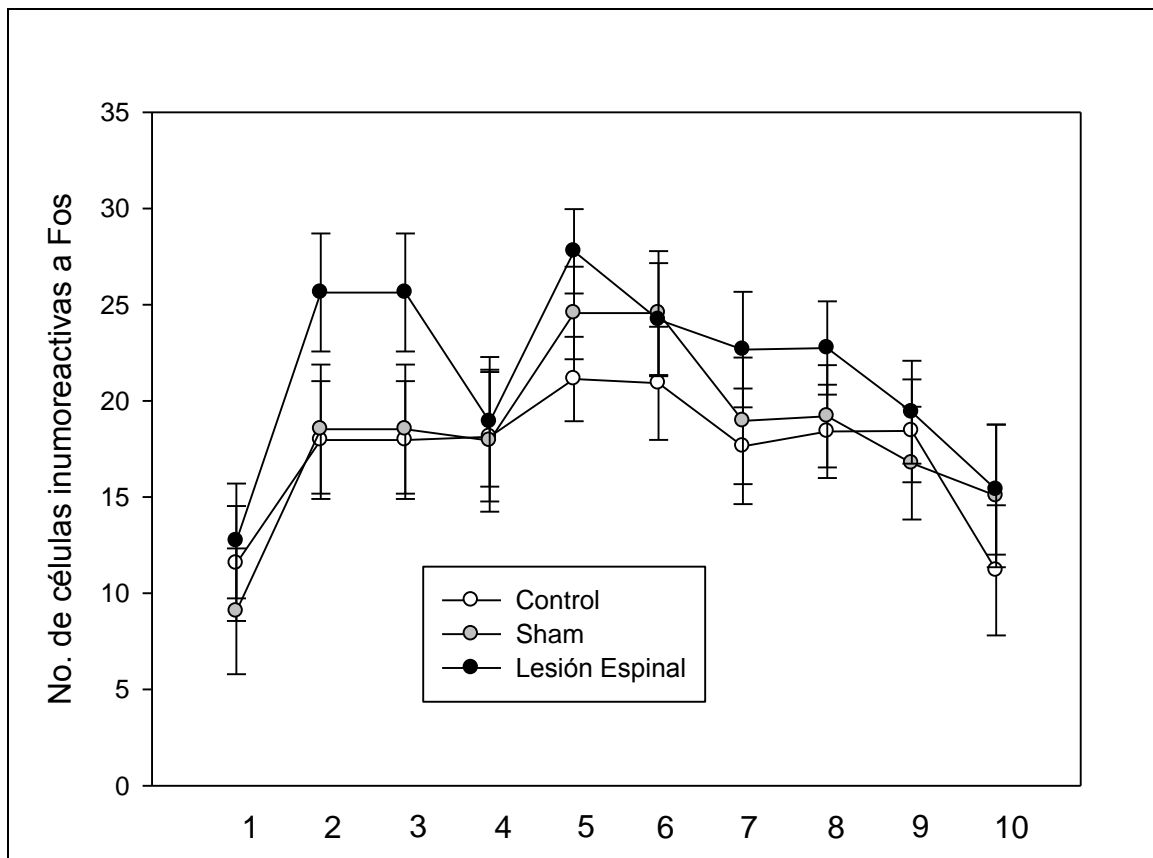


Fig. 15. Representación de los valores obtenidos de la capa de Purkinje de ratas Control (punto blanco), Sham (punto gris) y Lesión espinal (punto negro) posterior a 24 h de la lesión espinal. El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la expresión de Fos en los lóbulos 1 y 2 ($p < 0.05$) en el grupo de ratas con lesión espinal. La expresión de Fos fue similar en los grupos Control y Sham.

Expresión de Fos en ratas con lesión espinal a 24 h en el núcleo fastigiado.

Finalmente, la expresión de Fos dentro del cerebelo en el núcleo fastigiado tras 24 h de la lesión espinal tuvo diferencias significativas en el tratamiento de la lesión espinal ($p < 0.05$). También se observa un ligero aumento en el grupo Sham sin ser significativo. Los resultados se presentaron de la siguiente manera: Tratamiento ($p=0.02$) cuando se comparó con el Control. En la figura 16 se muestran dichos resultados de la prueba Modelo Líneal Generalizado realizada:

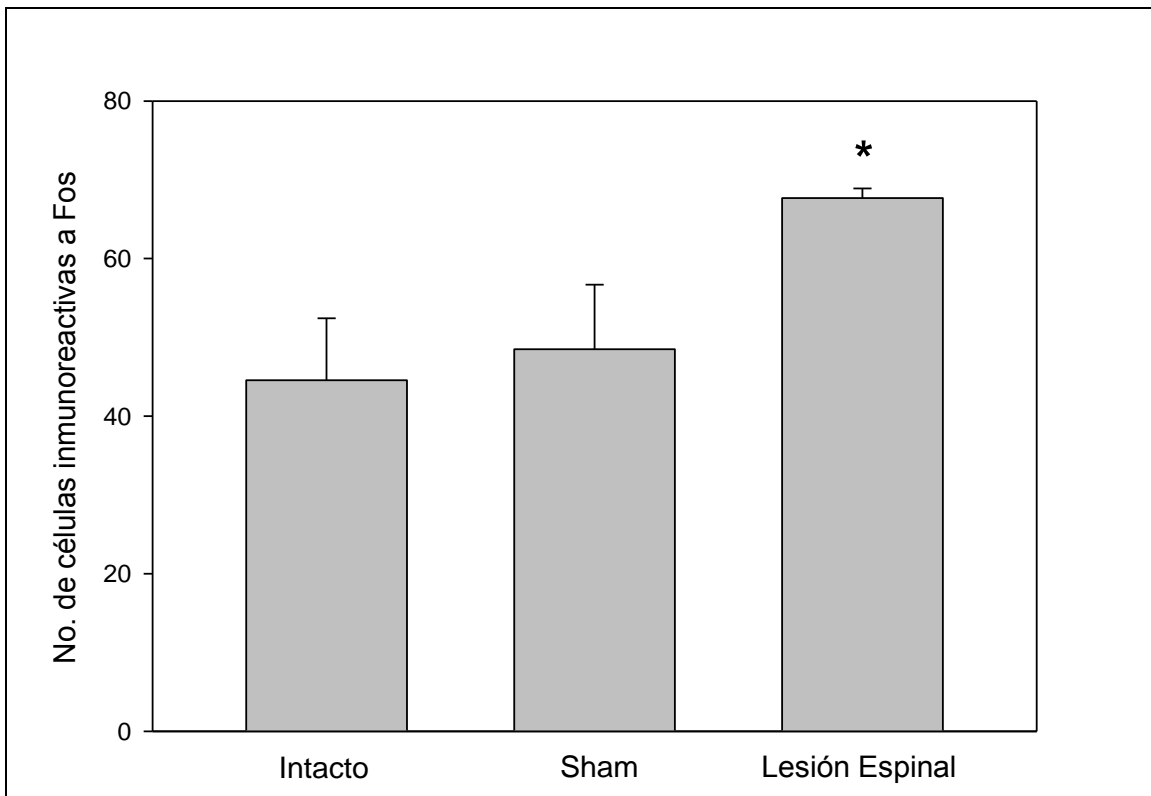
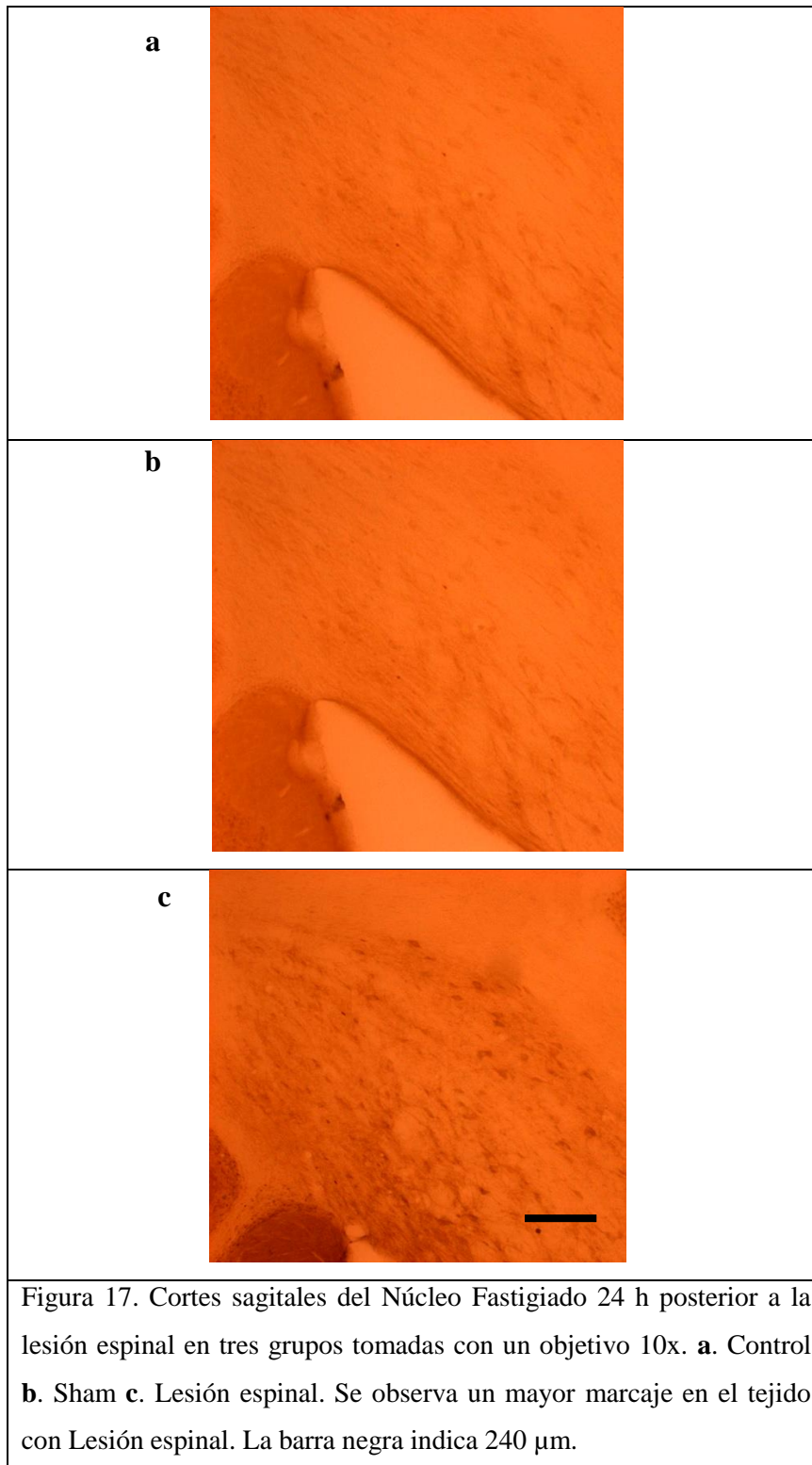


Fig. 16. Representación de los valores obtenidos del Núcleo Fastigiado de ratas Control, Sham y Lesión espinal posterior a 24 h de la lesión espinal. El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la expresión de Fos en el grupo de ratas con lesión espinal ($p < 0.05$). La expresión de Fos fue similar en los grupos Control y Sham.

Asimismo, se presentan cortes de los tejidos que fueron sometidos a la inmunotinción para Fos dentro de las primeras 24 h posterior a la lesión espinal con un Control y un Sham mostrando el Núcleo Fastigiado en la Figura 17:



8. DISCUSIÓN.

Se ha reportado que en el cerebelo la expresión máxima de Fos se encuentra hasta los 180 min. (Tian y Bishop, 2002). En los resultados de esta tesis se observó que la expresión de la proteína Fos se dio a las 6 horas (ó 360 min) y 24 horas (ó 1440 min) después de la lesión espinal. Por lo que el uso de la técnica inmunohistoquímica de la proteína Fos constituye una herramienta funcional para el estudio de diversos estímulos aversivos o nocivos en la rata en un tiempo mayor a lo que usualmente es empleada.

En el presente trabajo se analizó el efecto de la lesión espinal sobre la expresión de la proteína Fos en el cerebelo de ratas macho. Los resultados mostraron que todos los grupos expresaron Fos en ambos experimentos; tanto en los grupos de ratas intactas, los grupos de ratas con cirugía falsa (Sham) y los grupos de ratas con 6 y 24 horas de lesión espinal. En la presente tesis el marcaje se observó principalmente en la capa granular y capa de Purkinje, tal y como se ha observado en otros modelos de estudios realizados en la rata (Manzo y cols., 2008).

Se sabe que el Fos no sólo se expresa en neuronas, sino también en las células de la glía (Tian y Bishop, 2002). Por lo cual, no descartamos la posibilidad de que existió la presencia de éste tipo de células en el conteo realizado durante el presente estudio. Sin embargo, aunque no realizamos un doble marcaje para diferenciar la expresión de Fos a nivel de neurona o glía, sí se distinguió el marcaje en dos capas del cerebelo así como en los núcleos fastigiados, expresándose específicamente en el citoplasma del tipo de células neuronales, dado por la extensión del marcaje de Fos en las células.

Se ha probado que el modelo de contusión es un buen método para producir una lesión de médula espinal no crónica y analizar sus efectos inmediatos en las ratas (Rodrigues y cols., 2010; Del Bel y cols., 2000; Ruggiero y cols., 1997; Xu y cols., 2006). Como se planteó en la hipótesis, los datos mostraron que la lesión espinal tuvo un efecto significativo en la expresión de Fos en la corteza y en el núcleo fastigiado del cerebelo de ratas. Este aumento significativo observado en células de la capa granular y de Purkinje así como en el núcleo fastigiado es un resultado directo de la lesión espinal. Este resultado es relevante, ya que mostró una reacción del cerebelo, el cual es una estructura que se encuentra en un sitio distante al área (torácica 8) de la lesión espinal.

Los resultados del primer diseño experimental de esta tesis consideran que la activación neuronal en la capa granular y Purkinje del cerebelo podría estar asociada a los eventos del daño primario que aparecen en las primeras horas en el sitio de lesión

espinal. Además del choque espinal, pérdida sensorial y motora, se sabe que en el daño primario, ocurren distintos procesos bioquímicos inmediatos a la lesión espinal. Se ha reportado que hay un pico inicial en la acumulación de calcio (Ca^{+2}) intracelular (normalmente a los 15 min con un aumento a las 4 horas después del daño espinal), lo que estimula una mayor liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato y aspartato desembocando en un proceso de excitotoxicidad para las neuronas vecinas que no fueron afectadas durante la lesión espinal. Por otro lado, el exceso de Ca^{+2} produce la activación de fosfolipasas (C y A2) que son dependientes de calcio y que a su vez llevan a una producción de araquidonato de cuyo metabolismo se obtienen radicales libres, tromboxanos y leucotrienos. Estos tres promueven el daño tisular y la inflamación ya que acaban con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos dando lugar a la formación de lipoperóxidos los cuales destruyen las membranas de células no dañadas (Caballero y Nieto-Sampedro, 2005).

Otros procesos que forman parte del daño primario y que aparecen en las primeras horas después de una lesión espinal, como la existencia de un ambiente anaeróbico en el sitio de lesión. Se presenta una muerte celular primaria, así mismo aparece una respuesta inflamatoria aunada al desarrollo de procesos necróticos y degeneración de los axones dañados (Caballero y Nieto-Sampedro, 2005). Todos estos eventos, aunque se presentan en el sitio de la lesión, llevarían en unas horas después consecuencias en áreas distantes como el vermis de cerebelo.

De hecho, existen estudios en donde se han analizado los efectos de una lesión espinal en sitios o estructuras distantes. Por ejemplo, en el estudio realizado por Xu y Cols. (2006) se mostró que la lesión espinal tiene un aumento significativo sobre la expresión de Fos en dos núcleos ubicados en el hipotálamo; el núcleo paraventricular (PVN, por sus siglas en inglés) y el núcleo supraóptico (SON, por sus siglas en inglés) de ratas. En tal estudio se observó que ambos núcleos reaccionan de forma distinta después de la lesión espinal. El efecto de la lesión espinal sobre la expresión de Fos en el PVN hipotalámico aumentó el número de células positivas a esta proteína a las 1, 6, 12 y 24 horas después del daño espinal. En base a estos resultados podemos suponer que existe una reacción inmediata a la lesión espinal en las neuronas de este núcleo hipotalámico. En cambio, el efecto de la lesión espinal en el SON sobre la expresión de Fos no fue inmediato; puesto que durante las primeras horas (1 y 6 h) después del daño espinal no se registró un aumento significativo en la expresión de Fos. Los resultados de tal estudio mostraron un aumento en el número de células positivas a Fos hasta las 12 y

24 horas después de la lesión espinal en el SON. Estos datos indican que dos áreas (PVN y SON) ubicadas dentro de una misma estructura reaccionan de forma diferente a lo largo de la evolución del daño espinal.

La diferencia en las respuestas neuronales a la lesión espinal en el PVN y SON implica que ambos núcleos tienen diferentes papeles en el curso temporal de los cambios patológicos después de una lesión espinal. Como se sabe, el hipotálamo es el centro endocrino, autonómico y conductual (Paxinos y Watson, 1997). Las neuronas del PVN y del SON forman parte del sistema neurohipofisiario. Estos grupos neuronales proyectan a la pituitaria posterior (también conocida como neurohipófisis) en donde sus terminales axónicos liberan dos tipos de hormonas: la vasopresina y la oxitocina. La primera participa en la homeostasis del fluido corporal mediante la reabsorción de agua en el riñón y también parece actuar como un vasoconstrictor afectando la función refleja cardiovascular. La segunda hormona está involucrada en la lactancia y en el parto (Cunningham y Sawchenko, 1991). Por lo tanto, las neuronas del PVN y SON regulan y determinan la salida endocrina de la pituitaria posterior. En el PVN se sintetiza el factor liberador de corticotropina (CRF) y de la arginina vasopresina (AVP). Ambos neuropéptidos son los mayores reguladores de la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la pituitaria durante el estrés. La ACTH actúa sobre la corteza adrenal para aumentar la liberación del glucocorticoide corticosterona en ratas (Ma y Aguilera, 1999). En el estudio de Xu y cols. (2006) se encontró que la expresión de Fos en ambos núcleos hipotalámicos aumentó significativamente después de la lesión espinal. Por lo cual, los autores sugieren que las neuronas que contienen vasopresina y oxitocina, así como aquellas que sintetizan CRF y AVP podrían activar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) después de la lesión espinal. Toda esta activación neuronal podría estar involucrada en el desarrollo de cambios patofisiológicos y en el inicio de procesos asociados con el daño primario y secundario.

Cabe mencionar que en ese estudio los autores no consideraron la posibilidad de que los cambios en la activación neuronal observada después de la lesión espinal se podrían deber a la existencia de vías directas y de vías indirectas hacia la médula espinal. Se sabe que el PVN envía conexiones directas a la médula espinal (Manzo y cols., 1999; Perez y cols., 2005; Tang y cols., 1998; Tribollet y cols., 1998; Wagner y Clemens, 1991; Wagner y cols., 1993). Lo que no se ha demostrado que el SON tenga conexiones directas con la médula espinal o con el PVN. De tal forma que estas posibles conexiones neuronales podrían explicar el por qué se observaron los efectos de

la lesión espinal en el PVN desde el inicio del estudio (1 h) y se mantuvo hasta el final del mismo (24 h) y, en cambio, no se observaron los mismos efectos de la lesión espinal en el SON sino hasta 12 horas posteriores a la lesión espinal, efecto que también se mantuvo hasta las 24 horas.

En otro estudio, Del-Bel y cols. (2000), detectaron un aumento en la inmunoreactividad a Fos en la formación reticular, el área postrema, y el núcleo del tracto solitario 2 horas después de una contusión espinal en ratas. Estas estructuras del tallo están relacionadas con el control autonómico; particularmente, la formación reticular con la regulación de la presión sanguínea, la cual se altera en pacientes parapléjicos y tetrapléjicos (Schwab y Bartholdi, 1996). Mientras que el área postrema regula la náusea y el vómito además de contener células endoteliales que permiten la difusión de la sangre hacia el cerebro (Popescu y cols., 2011). Por su parte, el núcleo del tracto solitario, junto con el hipotálamo, juega un papel importante en el control de la saciedad (Owyang y Heldsinger, 2011). Por lo cual, los autores sugieren que la activación neural en dichos núcleos podría estar asociada con alteraciones autonómicas que llegan a sufrir algunos sujetos después de una lesión espinal (Del-Bel y cols., 2000).

En la presente tesis, se observó que la corteza (específicamente en la capa granular y de Purkinje) y el núcleo fastigiado del cerebelo reaccionan de forma distinta en diferentes tiempos; a las 6 y 24 horas después de la lesión espinal. A continuación se discuten estos resultados de acuerdo a cada diseño experimental:

El Efecto de la contusión espinal después de 6 horas

Capa granular: En el grupo de ratas intactas y ratas sham los datos fueron similares, ya que el estrés quirúrgico no aumentó significativamente la expresión de Fos en las células de esta capa. Estos grupos presentaron niveles basales de expresión de la proteína Fos. Por lo que el estrés quirúrgico (grupo sham) no afectó de forma significativa la expresión de Fos en las células de esta capa. Por el contrario, en el grupo de lesión espinal se encontró un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos en la capa granular de los lóbulos 1, 5, 7, 9 y 10. Esto podría indicar una activación neural en regiones del cerebelo que reciben aferencias de las vías espinocerebelares dorsales (lóbulos 1 y 5) pero también mostraron actividad neural en regiones que no reciben aferencias espinales pero que se sabe que reciben conexiones de núcleos del tallo cerebral (lóbulos 7, 9 y 10). **Capa de Purkinje:** Se observó que los

datos en la expresión de Fos fueron similares en el grupo de ratas intactas y ratas sham. Sin embargo, los lóbulos 1, 7 y 9 tuvieron un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos después de la lesión espinal con respecto al grupo de ratas intactas y sham. **Núcleo fastigiado:** Se observó que entre el grupo de ratas intactas y el grupo de ratas sham no mostraron diferencias significativas. Este núcleo profundo tampoco mostró un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos después de la lesión espinal.

La expresión de Fos en la capa granular (lóbulos 1 y 5) y en la capa de Purkinje (lóbulo 1) podría estar asociada a la afectación de la *vía espinocerebelosa dorsal* que proyecta de médula espinal al cerebelo. En la rata, el origen de esta vía espinocerebelar dorsal proviene de las neuronas ubicadas en los niveles lumbares (Berretta y cols., 1991; Matsushita, 1999). También tienen orígenes del núcleo cervical central ubicado en el ensanchamiento cervical y de niveles torácicos. Particularmente, las proyecciones lumbares-sacras a la corteza del lóbulo anterior (esta región comprende los lóbulos del I al V) del cerebelo no son muy abundantes, mientras que las que se dirigen a los núcleos fastigiados son más abundantes. En estos estudios se observó que las proyecciones espinales que alcanzan a los lóbulos 1 y 2 proyectan también a los núcleos fastigiados. En la lámina VII de la sustancia gris de la médula espinal se encuentra el Núcleo de Stilling, el cual acarrea información a la corteza y núcleos profundos del cerebelo necesaria para el balance corporal. Por lo tanto, estas proyecciones axónicas de médula espinal hacia el cerebelo funcionan para el mantenimiento y coordinación de las extremidades inferiores y el control de la postura. De tal forma que esta vía espinocerebelosa dorsal estaría afectada en ratas con lesión espinal.

El cerebelo y sus funciones no motoras

Se sabe que el cerebelo es una estructura que está involucrada en el proceso de información sensorial-motora. La pregunta que surge a partir de los resultados de la presente tesis es ¿Por qué se observó un aumento en la actividad neural (dada por una mayor expresión de Fos) de lóbulos posteriores del cerebelo que no procesan información sensorial-motora?

Se debe considerar que diversas investigaciones han reportado que existe una clara organización anatómica-funcional de la región anterior (lóbulos I al V) y el lóbulo VIII (que forma parte de la región posterior del cerebelo) que procesa información

predominantemente sensorial-motora. Sin embargo, estudios han reportado que los lóbulos VI y VII (crus I y II) que contribuyen con procesos de nivel superior como aprendizaje y memoria (Stoodley y Schmahmann, 2010). Es decir, estos lóbulos VI y VII no procesan información sensorial-motora.

Dimitrova y cols. (2003) demostraron el papel del lóbulo VI del vermis y del lóbulo VI –crus I de los hemisferios en procesos relacionado al dolor como muecas, miedo y reacciones de sobresalto. Los accidentes cerebrovasculares (“strokes” por su término en inglés) de los hemisferios de los lóbulos VII y VIII de cerebelo causan un deterioro en la experiencia de los sentimientos placenteros, e.g., experiencia emocional (Turner y cols., 2007).

Así mismo, se ha reportado una lateralización funcional amplia del cerebelo, es decir, existe una red de control lateralizada del lado izquierdo y derecho. A través de imágenes funcionales (Monti y cols., 2007) y mediante estudios clínicos (Richter y cols., 2007) implican al cerebelo derecho en procesos verbales y al cerebelo izquierdo en procesos espaciales.

Además, se debe considerar otros estudios anatómicos en monos que han demostrado conexiones recíprocas entre crus I (Lóbulos VI y VII-a) con la corteza prefrontal y crus II (Lóbulo VII-b) con la corteza parietal. Específicamente, aferentes de la corteza prefrontal vía núcleo pontino medial convergen sobre crus I, mientras que las aferentes de la corteza parietal convergen sobre crus II vía núcleo pontino medial, dorsal y lateral (Brodal y cols., 1979). Las eferentes del crus I y II tiene conexiones recíprocas vía proyecciones desde el núcleo dentado hacia la cortezas parietal y prefrontal (Dum y Strick, 2003). En humanos, los estudios funcionales de imágenes han destacado el papel de crus I en funciones ejecutivas, como el razonamiento abstracto (Monti y cols., 2007) memoria de trabajo (Chen y Desmond, 2005), actualización de la información (Collete y cols., 2007) y selección de respuesta (Desmond y cols., 1998).

Así mismo, se ha reportado en estudios realizados en el gato que la estimulación eléctrica de los lóbulos VI, VII y VIII no producen cambios cardiovasculares y respiratorios. Sin embargo, la estimulación de los lóbulos IX y X provocó efectos cardiovasculares y respiratorios (Bradley y cols., 1987a).

Estudios han demostrado que la corteza cingulada proyecta al núcleo pontino y éste proyecta al Lóbulo IX en el gato (Brodal y cols., 1991). El Lóbulo IX también está implicado en distintas tareas funcionales como la saciedad de la sed (Parson y cols., 2000), sensación (Hui y cols., 2005), sincronización motora (Jantzen y cols., 2004), memoria de trabajo (Desmond y cols., 1997) y percepción de cambio en el momento del estímulo (Liu y cols., 2008).

El lóbulo IX es considerado esencialmente para la guía visual del movimiento (Glickstein y cols., 1994). El lóbulo X se ha considerado por mucho tiempo como el sustrato de la conexión vestíbulo-cerebelosa (Stoodley y Schmahmann, 2010) implicado en el movimiento ocular.

Por otro lado, se han descrito las conexiones cerebelo-hipotalámicas por medio de marcadores retrógrados y anterógrados. Çavdar y cols. (2001) describieron las conexiones directas entre los núcleos profundos del cerebelo y los núcleos del hipotálamo dorsomedial, así como del núcleo hipotalámico posterior en la rata. Además, la estimulación o ablación de la corteza de cerebelo o de sus núcleos profundos pueden modificar un rango amplio de respuestas viscerales como piloerección, cambios en la presión arterial, frecuencia cardíaca y respiratoria, alteraciones en el tono muscular liso (vejiga, intestinos, pupilas), micción y un aumento en el flujo sanguíneo del cerebro (Chida y cols., 1986). Estas observaciones ofrecen una nueva perspectiva de cómo el cerebelo podría influir en una variedad de respuestas de actividad autonómica.

Con lo anterior, los resultados de esta tesis propone que la lesión espinal produjo un aumento en la actividad neural en la capa granular de los lóbulos que procesan información “sensorial-motora” (1 y 5) y en lóbulos que procesan información “no sensorial-motora” (lóbulos 7,9 y 10 de la capa granular; lóbulos 7 y 9 de la capa de Purkinje) y que éstos lóbulos podrían estar implicados con actividad autonómica.

De hecho, se sabe que individuos con lesión de la médula espinal torácica tienen un elevado ritmo cardíaco en estado de reposo, así como una variabilidad de aumento de la presión arterial como parte de una condición denominada disreflexia autonómica y también tienen una actividad simpática elevada por arriba del nivel de lesión (Collins y cols., 2006). Esto hace proponer que lóbulos implicados en actividad autonómica en el cerebelo estarían expresando una mayor actividad neural (dada por el aumento en la inmureactividad a Fos) como respuesta ante la lesión de médula espinal en ratas.

Sin embargo, los resultados de esta tesis mostraron que el núcleo fastigiado no presentó cambios significativos en la actividad neuronal después de 6 horas de la lesión espinal, por lo que se considera que no hubo reacción de este núcleo profundo del cerebelo en este tiempo de lesión. Aunque no se sabe si los otros núcleos profundos del cerebelo (interpósito y dentado) estarían afectados en este tiempo.

Aparte, respecto a las células de los lóbulos que no mostraron una mayor expresión de Fos después de 6 horas de la lesión espinal, en este caso, la capa granular de los lóbulos 2, 3, 4 y 8 (estos lóbulos procesan información sensorial-motora), no descartamos la posibilidad de que podrían estarse expresando otros genes de activación temprana, como el c-Jun que se activa en respuesta a daños por excitotoxicidad, isquémicos y convulsivos (Kóvacs, 2008). Posiblemente, la lesión espinal podría inducir una mayor expresión de c-Jun en estos lóbulos del cerebelo, aunque esto requiere realizar futuras investigaciones para confirmar o descartar esta posibilidad.

El Efecto de la contusión espinal después de 24 horas.

Capa granular. Los datos fueron similares en los grupos de ratas intactas y sham. Estos grupos presentaron niveles basales de expresión de la proteína Fos. Esto indica que el estrés quirúrgico no aumentó significativamente la expresión de Fos en las células de esta capa. En cambio, los datos mostraron un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos en los lóbulos 3 y 4 en esta capa después de la lesión espinal. Esto indica una activación neural en lóbulos del cerebelo que reciben proyecciones directas de médula espinal sería una respuesta a la alteración o daño de la *vía espinocerebelosa ventral*.

Capa de Purkinje. Los datos de los grupos de ratas intactas y ratas sham fueron similares. Lo que indicó que el estrés quirúrgico no afectó significativamente la expresión de Fos en las células de esta capa. Así mismo, en esta capa de Purkinje no se observó un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos después de la lesión espinal. Esto indica que esta capa del cerebelo no presenta cambios en su actividad neural después de 24 h de la lesión espinal.

Núcleo fastigiado. A diferencia del experimento anterior, los datos mostraron un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos en este núcleo profundo del cerebelo después de 24 horas de la lesión espinal.

Como ya se mencionó, sujetos con lesión de la médula espinal torácica tienen un elevado ritmo cardíaco en estado de reposo, así como una variabilidad de la presión arterial como parte de una condición denominada disreflexia autonómica y también tienen una actividad simpática elevada por arriba del nivel de lesión (Collins y cols., 2006).

Por otro lado, estudios en la rata han observado que la estimulación eléctrica del núcleo fastigiado de cerebelo produce respuestas viscerales como cambios en la presión sanguínea y frecuencia cardíaca (Chida y cols., 1986). En este estudio realizado en ratas se mostró que la estimulación eléctrica del núcleo fastigiado (50 Hz, 10-100 microA) aumentó la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Chida y cols., 1986). Por otro lado, se ha reportado que la estimulación del núcleo fastigiado indujo bradicardia (descenso de la frecuencia cardíaca) en el conejo (Bradley y cols., 1987b).

En otro estudio se demostró que el lóbulo VI del vermis recibe aferentes del hipotálamo y proyecta de regreso al hipotálamo a través del núcleo fastigiado. Las lesiones del núcleo fastigiado e interpósito pueden inducir deterioros autonómicos (Haines y cols., 1997).

De esta forma, los resultados de la presente tesis hacen proponer que la actividad neural del núcleo fastigiado es una respuesta a la alteración de la actividad autonómica (e.g. cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria) en ratas después de 24 horas con lesión de médula espinal.

Así mismo, se deben considerar que este aumento en la expresión de Fos en lóbulos 3 y 4 y del núcleo fastigiado sería una reacción del cerebelo que podría estar asociada a los procesos que se presentan en el daño secundario (o fase crónica), los cuales se originan a partir de las 24 horas después de una lesión espinal (muerte neural secundaria, desmielinización de axones, actividad eléctrica deprimida en el área de lesión, etc.) Existe un segundo pico de concentración de Ca^{+2} , lo que provocaría una mayor estimulación en la liberación de glutamato y aspartato. Aunado a esto, hay un aumento del rango metabólico, lo que genera un metabolismo oxidativo que a su vez origina acidosis láctica. Estos eventos producen una muerte neuronal secundaria o tardía en el sitio de lesión desembocando en una actividad eléctrica y funcional deprimida en

el área lesionada (Caballero y Nieto-Sampedro, 2005). Y aunque todos estos eventos suceden en el sitio de lesión, de alguna manera afectarían el funcionamiento de otras estructuras distantes, en este caso, como se observó en las células de la corteza del vermis y del núcleo fastigiado del cerebelo.

Respecto a los lóbulos que no mostraron una mayor expresión de Fos en la capa de Purkinje y el resto de los lóbulos de la capa granular que no expresaron la proteína después de 24 horas de la lesión espinal, no descartamos la posibilidad de que podrían estarse expresando otros genes de activación temprana, como el c-Jun que se activa en respuesta a daños por excitotoxicidad, isquémicos y convulsivos (Kóvacs, 2008). Posiblemente, la lesión espinal podría inducir una mayor expresión de c-Jun en los lóbulos de esta capa de Purkinje, aunque esto requiere realizar futuras investigaciones para confirmar o descartar esta posibilidad.

La relevancia de los resultados de la presente tesis es que, así como en otras investigaciones donde se ha reportado la reacción en áreas distantes a la lesión espinal como algunos núcleos del tallo cerebral o del hipotálamo, mostraron un efecto en la actividad neural del cerebelo después de 6 y 24 horas con lesión de médula espinal en la rata.

Por último, es necesario realizar el análisis también de la expresión de Fos en otras áreas del cerebelo como son sus hemisferios, así como los otros núcleos profundos (interpósito y dentado) después de la lesión espinal. Se requieren más investigaciones al respecto.

9. CONCLUSIONES.

- A las 6 h posterior a una lesión espinal existe un aumento en la expresión de Fos en los lóbulos 1, 5, 7, 9 y 10 de la capa granular y en los lóbulos 1, 7 y 9 de la capa de Purkinje del vermis de cerebelo.
- No existe una mayor expresión de Fos en el núcleo fastigiado del cerebelo a las 6 h posterior a una lesión espinal.
- A las 24 h posterior a una lesión espinal existe un aumento en la expresión de Fos en los lóbulos 3 y 4 en la capa granular y en el núcleo fastigiado del vermis de cerebelo.
- A las 24 h posterior a una lesión espinal no existe un aumento en la expresión de Fos en la capa de Purkinje del vermis cerebelar.

Así, las conexiones del cerebelo son en realidad muy extensas y por lo tanto esta estructura podría tener funciones más amplias. Esto quiere decir que el cerebelo no procesa únicamente información sensorial-motora, proveniente de médula espinal y núcleos del tallo cerebral. Lo que se describió en la discusión sobre las conexiones entre el cerebelo y el hipotálamo, hace proponer que el cerebelo podría tener un papel en la coordinación de funciones autonómicas. Por otro lado, las aferentes corticales de áreas de asociación, como las de la corteza prefrontal, sugieren que el cerebelo, estaría también involucrado en funciones cognitivas superiores. En la presente tesis, se concluye que los lóbulos y el núcleo fastigiado presentaron actividad neural a través de la expresión de Fos como respuesta a la lesión de médula espinal en distintos tiempos de evolución. Estos lóbulos y núcleo medial del cerebelo procesan información sensorial-motora y autonómica, lo que indicaría alteraciones en estas funciones en ratas con lesión espinal.

10. PERSPECTIVAS

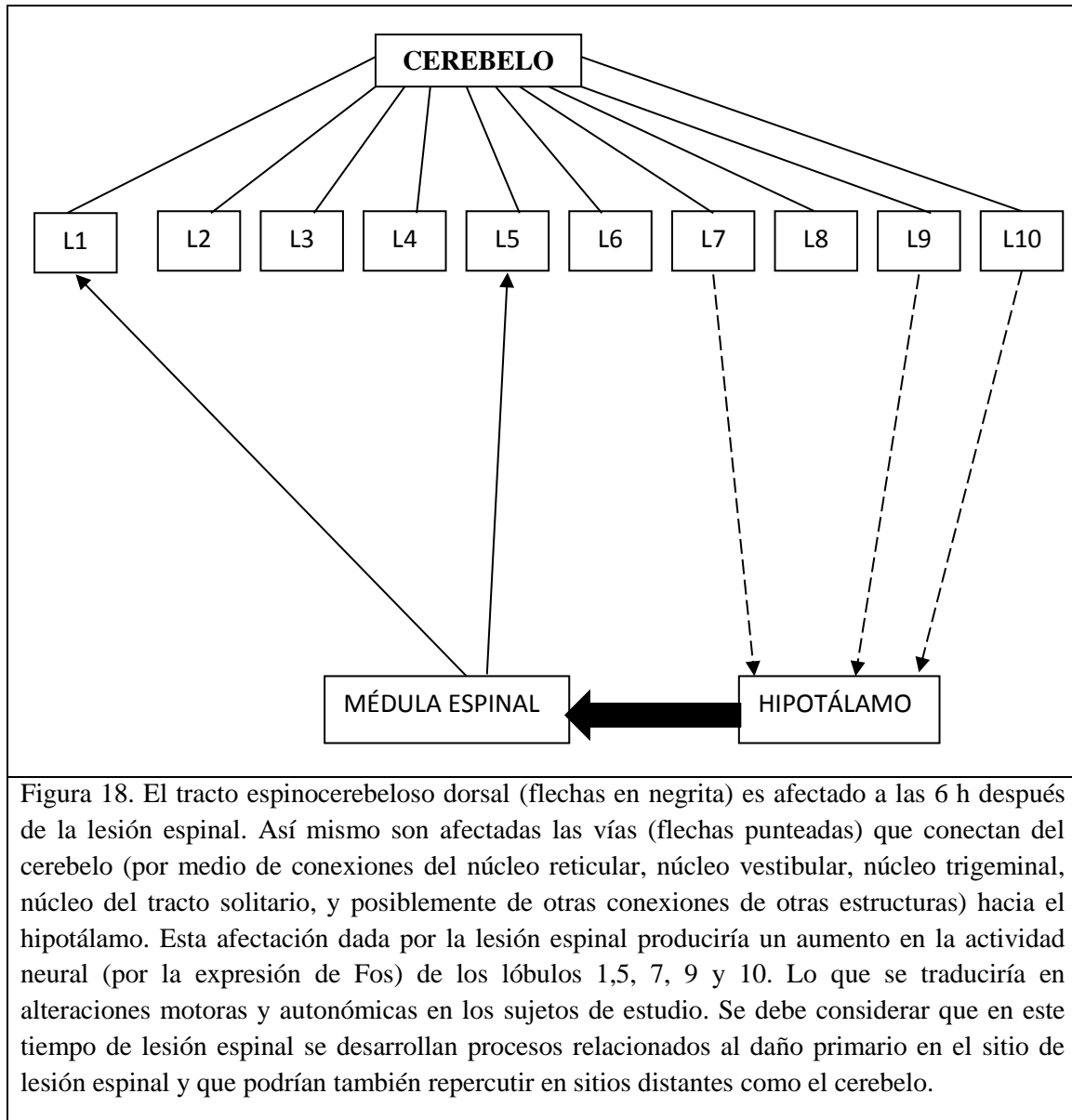
Considerando los datos obtenidos en este trabajo, existe la necesidad de realizar más investigaciones sobre la reacción del cerebelo (hemisferios y otros núcleos profundos del cerebelo) y de otras estructuras distales (e.g., núcleos del tallo cerebral que no han sido estudiados como la oliva inferior) al sitio de lesión, para que con ello se pueda obtener un circuito neural integral en este modelo de lesión espinal en la rata. Por lo cual, se propone como perspectivas lo siguiente:

- Analizar la expresión de Fos en áreas corticales de los hemisferios así como los núcleos profundos (núcleo dentado y núcleo interpósito anterior y posterior) del cerebelo después de una lesión espinal.
- Analizar la expresión de Fos en núcleos del tallo cerebral que posean conexiones directas con la corteza cerebral y los núcleos del cerebelo (oliva inferior, núcleos pontinos y núcleos vestibulares).
- Utilizar marcadores de procesos necróticos o apoptóticos como la técnica de TUNEL o apostaina en el tejido cerebelar de animales con lesión espinal en diferentes tiempos posterior a la lesión espinal.
- Usar técnicas de marcaje doble aunadas al Fos como GFAP, vimentina, entre otras, que permitan identificar los diferentes cuerpos celulares que muestran actividad posterior a una lesión espinal.
- Analizar por medio de registro eléctrico los efectos de la lesión espinal en la actividad neuronal de la corteza cerebelar y núcleos profundos del cerebelo en tiempos relacionados al daño primario, al daño secundario y a la recuperación.
- Comparar el efecto de la lesión espinal en el cerebelo en otros modelos estandarizados de lesión espinal como sección completa, hemisección o lesión por compresión.
- Aunque no se muestran datos en esta Tesis, se realizó también en estos grupos de ratas con lesión espinal de 6 y 24 horas, un análisis histológico a “*grosso modo*” sobre la expresión de Fos en la médula espinal lumbosacra (L6-S1) donde se encuentran motoneuronas involucradas en eventos reproductivos y procesos autonómicos. De manera general, se observó una mayor expresión de

Fos en el asta dorsal, medial, ventral y alrededor del epéndimo de la sustancia gris. Esto implica que se expresó una mayor activación neuronal en otro sitio distal (región lumbosacra) al daño espinal (región torácica). Sobre esto se requiere realizar un análisis más sistemático para observar si los cambios observados son realmente significativos estadísticamente.

11. MODELO

Como un modelo representativo de los resultados obtenidos en la presente tesis se propone lo siguiente:



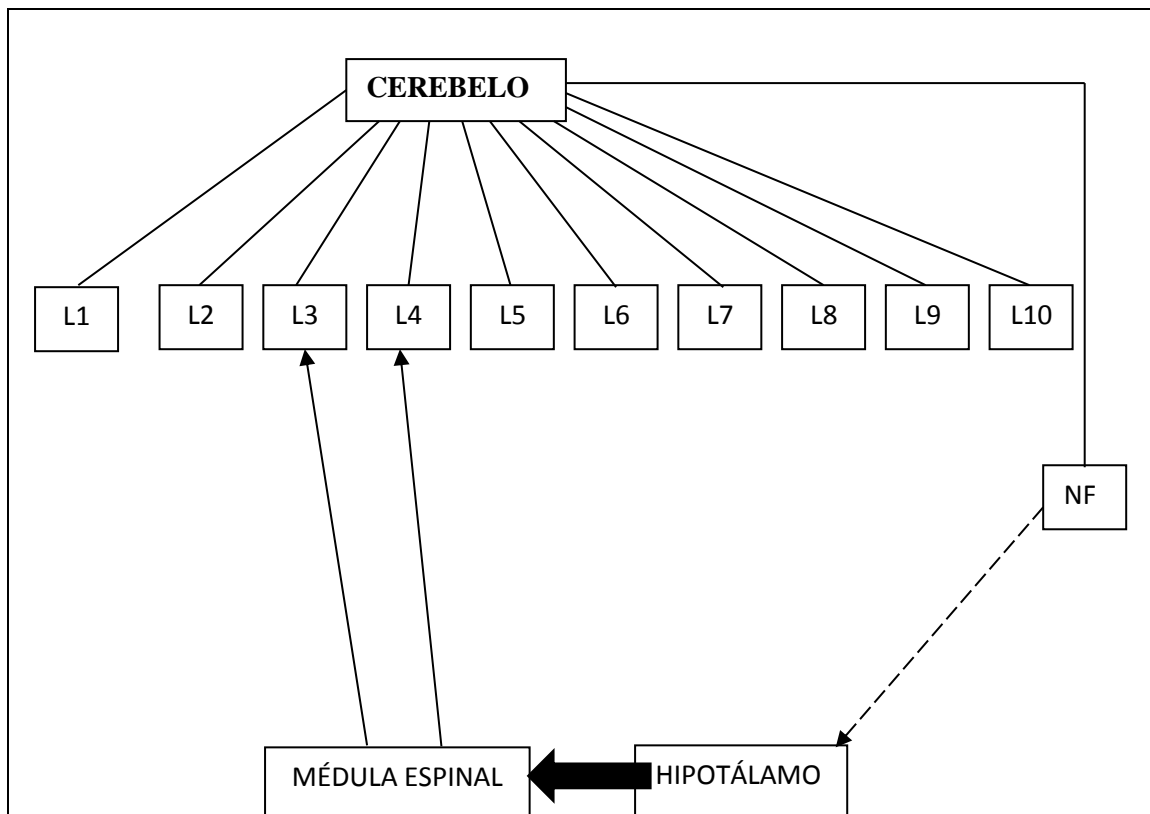


Figura 19. El tracto espinocerebeloso ventral (flechas en negrita) es afectado a las 24 h después de la lesión espinal. Así mismo son afectadas el núcleo medial (flechas punteadas) que conectan del cerebelo (por medio de conexiones del núcleo reticular, núcleo vestibular, y posiblemente de otras conexiones de otras estructuras) hacia el hipotálamo. Esta afectación dada por la lesión espinal produciría un aumento en la actividad neural (por la expresión de Fos) de los lóbulos 3 y 4 y núcleo fastigiado (NF) del cerebelo. Lo que se traduciría en alteraciones motoras y autonómicas en los sujetos de estudio. Se debe considerar que en este tiempo de lesión espinal se desarrollan procesos relacionados al daño secundario en el sitio de lesión espinal y que podrían también repercutir en sitios distantes como el cerebelo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Achari NK, Al-Ubaidy S, Downman CBB (1973) Cardiovascular responses elicited by fastigial and hypothalamic stimulation in conscious cats. *Brain Research*. 60: 439-447.
2. Allbutt, H. N.; Siddall, P. J. y Keay, K. A. (2007) Contusive spinal cord injury evokes localized changes in NADPH-d activity but extensive changes in Fos-like immunoreactivity in the rat. *Journal of Anatomy*. 211: 352–370.
3. Apps, R. y Garwicz, M. (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Neuroscience*, 6: 297-311.
4. Berretta, S.; Perciavalle, V. y Poppele, R. E. (1991) Origin of spinal projections to the anterior and posterior lobes of the rat cerebellum. *The journal of comparative neurobiology*, 305: 273-281.
5. Boyling, J. D. y Jull, G. A. (2006) Grieve. *Terapia Manual Contemporánea. Columna vertebral. Masson*. España. p. 247.
6. Bradesi, S. (2010) Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. *Neurogastroenterol Motil*. 22(5): 499–511.
7. Bracken, M.; Shepard, M. J.; Collins, W. F; Holford, T. R.; Young, W.; Baskin, D. S.; Eisenberg, H. M.; Flamm, E.; Leo-Summers, L.; Maroon, J.; Marshall, L. F.; Perot, Jr., P. L.; Piepmeier, J.; Sonntag, V. K. H.; Wagner, F. C.; Wilberger, J. E. y Winn, H. R. (1990) A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. *The New England Journal of Medicine*, 322 (20): 1405-1411.
8. Bradley DJ, Pascoe JP, Paton JFR y Spyer KM (1987a) Cardiovascular and respiratory responses evoked from the posterior cerebellar cortex and fastigial nucleus in the cat. *J. Physiol*. (1987a), 393, pp. 107-121
9. Bradley DJ, Paton JFR y Spyer KM (1987b) Cardiovascular responses evoked from the fastigial region of the cerebellum in anaesthetized and decerebrate rabbits. *J. Physiol*. (1987), 392, pp. 475-491.
10. Brodal P (1979) The pontocerebellar projections in the rhesus monkey: an experimental study with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 4:193–208.
11. Brodal P, Bjaalie JG, Aas JE (1991) Organization of the cingulo-pontocerebellar connections in the cat. *Anat Embryol (Berlin)* 184:245–254.
12. Budai, D. (2000) Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. *Acta Biologica Szegediensis*. 44:21-38.
13. Caballero, S. y Nieto-Sampedro, M. (2005) Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura. *Vet. Méx.*, 36 (1) 200: 74-86.

14. Çavdar S, Tangul S, Rezzan A, Ümit S y Filiz O. (2001) Cerebellar connections to the dorsomedial and posterior nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Anat.* 198: 37-45.
15. Collette F, Van der Linden M, Laureys S, Arigoni F, Delfiore G, Degueldre C, Luxen A, Salmon E (2007) Mapping the updating process: common and specific brain activations across different versions of the running span task. *Cortex* 43:146–158.
16. Collins HL, Rodenbaugh DW, DiCarlo SE. (2006) Spinal cord injury alters cardiac electrophysiology and increases the susceptibility to ventricular arrhythmias. *Prog Brain Res.* ;152:275-88.
17. Cunningham Jr., E.T., Sawchenko, P.E. (1991). Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends. Neurosci.* 14, 406-411.
18. Chen SH, Desmond JE (2005) Cerebrocerebellar networks during articulatory rehearsal and verbal memory tasks. *Neuroimage* 24:332–338.
19. Chida K, Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ. (1986) A novel vasodepressor response elicited from the rat cerebellar fastigial nucleus: the fastigial depressorresponse. *Brain Res.* 370(2):378-82.
20. Dahlberg, A.; Alaranta, H.; Kautiainen, H. y Kotila, M. (2007) Sexual activity and satisfaction in men with traumatic spinal cord lesion. *Journal of Rehabilitation Medicine.* 39: 152-155.
21. Del-Bel, E. A.; Borges, G. A. C.; Defino, H. L. A. y Guimarães, F. S. (2000) Induction of Fos protein immunoreactivity by spinal cord contusion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 521-528.
22. Delgado-García J M. (2001) Estructura y Función del cerebelo. *Rev Neurol.* 33:635-642.
23. Desmond JE, Gabrieli JD, Glover GH (1998) Dissociation of frontal and cerebellar activity in a cognitive task: evidence for a distinction between selection and search. *Neuroimage* 7:368–376.
24. Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, Ginier BL, Glover GH (1997) Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci* 17:9675–9685.
25. Dimitrova A, Kolb FP, Elles HG, Maschke M, Forsting M, Diener HC, Timmann D (2003) Cerebellar responses evoked by nociceptive leg withdrawal reflex as revealed by event-related FMRI. *J Neurophysiol* 90:1877–1886.
26. Dum RP, Strick PL (2003) An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projection to the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 89:634–639.
27. Estrada-Mondaca, S.; Carreón-Rodríguez, A.; Parra-Cid, M. C.; Ibarra-Ponce de León, C.; Velasquillo-Martínez, C.; Vacanti, C. A. y Belkind-Gerson, J. (2007) Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública*, 49: 437-444.

28. Ganong, W. (1982). Fisiología Médica. *Manual Moderno*. México, DF. pp, 29-213.
29. Glickstein, M. y Doron, K. (2008) Cerebellum: Connections and Functions. *Cerebellum*, 7:589–594.
30. Glickstein M, Gerrits N, Kralj-Hans I, Mercier B, Stein J, Voogd J. (1994) Visual pontocerebellar projections in the macaque. *J Comp Neurol*. 349(1):51-72
31. Grant, G. y Xu, Q. (1988) Routes of entry into the cerebellum of spinocerebellar axons from lower part of the spinal cord. *Experimental Brain Research*, 72: 543-561.
32. Haines DE, Dietrichs E, Sowa TE (1984) Hypothalamocerebellar and cerebello-hypothalamic pathways: a review and hypothesis concerning cerebellar circuits which may influence autonomic centers and affective behavior. *Brain, Behavior Evolution* 24: 198-220.
33. Haines DE, Dietrichs E, Mihailoff GA, McDonald EF (1997) Cerebellarhypothalamic axis: basis circuits and clinical observations. *Int Rev Neurobiol* 41:83–107.
34. Hebel, R. y Stromberg, M. W. (1986) Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. *BioMed Verlag*. Alemania. pp. 271-280.
35. Hui KK, Liu J, Marina O, Napadow V, Haselgrove C, Kwong KK, Kennedy DN, Makris N (2005) The integrated response of the human cerebrocerebellar and limbic systems to acupuncture stimulation at ST 36 as evidenced by fMRI. *Neuroimage* 27:479–496.
36. Jankowska, E. y Puczynska, A. (2008) Interneuronal Activity in Reflex Pathways from Group II Muscle Afferents Is Monitored by Dorsal Spinocerebellar Tract Neurons in the Cat. *The Journal of Neuroscience*. 28:3615–3622.
37. Jantzen KJ, Steinberg FL, Kelso JA (2004) Brain networks underlying human timing behavior are influenced by Kovács, K J. (2008) Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*. 20: 665–672.
38. prior context. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6815– 6820.
39. Kandel, E. R.; Schwartz, J. H. y Jessell, T. M. (2001) Principios de Neurociencias. *McGraw-Hill*. Madrid. p. 17; p. 1400.
40. Katoh, K.; Ikata, T.; Katoh, S. Hamada, Y.; Nakauchi, K.; Sano, T. y Niwa, M. (1996) Introduction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neuroscience Letters*, 216: 9-12.
41. Kovács, K J. (2008) Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*. 20: 665–672.
42. Larsell, O. (1948) The development and subdivisions of the cerebellum of birds. *The Journal of Comparative Neurology*, 89: 123-190.
43. Larsen, W. J. (2003) Embriología humana. *Elsevier Science*. Madrid. p. 97.

44. Liu, C.; Jin, A.; Zhou, C.; Chen, B. (2002) Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue. *Chinese Medical Journal*, 115: 740-742.
45. Liu T, Xu D, Ashe J, Bushara K (2008) The specificity of inferior olive response to stimulus timing. *J Neurophysiol* 100:1557–1561.
46. Linazasoro G. (2002) Trastornos de la marcha. Capítulo 6. En: Trastornos del movimiento. Masson. López del Val L J, Linazasoro G. 59-66 p. 60.
47. Ma, X.M., Aguilera, G. (1999). Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology*, 140. 5642-5650.
48. Manzo, J.; Miquel, M.; Toledo, R.; Mayor-Mar, J. A.; García, L. I.; Aranda-Abreu, G. E., Caba, M. y Hernández, M. E. (2008) Fos expression at the cerebellum following non-contact arousal and mating behavior in male rats. *Physiology and Behavior*, 93: 357-363.
49. Manzo, J.; Esquivel, A.; Hernández, M. E.; Carrillo, P.; Martínez-Gómez, M. y Pacheco, P. (1997) The role of pubococcygeous muscle in urinary continence in the male rat. *Journal of Urology*. 157: 2402-2406.
50. Manzo, J.; Nicolas, L.; Hernandez, M. E.; Cruz, M. R.; Carrillo, P. y Pacheco, P. (1999) Spinal organization and steroid sensitivity of motoneurons innervating the pubococcygeous muscle in the male rat. *J. Comp. Neurol.* 409: 358-368.
51. Manzo, J.; Vasquez, M. I.; Cruz, M. R.; Hernandez, M. E.; Carrillo, P. y Pacheco, P. (2000) Fertility ratio in males: Effects after denervation of two pelvic floor muscles. *Physiol & Behav.* 68: 611-618.
52. Matsushita M. (1991) Cerebellar projections of the central cervical nucleus in the rat: an anterograde tracing study. *Neurosci Res.* 12:201-16.
53. Matsushita M. (1999) Projections from the upper lumbar cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by the anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol.* 412:633-48.
54. Merck & Co. (1999). Manual Merck. *Harcourt*, España.
55. Maynard Jr., F. M.; Bracken, M. B.; Creasey, G.; Ditunno, Jr., J. F.; Donovan, W. H.; Ducker, T. B.; Garber, S. L.; Marino, R. J.; Stover, S. L.; Tator, C. H.; Waters, R. L.; Wilberger, J. E. y Young, W. (1997). International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. *Spinal Cord*, 35: 266-274.
56. Miller, M. (2008) Brain Facts. A primer on the brain and nervous system. Society for neuroscience. Sexta edición. EUA. p. 20, 50.
57. Monti MM, Osherson DN, Martinez MJ, Parsons LM (2007) Functional neuroanatomy of deductive inference: a language-independent distributed network. *Neuroimage* 37:1005–1016.

58. Morton, S. M. y Bastian, A. J. (2003) Relative Contributions of Balance and Voluntary Leg-Coordination Deficits to Cerebellar Gait Ataxia. *Journal of Neurophysiology*, 89: 1844-1856.
59. Muñoz-Quiles, C. (2007) Transplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates. Tesis. Edita: Universitat de València. Servei de Publicacions.
60. Muramatsu, H.; Suzuki, K.; Sasaki, T.; Matsumoto, M.; Sakuma, J.; Oinuma, M.; Itakura, T. y Kodama, N. (2009) Evoked potentials elicited on the cerebellar cortex by electrical stimulation of the rat spinocerebellar tract. *Surgical Neurology*, 72: 395–400.
61. Nieto-Sampedro, M; Collazos-Castro, J. E.; Taylor, J. S.; Gudiño-Cabrera, G; Verdú-Navarro, E; Pascual-Piédrola, J. I y Insausti-Serrano, R. (2002) Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *REV NEUROL*, 35 (6): 534-552.
62. NINDS. National Institute of Neurological Disorder and Stroke (2005). Lesión de la Médula Espinal: Esperanza en la Investigación. EN: http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/lesion_de_la_medula_espinal.htm
63. Nógrádi, A. y Vrbová, G. (2005) Anatomy and Physiology of the Spinal Cord EN: Nógrádi, A. (Eds.) Transplantation of Neural Tissue into the Spinal Cord. Georgetown. EUA. p. 17.
64. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-Z00-1999). En: Diario Oficial de la Federación, México, 6 de diciembre de 1999.
65. Ortiz-Pulido R, Miquel M, Garcia LI, Perez CA, Aranda-Abreu GE, Toledo R, Hernandez ME, Manzo J. (2011) Sexual behavior and locomotion induced by sexual cues in male rats following lesion of Lobules VIa and VII of the cerebellar vermis. *Physiol Behav*. 103(3-4):330-5.
66. Owyang, Ch. y Heldsinger, A. (2011) Vagal Control of Satiety and Hormonal Regulation of Appetite. *J Neurogastroenterol Motil*. October; 17(4): 338–348.
67. Päällysaho, J.; Sugita, Sh. y Noda, H. (1991) Brainstem mossy fiber projections to lobules VIa, VI b,c, VII and VIII of the Cerebellar vermis in the rat. *Neuroscience Research*. 12: 217-231.
68. Parsons LM, Denton D, Egan G, McKinley M, Shade R, Lancaster J, Fox PT. (2000) Neuroimaging evidence implicating cerebellum in support of sensory/cognitive processes associated with thirst. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(5):2332-6.
69. Paxinos, G. y Watson, Ch. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. California.

70. Pérez, C. A.; Concha, A.; Hernández, M. E. y Manzo, J. (2005). Influence of the paraventricular nucleus and oxytocin on the retrograde stain of pubococcygeus muscle motoneurons in male rats. *Brain Research*, 1041: 11-18.
71. Pijpers A, Apps R, Pardoe J, Voogd J, Ruigrok T J H. (2006) Precise Spatial Relationships between Mossy Fibers and Climbing Fibers in Rat Cerebellar Cortical Zones. *The Journal of Neuroscience*. 26(46): 12067-12080.
72. Popescu, B. F.; Lennon, V. A.; Parisi, J. E.; Howe, C. L.; Weigand, S. D. (2011) Neuromyelitis optica unique area postrema lesions: nausea, vomiting, and pathogenic implications. *Neurology* 76: 1229–1237.
73. Purves, D; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D; Hall, W.C.; LaMantia, A-S; McNamara, J. O. y Williams, S. M. (2004) *Neuroscience: Third edition*. Sinauer Associates. Sunderland. E.U. p.147.
74. Richter S, Gerwig M, Aslan B, Wilhelm H, Schoch B, Dimitrova A, Gizewski ER, Ziegler W, Karnath HO, Timmann D (2007) Cognitive functions in patients with MR-defined chronic focal cerebellar lesions. *J Neurol* 254:1193–1203.
75. Rivero-Melián, C y Grant, G. (1990) Lumbar dorsal root projections to spinocerebellar cell groups in the rat spinal cord: a double labeling study. *Experimental Brain Research*, 81: 85-94.
76. Rodríguez, A. (2004) Lesión de la médula espinal: mecanismos del daño medular. *Boletín del Departamento de Docencia e Investigación. IREP*, 8: 69-73.
77. Rodrigues, N. R.; Letaif, O. B.; Cristante, A. F.; Marcon, R. M.; Oliveira, R. P. y Barros Filho, T. E. P. (2010) Standardization of spinal cord injury in Wistar rats. *Acta Ortopédica Brasileira*. 18:182-6.
78. Ruggiero, D. A.; Anwar, M.; Kim, J.; Gootman N. y Gootman, P. M. (1997) Induction of c-fos gene expression by spinal cord transaction in the rat. *Brain Research*, 763: 21-29.
79. Schmahmann J. (2004) Disorders of the Cerebellum: Ataxia, Dysmetria of Thought, and Cerebellar Cognitive Affective Syndrome. *The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences*, 16: 367-375.
80. Schoenen J. y Grant G. (2004) 8. Spinal Cord: Connections. En: Paxinos, G. y Jürgen, K. M. (Eds.) *The Human Nervous System. ELSEVIER Academic Press*. California, pp. 233-243.
81. Schuenke, M.; Schulte, E. y Schumacher, U. (2007) *Atlas of Anatomy. Head and Neuroanatomy. Thieme*. pp. 274-283.
82. Schwab, M. E. y Bartholdi, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological Reviews*. 76: 319-370.

83. Steinmetz, M. P.; Anderson, P. A.; Patel, R. y Resnick, D. K. (2010) Anatomía y fisiología de la lesión medular espinal. En: Kim, D.H. (Ed.) Atlas de lesiones espinales en adultos y niños. *ELSEVIER*. España, pp. 11-18.
84. Stoodley CJ, Schmammann JD (2009) Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* 44:489–501
85. Stoodley C.J. y Schmammann, J.D. (2010) Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex*. 46(7):831-44.
86. Tang Y, Rampin O, Calas A, Facchinetti P, Giuliano F (1998) Oxytocinergic and serotonergic innervation of identified lumbosacral nuclei controlling penile erection in the male rat. *Neuroscience* 82: 241-254.
87. Tator, Ch. (1998) Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery*, 42: 696-707.
88. Tohyama, M., Takatsuji, K. y Sri Kantha, S. (1998) Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. *Oxford University*, pp. 323-325.
89. Tian, J. B. y Bishop, G. A. (2002) Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 23: 157–170.
90. Tribollet E, Arsenijevic Y, Barberis C (1998) Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog Brain Res* 119: 45-55.
91. Thibodeau, G. A. y Patton, K. T. (1998) Estructura y función del cuerpo humano. Elsevier España.
92. Turner BM, Paradiso S, Marvel CL, Pierson R, Boles Ponto LL, Hichwa RD, RobinsonRG (2007) The cerebellum and emotional experience. *Neuropsychologia* 45:1331–1341.
93. Watson, T. C., Jones, M. W. y Apps, R. (2009) Electrophysiological mapping of novel prefrontal – cerebellar pathways *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 18: 1-11.
94. Wagner CK, Clemens LG (1991) Projections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus to the sexually dimorphic lumbosacral region of the spinal cord. *Brain Res* 539: 254-262.
95. Wagner CK, Clemens LG (1993) Neurophysin-containing pathway from the paraventricular nucleus of the hypothalamus to a sexually dimorphic motor nucleus in lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 336: 106-116.
96. Wagner CK, Sisk CL, Clemens LG (1993) Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the sexually dimorphic lower lumbar spinal cord concentrate 3H-estradiol in the male rat. *J Neuroendocrinol* 5: 545-551.
97. Willis Jr., W. D. (2006) Sistema Nervioso. En: Levy, N. M.; Koeppen, B. M. y Stanton, B. A. (Eds.) Berne y Levy. Fisiología. *Elsevier*. Madrid. p. 130.

98. Wu, X.; Yoo, S. y Wrathall, J. R. (2005) Real-time quantitative PCR analysis of temporal-spatial alterations in gene expression after spinal cord contusion. *Journal of Neurochemistry*, 93:943-52.
99. Xu, Y.; Zheng, Z.; Ho, K. P. y Qian, Z. (2006). Effects of spinal cord injury on c-fos expression in hypothalamic paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Research*, 1087: 175-179.
100. Vaquero, J.; Zurita, M. y Oya, S. (2004) Estudio de la apoptosis oligodendroglial tras un traumatismo de la médula espinal y su modificación mediante la administración de metilprednisolona. *MAPFRE MEDICINA*, 15: 91-100.
101. Zheng Zh, Dietrichs E, Walberg F (1982) Cerebellar afferent fibers from the dorsal vagal nucleus in the cat. *Neuroscience Letters*. 32, 113: 118.
102. Zurita, M.; Vaquero, J. y Oya, S. (2002) Significado de la apoptosis tras una lesión traumática de la médula espinal. *MAPFRE Medicina*, 13: 7-14.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-HT_{1,7}: Receptor serotoninérgico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPA: Receptores AMPA

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ASIA. Asociación Americana de Lesión Espinal.

ATP: Adenosín Trifosfato

Ca⁺²: Ión Calcio.

CC. Columna de Clarke.

CD95. Glicoproteína de membrana ubicada como receptor de GNF y TNF.

c-fos. Proto-onco-gen de activación temprana.

cGr. Capa granular.

CGRP: péptidos derivado del gen calcitonina

Cl⁻: Ión Cloro.

cM. Capa moelcular.

cPk. Capa de Purkinje.

D₂: Receptor dopaminérgico dos.

D α ₂: Receptor dopaminérgico alfa dos.

FNT- α . Factor de necrosis tumoral alfa.

Fos. Proteína codificada por el gen c-fos.

GABA: Ácido gamma-amino-butírico.

GABA_A: Receptor B a GABA.

GABA_B: Receptor A a GABA.

GADPDH. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GFAP. Proteína ácida *fibrilar glial*.

GluR2. Subunidad al receptor AMPA.

GNF. Factor de crecimiento nervioso.

GRD: Ganglio de la raíz dorsal.

IL-1. Interleucina-1.

iNOS. Óxido nítrico sintasa inducible.

K⁺: Ión Potasio.

kD. KiloDalton.

LME: Lesión de medula espinal

MCMZ. microcomplejos multizonales

Na⁺: Ión Sodio.

NADPH-d: enzima dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa.

NCC. Núcleo cervical central.

NMDA: N-Metil de Aspartato.

nNOS. Óxido nítrico sintasa neuronal.

NPV. Núcleo paraventricular.

NR1. Subunidad al receptor NMDA.

NSO. Núcleo supraóptico.

Pc: Músculo pubococcígeo.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

pH. Potencial de hidrógeno.

PLP1. Proteína proteolípida 1.

SCEP. Potencial espinocerebeloso evocado.

SNC: Sistema nervioso central.

SSEP. Potencial evocado somatosensorial.

TECD. Tracto espinocerebeloso dorsal.

TECV. Tracto espinocerebeloso ventral.

TNF. Factor de necrosis tumoral.

TUNEL: Marcación de la UTP final mediada por la transferasa desoxinucleotidil terminal.

WGA-HRP: Peroxidasa de rábano con aglutinina de germen de trigo.

ÁPENDICE A.

Fundamento de inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica o inmunocitoquímica es una técnica de inmunotinción que permite demostrar una gran variedad de antígenos presentes en células o tejidos. Los reactivos fundamentales comunes en todas las técnicas inmunohistoquímicas son los anticuerpos los cuales pertenecen a un grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas.

Estas técnicas se basan en la capacidad de estos anticuerpos de unirse específicamente a los antígenos correspondientes. Los anticuerpos usados en las técnicas de inmunohistoquímicas pueden ser policlonales o monoclonales.

Los *anticuerpos policlonales* son producidos por diferentes células plasmáticas, y en consecuencias no son similares inmunohistoquímicamente. Estos reaccionan con varios epítopes sobre el antígeno para el cual fueron originados. Los animales utilizados con mayor frecuencia para la producción de anticuerpos policlonales son el conejo, seguido por la cabra, el cerdo, la oveja, el caballo, el conejillo de indias, entre otros. La popularidad de los conejos para la producción de anticuerpos policlonales se atribuye primordialmente a su fácil mantenimiento dentro del laboratorio.

Los *anticuerpos monoclonales* son el producto de un clon individual de células plasmáticas. Los anticuerpos de un clon dado son idénticos inmunohistoquímicamente y reaccionan con un epítoto específico en el antígeno contra el cual han sido originados. Es probable que por razones de economía los ratones sean utilizados casi exclusivamente para la producción de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales tienen la gran ventaja de poseer una baja especificidad.

En inmunocitoquímica, la afinidad funcional de un anticuerpo se puede definir por el tiempo que requiera para alcanzar el equilibrio con el anticuerpo tisular. La afinidad de los anticuerpos también se relacionan con su capacidad para formar complejos inmunes insolubles, mientras mas alta sea la afinidad del anticuerpo, mayor será su tendencia a formar un precipitado.

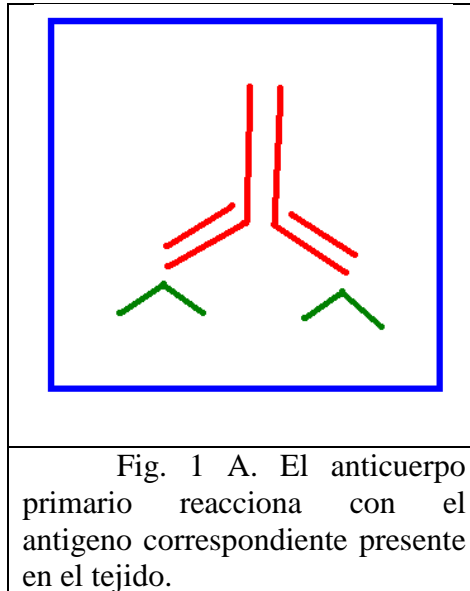
La inmunohistoquímica puede ser de dos tipos: inmunoperoxidasa e inmunofluorecencia. En las técnicas inmunoperoxidasa se utiliza como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro mediante una reacción enzima-sustrato para convertir a un cromógeno sin color en productos finales coloreados. Las enzimas mas frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina como 3,3'-diaminobencidina (DAB).

El tejido a estudiar se lava con amortiguador de fosfatos (Ph=7) con el fin de prepararlo para recibir el tratamiento. También se realizan lavados con el detergente agregado a este buffer (Tritón) antes de agregar los anticuerpos, con el fin de remover ligeramente la membrana celular para facilitar el paso de sustancias.

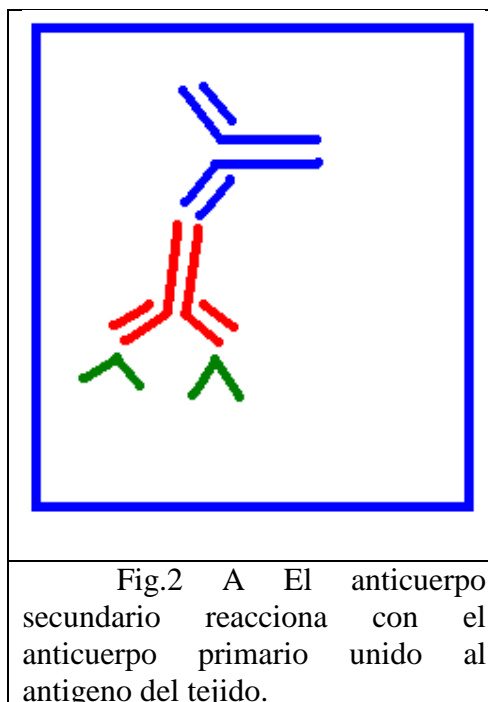
Si se realiza una técnica inmunoenzimática se debe hacer una eliminación de las enzimas peroxidadas endógenas, las cuales están presentes en el tejido y pueden interferir en la reacción final de coloración. Esta eliminación de peroxidadas endógenas se lleva a cabo lavando el tejido con peróxido de hidrogeno. Este forma un complejo catalíticamente inactivo con estas peroxidadas que se descomponen en agua y oxígeno atómico, lo cual causa formación de espuma. El exceso de peróxido de hidrogeno y la ausencia de un donante de electrones (por ejemplo una sustancia cromogénica) causa un bloqueo de la actividad de las peroxidadas endógenas.

Actualmente, la mayoría de los métodos de coloración inmunohistoquímicos en uso están basados en la alta afinidad que la avidina de clara de huevo tienen por la biotina para intensificar la señal producida por el cromógeno.

Esta tecnología consiste en agregar primero el anticuerpo primario, el cual se unirá al antígeno (Fig. 1A). Este anticuerpo se incuba hasta que alcance su máxima reactividad, la cual se da en 48 horas de incubación para la mayor parte de los anticuerpos primarios.

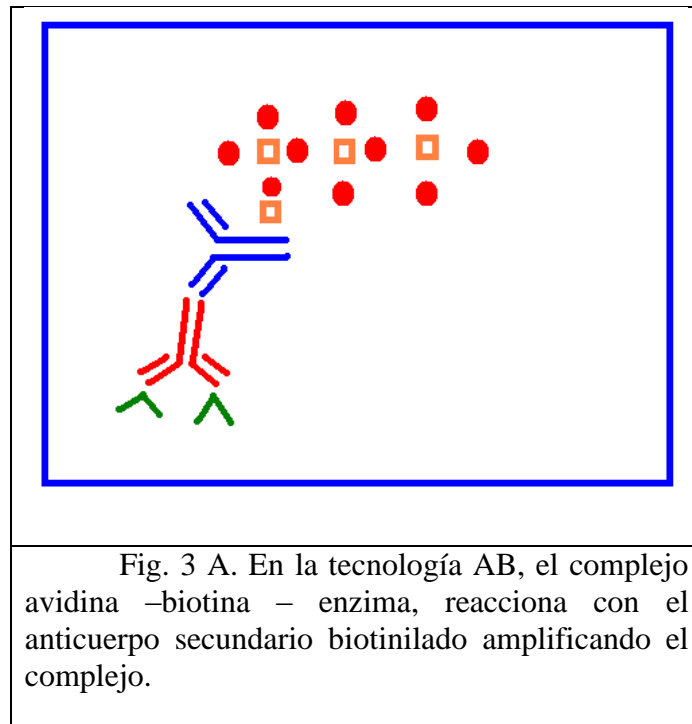


Posteriormente se aplica el anticuerpo secundario biotinilado que se dirige contra el anticuerpo primario (ahora antígeno), el cual por lo general se incuba por un lapso de 90 minutos a temperatura ambiente (Fig. 2A). Como el anticuerpo primario está hecho en conejo, el anticuerpo secundario se dirige contra las inmunoglobulinas del conejo (contra conejo).



Puede haber reacciones no deseadas si el anticuerpo secundario tiene una reacción cruzada con las inmunoglobulinas tisulares. Sin embargo esta reacción cruzada se evita colocando suero normal de cabra en la solución del anticuerpo primario, el cual contiene antígenos que reaccionan con estas inmunoglobulinas con el fin de bloquearlas y que no puedan interferir en la reacción del complejo antígeno-anticuerpo primario – anticuerpo secundario .

Como se mencionó anteriormente, después se agrega el complejo preformado (estrept) avidina (*streptomyces avidinii*) y avidina (clara de huevo) con biotina (complejo AB), el cual contienen la enzima peroxidasa que cataliza la reacción final. La formación de este requiere que las soluciones (estrept) avidina y la enzima biotinilada sean mezcladas en una porción óptima y sean preparadas por lo menos 30 minutos antes de su uso . El complejo AB se une al anticuerpo secundario biotinilado. La avidina posee cuatro sitios de unión para la biotina, pero a causa de la orientación molecular de los sitios de unión menos de cuatro moléculas de biotina se unirán realmente (Fig. 3A). De acuerdo a lo anterior, el complejo AB sirve como un amplificador para poder observar mejor la unión antígeno – anticuerpo primario – anticuerpo secundario.



Finalmente se lleva a cabo el revelado, el cual se basa en una reacción de oxidación-reducción. La actividad de las peroxidasa, en presencia de un donante de electrones (DAB), resulta primero en la formación de un complejo sustrato–enzima y luego en la oxidación del donante electrón. Este donante provee la fuerza de impulso en la continua catálisis de H_2O_2 mientras que su ausencia detiene definitivamente la reacción. La actividad enzimática depende de diversas variables tales como las concentraciones de enzimas y sustratos, el pH, la concentración del buffer, la temperatura y la luz. Así mismo, la actividad de la peroxidasa requiere la presencia de iones metálicos tales como el Zn^{+2} , que funcionan como agente electrolítico (atracción

de electrones). La DAB produce un color marrón final que es altamente soluble en alcohol y demás solventes orgánicos.

Controles. En inmunohistoquímica se utilizan controles de reactivo y de tejido ya que son necesarios para la validación de los resultados de la coloración. Sin su uso, la interpretación de la coloración sería casi casual y los resultados de dudoso valor. Los controles permiten determinar si los protocolos de coloración han sido seguidos correctamente, si han ocurrido variaciones de día a día y si los reactivos permanecen en buenas condiciones de funcionamiento.

Específicamente, los controles del reactivo (negativos) se obtienen al omitir la aplicación en el tejido del anticuerpo primario pero siguiendo todas las demás etapas posteriores a la inmunocitoquímica. Los buffers utilizados para la dilución son idénticos. El otro tipo de control es el de tejido, que pueden ser negativos y positivos. Para los controles negativos el tejido se procesa en forma idéntica al estudiado en el espécimen pero debe contener el antígeno buscado. En algunos casos será ventajoso que este tejido de control coloree positivo en forma marginal para determinar no sólo la presencia del antígeno, sino además cualquier pérdida de sensibilidad del anticuerpo (Boenisch y cols., 2002)

ÁPENDICE B.

Escala Tarlov.

Los grupos de tratamiento para 6 h fueron habituados dos días antes de la perfusión a la sala de cirugía durante dos horas a partir de las 9 h (de 9 a 11 h). A esa hora fueron devueltas al bioterio. Posterior a 6 h de la cirugía se midió su nivel de motricidad con la escala Tarlov. Esto con la intención de que se encontraran recuperadas de la operación y no presentaran efectos anestésicos durante las mismas. Mientras que para los grupos de tratamiento de 24 h se les habituó de 9 a 11 h a la sala de cirugía dos días antes de la perfusión. A las 11 h fueron devueltas al bioterio. Se les midió de igual manera escala Tarlov 24 h después de la cirugía.

Una vez recuperadas, a las 6 h y 24 h posterior a la cirugía se les realizó la prueba de motricidad por 5 min en base a la escala propuesta por Tarlov, la cual mide los movimientos de las extremidades inferiores (patas traseras) en caso de lesiones por contusión para evaluar el daño y de esta manera observar síntomas del daño primario secundario a nivel motor y autónomo.

ESCALA TARLOV	FUNCIÓN MOTORA
0	Paraplejía espástica sin movimiento de las extremidades inferiores.
1	Paraplejía espástica y movimiento ligero de las extremidades inferiores.
2	Pequeños movimientos de las extremidades inferiores pero incapaz de soportar su peso.
3	Capaz de sostenerse pero incapaz de caminar normalmente.
4	Recuperación completa o locomoción normal.
Escala Tarlov para clasificar la función motora de las extremidades inferiores (Tomado de Kazama S y cols., 2001)	

Los animales de los grupos de lesión espinal de 6 h y 24 h se ubicaron en el grado 2 de la escala de Tarlov; es decir, paraplejía parcial. Los grupos de animales Intactos y Sham presentaron grado 4.

ÁPENDICE C.

Tablas de medias con error estándar en cada capa analizada de la corteza cerebelar.

Expresión de Fos (tabla 1) en la capa granular del vermis perteneciente a ratas Control (n=6), Sham (n=5) y Lesión espinal (n=6) posterior a las 6 horas de la Lesión Espinal.

Lóbulo	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
1	119.00 \pm 25.48	130.47 \pm 28.97	220.22 \pm 27.81*
2	146.00 \pm 43.71	153.03 \pm 32.29	234.67 \pm 51.57
3	123.53 \pm 40.82	118.43 \pm 16.52	188.67 \pm 31.60
4	120.69 \pm 48.06	139.53 \pm 31.91	208.22 \pm 40.02
5	236.78 \pm 54.72	304.23 \pm 48.39	400.67 \pm 35.67*
6	259.86 \pm 48.21	318.50 \pm 30.39	394.64 \pm 41.98
7	224.06 \pm 24.29	282.33 \pm 36.18	419.97 \pm 33.28**
8	244.05 \pm 53.55	291.83 \pm 36.42	395.05 \pm 44.78
9	321.11 \pm 39.37	259.83 \pm 45.03	447.81 \pm 48.00*
10	247.94 \pm 52.83	273.23 \pm 59.36	456.14 \pm 21.57**

Tabla 1. La prueba MLG mostró diferencias significativas entre los grupos. * significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.05$, ** significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.01$ con la prueba pos-hoc Contrastes Múltiples.

En la siguiente Tabla 2 se presentan las medias y los errores estándar para cada lóbulo en los diferentes tratamientos a las 6 horas después de la Lesión Espinal con respecto a la expresión de Fos dentro de la capa de Purkinje.

Lóbulo	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
1	6.78 \pm 1.87	6.27 \pm 0.48	11.44 \pm 1.37*
2	12.78 \pm 3.81	14.23 \pm 2.74	21.92 \pm 3.91
3	9.72 \pm 2.23	10.20 \pm 2.45	13.53 \pm 0.84
4	12.67 \pm 2.78	11.00 \pm 2.92	20.28 \pm 2.96
5	20.50 \pm 1.65	20.83 \pm 2.82	26.50 \pm 2.54
6	20.44 \pm 2.46	22.56 \pm 1.92	27.72 \pm 2.37
7	17.72 \pm 2.74	18.53 \pm 1.06	26.25 \pm 2.15**
8	19.36 \pm 1.59	16.00 \pm 1.97	24.64 \pm 1.91
9	14.39 \pm 1.59	13.40 \pm 0.97	21.03 \pm 1.90*
10	10.97 \pm 2.12	10.43 \pm 1.86	15.00 \pm 2.85

Tabla 2. La prueba MLG mostró diferencias significativas entre los grupos. * significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.05$, ** significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.01$ con la prueba pos-hoc Contrastes Múltiples.

A continuación se muestra la Tabla 3 donde se ven las medias y los errores estándar en la expresión de Fos dentro del Núcleo Fastigiado:

	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
	46.19 \pm 9.97	42.73 \pm 10.83	60.03 \pm 5.73

Tabla 3. Expresión de Fos en el Núcleo Fastigiado del cerebelo a las 6 horas posterior a la Lesión Espinal.

La Tabla 4 muestra las medias y los errores estándar para cada lóbulo en los diferentes tratamientos a las 24 horas después de la Lesión Espinal con respecto a la expresión de Fos dentro de la capa granular.

Lóbulo	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
1	214.03 \pm 49.45	182.50 \pm 37.35	310.03 \pm 46.65
2	177.44 \pm 47.35	150.26 \pm 44.58	312.14 \pm 49.14
3	141.00 \pm 37.66	87.99 \pm 29.71	262.81 \pm 33.70*
4	164.78 \pm 36.51	137.46 \pm 35.61	365.94 \pm 43.35**
5	348.55 \pm 43.12	300.03 \pm 39.06	433.61 \pm 16.43
6	351.56 \pm 40.38	349.03 \pm 35.20	418.14 \pm 14.83
7	332.17 \pm 66.64	292.43 \pm 55.43	427.78 \pm 23.99
8	322.08 \pm 59.64	271.06 \pm 47.98	416.19 \pm 19.70
9	309.56 \pm 54.11	327.26 \pm 25.80	381.67 \pm 28.00
10	347.14 \pm 60.98	291.79 \pm 46.09	397.86 \pm 50.15

Tabla 4. La prueba MLG mostró diferencias significativas entre los grupos. * significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.05$, ** significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.01$ con la prueba pos-hoc Contrastes Múltiples.

La Tabla 5 que se muestra a continuación contiene las medias y los errores estándar para cada lóbulo en los diferentes tratamientos a las 24 horas después de la Lesión Espinal con respecto a la expresión de Fos dentro de la capa de Purkinje.

Lóbulo	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
1	11.56 \pm 3.25	9.07 \pm 2.22	12.72 \pm 3.34
2	17.97 \pm 3.35	18.53 \pm 2.18	25.64 \pm 3.45
3	16.75 \pm 4.61	14.97 \pm 2.53	17.56 \pm 4.67
4	18.14 \pm 3.66	17.93 \pm 1.94	18.92 \pm 3.98
5	21.14 \pm 2.28	24.57 \pm 2.15	27.78 \pm 2.29
6	20.92 \pm 2.05	24.57 \pm 3.05	24.22 \pm 3.71
7	17.64 \pm 3.19	18.97 \pm 1.89	22.67 \pm 3.56
8	18.42 \pm 2.79	19.20 \pm 2.14	22.75 \pm 2.36
9	18.44 \pm 2.16	16.77 \pm 2.61	19.42 \pm 3.28
10	11.19 \pm 1.87	15.07 \pm 2.89	15.39 \pm 4.78

Tabla 5. La prueba MLG no mostró diferencias significativas entre los grupos al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.05$ con la prueba pos-hoc Contrastes Múltiples.

Se muestra a continuación la Tabla 6 donde se ven las medias con su error estándar con respecto a la expresión de Fos en el Núcleo Fastigiado:

	Grupo		
	Intacto	Sham	Lesión Espinal
	Media \pm error s.	Media \pm error s.	Media \pm error s.
	44.46 \pm 7.82	48.50 \pm 8.17	67.69 \pm 1.20*

Tabla 6. La prueba MLG mostró diferencias significativas entre los grupos. * significativamente diferente al Lóbulo del grupo Control, $p < 0.05$ con la prueba pos-hoc Contrastes Múltiples.