

**RESPUESTA MEDULAR A LA APLICACIÓN DE POLIETILENGLICOL LUEGO
DEL TRAUMA MEDULAR AGUDO EXPERIMENTAL EN LA RATA**

SPINAL CORD RESPONSE TO POLYETHYLENE GLYCOL APPLICATION AFTER EXPERIMENTAL
ACUTE MEDULAR TRAUMA IN RAT

Blanco, C.¹; Acerbo, M.¹; Calaudi, P.¹; Consejero, E.¹; Martín, E.¹; Sánchez, G.¹; Vidal
Figueredo, R.¹ & Pellegrino, F.¹

Cátedra de Anatomía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Recibido: 01-11-2016

Aceptado: 10-12-2017

Correspondencia e-mail: Carlos Blanco cblanco@fvet.uba.ar

RESUMEN

La característica multivariada de las lesiones producidas por el Trauma Medular Agudo hace necesaria la utilización de modelos animales completos. En este trabajo se estudia el efecto protector del polietilenglicol, fusógeno celular de mediano peso molecular, en la médula espinal traumatizada de ratas. La aplicación inmediata del polietilenglicol en la médula espinal lesionada produjo una significativa disminución de los signos clínicos, así como también una disminución de los indicadores histopatológicos de respuesta secundaria al trauma medular. Se discuten los resultados obtenidos comparándolos con diferentes grupos control. Concluimos que el efecto neuroprotector del polietilenglicol aplicado en el sitio de la lesión arroja resultados que apoyan la necesidad de probar su efecto sistémico en animales de experimentalmente lesionados.

Palabras claves: (médula espinal), (fusógenos celulares), (neuroprotección), (laminectomía experimental)

SUMMARY

After the primary mechanical Spinal Cord Injury, there is a complex secondary injury cascade that leads to the progressive death of otherwise potentially viable axons and cells and that impairs endogenous recovery processes. In this paper we discuss the effect of a 1 min application of polyethylene glycol, a hydrophilic polymer and cel fusogen, to a standardized compression injury to the cord. A significative reduction of clinical signs as well as a decrease of histopathological indicators of secondary response to spinal cord trauma. Comparing the results obtained with different control groups. We conclude that the neuroprotective effect of polyethylene glycol applied on the site of the lesion supports the need to prove its systemic effect in animals experimentally injured.

Key words: (spinal cord), (cel fusegen), (neuroprotection), (experimental laminectomy)

INTRODUCCIÓN

Las lesiones espinales posteriores al trauma medular agudo (TMA) resultan en consecuencias devastadoras tanto en humanos como en animales. En Medicina Humana se estima una prevalencia que va de 11 a 50 casos por millón de habitantes en los países desarrollados⁽³⁷⁾. En caninos, si bien no se tiene una estimación de la prevalencia, puede afirmarse que un 2% de los casos que asisten a consulta corresponden a TMA, de los cuales un 40% se debe a patologías del disco intervertebral y el resto a accidentes automovilísticos⁽⁵¹⁾.

La hipótesis para explicar la fisiopatología del TMA se sustenta en el concepto del mecanismo en dos etapas: la lesión primaria y la secundaria. La respuesta secundaria se debe a una serie de procesos desencadenados a partir de la lesión primaria, entre los que aparece como principal protagonista la ruptura de las membranas celulares de las neuronas.

La lesión de las membranas neuronales desempeña un papel fundamental en la disrupción inicial de la función del tejido y la degeneración posterior, que conducen a defectos funcionales secundarios, generando deficiencias que se traducen en signos clínicos del cerebro o la médula espinal.^{(29) (54) (53) (25) (42) (42)}

Aunque las neuronas lesionadas tienen la capacidad de iniciar el proceso de reparación para restaurar la integridad de su membrana^{(25) (42) (43)}, se ha demostrado que el polietilenglicol (PEG), un polímero hidrófilo, es capaz de promover la recuperación funcional facilitando la fusión de las membranas lesionadas^{(53) (42) (43) (41) (9) (40)}.

Aunque el efecto fusógeno del PEG no está del todo aclarado, la capacidad de deshidratación que posee parece jugar un papel importante en la mediación de estos eventos. En primer lugar, podría ser responsable de la agrupación de partículas intramembrana,^{(22) (24)} por deshidratación de los lípidos, afectado su fluidez. También se postula que el PEG puede simplemente ligar proteínas próximas. En segundo lugar, la deshidratación de las membranas lipídicas las obliga a acercarse entre sí, de manera que es posible que se produzca una transferencia de lípidos que favorecería la aposición de las membranas.

Sin embargo, se desconoce si el PEG puede sellar completamente las brechas de membrana; se ha observado que partículas muy pequeñas pueden atravesar membranas dañadas a pesar de la presencia de PEG⁽⁵²⁾

El uso de fusógenos celulares, estudiados primariamente en relación a la fusión de linfocitos B con células de mieloma para la producción de anticuerpos monoclonales^{(17) (23)} y luego como protectores mitocondriales neuronales⁽²³⁾, ha demostrado tener una particular capacidad protectora sobre las membranas celulares lesionadas sellándolas y evitando la producción y liberación de radicales libres.

Los modelos animales “*in vivo*” proveen la oportunidad de realizar estudios repetibles sobre los mecanismos involucrados en la patogenia subsecuente al TMA, al mismo tiempo que brindan la posibilidad de probar los resultados de diferentes estrategias terapéuticas^{(16) (10) (21) (48)}. De acuerdo a la clasificación propuesta por la American Spinal Injury Association⁽⁴⁾, se obtendrá un Lesión Completa de la Médula Espinal, mecánica o funcional, cuando no se registre ninguna respuesta sensitiva o motora distal al punto de la lesión⁽²⁾. En nuestros días, los modelos de respuesta a la lesión de la médula espinal (LME)^{(10) (28) (45)} se han vuelto fundamentales en estos campos y se han mejorado lo suficiente como para mostrar una

repetitividad aceptable en lo que hace a la conducta y a las lesiones anatómicas y patológicas⁽²⁾. Varios de estos modelos incluyen la lesión traumática de la médula post laminectomía⁽⁴⁷⁾, con diferentes procedimientos que incluyen la compresión con balones insuflados con distintos volúmenes de solución salina⁽⁵⁰⁾, el uso de clips de compresión⁽²⁾, o la descarga de un peso determinado, sea manualmente^{(49) (34)} o en forma computarizada^{(47) (14)}. El proceso de laminectomía es utilizado en casi todas las prácticas que impliquen un abordaje directo a la médula espinal^{(11) (19) (30) (36)} tanto con fines experimentales, descompresivos, clínicos o exploratorios.

El propósito del presente estudio es caracterizar el efecto neuroprotector “*in vivo*” del PEG sobre la médula espinal traumatizada en la rata, comparando los resultados obtenidos con animales control no tratados y con animales tratados con propilenglicol, otro polialcohol que teniendo un punto de ebullición, peso molecular y densidad similar al polietilenglicol no ha sido comunicado como fusógeno celular en la bibliografía el cual fue utilizado como control de irrigación. Este trabajo es preliminar y fundamental para poder continuar con estudios en los cuales la aplicación tópica sea reemplazada por la aplicación sistémica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento quirúrgico y pos quirúrgico

Se trabajó sobre 70 ratas Sprague-Dawley® machos con un peso medio de 270 g (variando entre 200 y 300 gramos) con una edad aproximada de 11 semanas⁽²⁰⁾. Se anestesiaron con Ketamina y Xylazina (100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente) vía intraperitoneal⁽¹⁾. Se utilizó un marco esterotáxico para realizar la laminectomía, de acuerdo a las especificaciones ya publicadas^{(6) (8) (45) (31)}. Luego de anestesiados, y una vez realizada la tricotomía y antisepsia de la zona, los animales se posicionaron sobre una plataforma de acero que permitió fijarlos temporariamente mediante el uso de cinta adhesiva (fig. 1). Se realizó una laminectomía sobre las vértebras T₉ – T₁₀ exponiendo la médula espinal dentro de la envoltura dural^{(8) (33) (34) (35)}. Para evitar movimientos en la parte expuesta se colocaron 2 soportes rígidos regulables utilizando dos pinzas Halsted, que permitieron fijar un segmento de la columna (fig. 2). De acuerdo al diseño experimental los animales fueron aleatoriamente asignados a cuatro grupos: 1- control, 2- lesionado, 3- propilenglicol y 4- PEG. Al grupo identificado como “control”, solamente se le realizó la laminectomía para exponer la duramadre, se irrigó la zona expuesta con solución de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,17 mM, MgSO₄ 1,17 mM, CaCl₂ 2,5 mM, dextrosa 11,6 mM, NaHCO₃ 25 mM)⁽³²⁾ y se procedió al cierre quirúrgico realizando dos planos de sutura, uno músculo-aponeurótico y luego la piel. A los animales que integraban el grupo denominado “lesionado” se les produjo, luego de expuesta la duramadre mediante la laminectomía, el TMA mediante el impacto de un peso de 25 g, que se dejó caer de una altura de 20 cm guiado por un cilindro de acero (figura 1). El dispositivo se dejó apoyado sobre la médula durante un tiempo 2 segundos. Luego del impacto la zona se irrigó con solución de Krebs y se procedió al cierre de la laminectomía.

Para los grupos “propilenglicol” y “PEG” se procedió de la misma manera que en el grupo lesionado, pero inmediatamente después del impacto se irrigó la zona con un volumen

aproximado de 1cm^3 de una solución estéril 50% en agua destilada de propilenglicol¹ o de polietilenglicol 400² (PEG₄₀₀), que se dejó sobre la lesión durante dos segundos, enjuagando luego con abundante solución de Krebs y retirando cualquier exceso de líquido con una pipeta limpia antes de suturar la laminectomía como se indicó en el resto de los animales. Los animales fueron alojados en cajas plásticas acondicionadas con papel, provistos de comida y agua “*ad libitum*”; de cualquier modo, para asegurar una correcta hidratación se les administró preventivamente un volumen equivalente al 5% del peso corporal de solución salina isotónica por vía subcutánea. Dada la pérdida de la función vesical los animales fueron asistidos dos veces por día para evacuar la vejiga mediante compresión manual externa. En todos los casos el dolor se controló mediante la aplicación IP de tramadol en una dosis aproximada de 4 mg/kg⁽⁷⁾ o de buprenorfina en dosis de 0,1 mg/kg SC⁽⁴⁹⁾. Al día siguiente de la cirugía los animales fueron asignados de manera aleatoria a los grupos de tiempo que serían evaluados neurológica e histológicamente, a las 12, 24 y 48 horas.

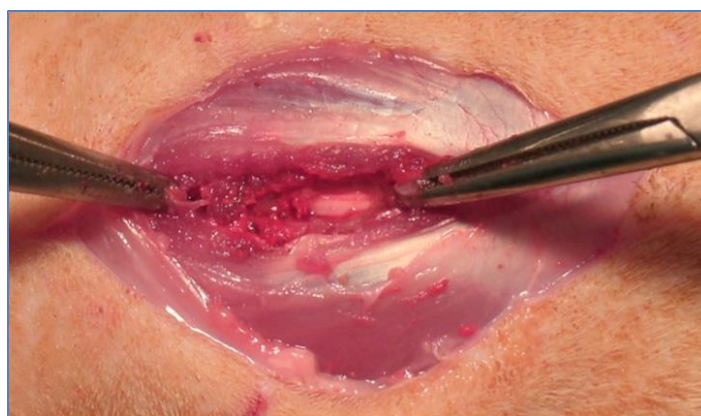


Figura 1. Vista de la laminectomía ya realizada y la duramadre espinal expuesta. Se detalla la mínima invasión realizada sobre el espacio perilesional

Experimentos conductuales y neurofuncionales

Prueba de campo abierto. El dispositivo se construyó en una caja plástica de paredes no transparentes de 40 centímetros de altura; sobre el piso se colocó una cuadrícula de tres por tres cuadrados de 15 centímetros de lado que permitió registrar la actividad motora voluntaria (cruces) y la calidad de los desplazamientos. Una escala de valoración neurológica (EVN), simplificada de la presentada por Basso⁽⁶⁾, nos permitió evaluar y calificar el grado de discapacidad motora de los animales (Tabla 1). Se realizó además un examen neurológico completo registrando especialmente las variables “sensibilidad superficial”, “sensibilidad profunda” y “motricidad de la cola”⁽²⁶⁾. Los animales se evaluaron a las 12, 24 y 48 horas luego de la cirugía. Salvo en los casos donde muestras histológicas posteriores eran requeridas (ver “extracción medular”), la eutanasia se realizó por decapitación rápida de acuerdo a las normativas vigentes⁽⁵⁾.

¹ National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=24898528, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24898528> (accessed July 6, 2015).

² CAT # 1546445 FLUKA Polyethylene glycol 400. United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard

Extracción de la médula espinal. Las muestras para analizar la lesión a nivel de la médula espinal se tomaron a las 12, 24 y 48 horas luego de realizado el TMA. La eutanasia se realizó por anestesia profunda con Ketamina y Xylazina seguida de la perfusión transcardíaca de formaldehído al 10% en solución tamponada de fosfato a pH 7. Se extrajo un segmento de médula espinal, tomando aproximadamente un centímetro por craneal y otro por caudal de la zona lesionada⁽²⁷⁾.

TABLA 1

Escala para cuantificar la discapacidad motora

| | |
|---|--|
| 0 | Sin movimientos observables en los miembros pelvianos |
| 1 | Movimientos del miembro pero sin apoyo plantar y sin soportar peso |
| 2 | Apoyo plantar evidente sin movimientos coordinados de locomoción |
| 3 | Apoyo plantar y movimientos coordinados con el miembro contralateral y con miembro torácico. Levantamientos escasos y breves |
| 4 | Movimientos locomotores normales. Levantamientos normales sin sustentación sostenida. |
| 5 | Movimientos locomotores normales. Levantamientos normales con sustentación sostenida |

Nota: Entendemos por “levantamientos” (“*rearing*”) a la elevación completa del cuerpo sobre los miembros pelvianos pudiendo estar o no los miembros torácicos apoyados contra las paredes de la caja. Se considera que existe “sustentación” cuando el animal permanece en posición vertical de manera apreciable uno o dos segundos como mínimo

Procesamiento histológico

Las piezas se fijaron en la misma solución de perfusión durante 24 – 48 horas a 4°C. Luego se procesaron para microscopia óptica mediante la inclusión en parafina y posterior corte en micrótopo de deslizamiento. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina y violeta de cresilo⁽¹³⁾. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss® de luz transmitida. El grado de respuesta tisular a la lesión fue calificado por el mismo investigador y de manera “ciega” a los tratamientos y tiempos correspondientes.

Procedimientos estadísticos

Todos los datos fueron analizados en Infostat ®⁽¹⁵⁾ utilizando, de acuerdo a la naturaleza de las variables, los correspondientes análisis de varianza (paramétrico y no paramétrico); una prueba “t”, Mann-Whitney o χ^2 . En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 5% a excepción de las pruebas de normalidad en las cuales se utilizó la prueba Wilks-Shapiro con un nivel de significación del 10%.

Todos los procedimientos realizados en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética y Cuidados de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV – UBA. (Proyecto 2015/37).

RESULTADOS

Estudios Funcionales

Prueba de Campo Abierto: El grupo “control” mostró en la prueba de campo abierto un número de cruces de $87,89 \pm 2,88$ (media \pm EEM) y levantamientos $11,61 \pm 0,68$, valores considerados normales para animales sanos de ese tamaño y edad⁽³⁾.

En el grupo “lesionado” se observó una severa deficiencia en la actividad locomotora, que se manifestó por la disminución significativa en los cruces en la prueba de campo abierto, acompañada por la desaparición de los levantamientos. La cantidad de cruces registrada en el grupo “lesionado” ($24,27 \pm 3,81$) se debió en la mayoría de los casos a movimientos circulares erráticos generados por movimientos de “remo” con los miembros torácicos, desplazándose los animales en la posición clínicamente denominada “de foca”.

El grupo “propilenglicol” no mostró diferencias significativas con el grupo “lesionado”.

El grupo “PEG” presentó una pérdida menor de la motricidad y una mejora subjetiva, que se hizo significativa en el grupo que se evaluó a las 48 horas ($p < 0,05$). En este grupo los cruces presentaron una media de $56,43 \pm 2,62$ lo que representa un 63% del valor promedio registrado en los controles ($88,29 \pm 4,90$) (Gráfico 1).

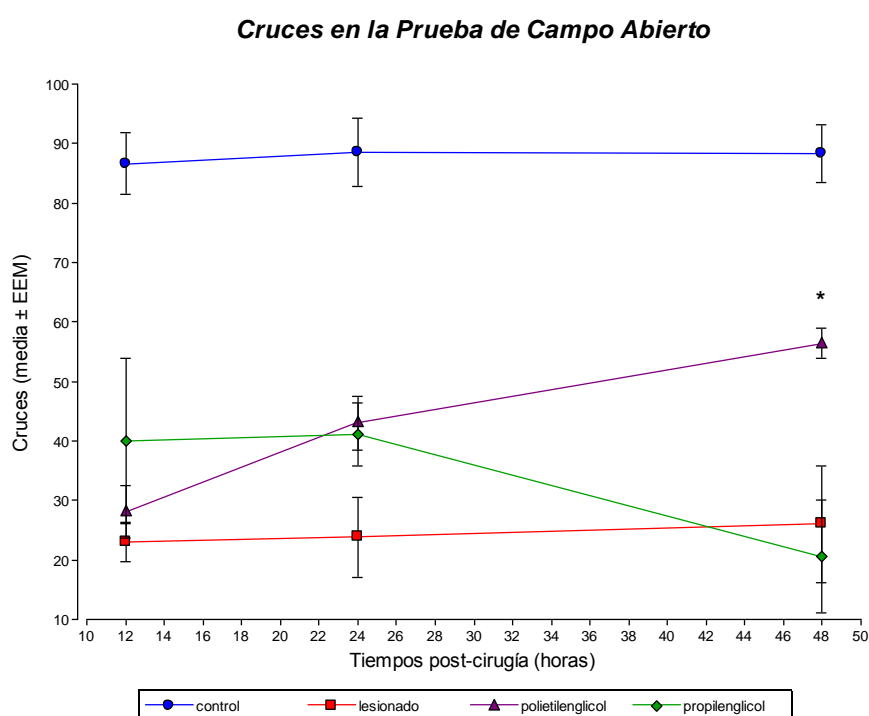


Gráfico 1. Se muestran los resultados en la prueba de campo abierto. Las diferencias entre el grupo control y los otros grupos lesionados resultaron significativas en todos los tiempos estudiados en la prueba de ADEVA ($F_{3,49} = 75,18$, $p < 0,0001$). Entre los animales tratados, el grupo que recibió el tratamiento con PEG400 mostró un mayor número de cruces que los otros dos grupos tratados en el día 48 (*) de manera significativa ($F_{1,49} = 20,49$, $p < 0,0001$). Los levantamientos estaban completamente ausentes en todos los grupos a las 12 horas post lesión. A las 48 horas, en el grupo tratado con PEG, los valores se presentaron con una frecuencia promedio de $4,00 \pm$

0,95, representando este valor un 39% del valor medio registrado en los controles ($10,14 \pm 0,51$) sin lesionar.

Valoración Neurológica: (tabla 2) Al valorar el grado de compromiso funcional aplicando la EVN, el grupo “control” no mostró diferencias con los valores obtenidos aplicando la escala a animales sanos. En cambio, el grupo “lesionado” mostró una caída significativa en el puntaje obtenido. En los tres grupos lesionados (lesionados, PEG y propilenglicol) desde el momento de realizada la lesión y hasta las 12 horas, la totalidad de los animales presentaban una ausencia total de motricidad en los miembros pelvianos. A la semiología neurológica, se observaba parálisis flácida de los mismos y de la cola. Los animales en los tres grupos mostraron en este período ausencia completa de sensibilidad superficial y en casi todos los casos (salvo tres animales, uno del grupo lesionado y dos del grupo tratado con propilenglicol), de la sensibilidad profunda. La vejiga se encontraba también con parálisis flácida haciendo necesaria su evacuación manual en todos los casos. A las 24 horas se pudo observar en los animales incluidos en todos los grupos una leve mejoría con respecto al estadio inmediato a la lesión; los individuos presentaron movimientos incoordinados sin apoyo plantar y sensibilidad profunda, sin evidenciar sensibilidad superficial. Las diferencias observadas entre los tres grupos lesionados no resultaron, en este período no resultaron significativas. A las 48 horas el grupo “PEG” mostró un aumento significativo en los resultados de la EVN, presentando apoyo plantar y en algunos casos movimientos coordinados, ubicándose por encima de los otros tratamientos con una media $2,14 \pm 0,90$. Esta diferencia resultó significativa en el correspondiente contraste realizado luego del ADEVA ($F_{1,35} = 29,97$ con $p < 0,0001$) (Gráfico 2). En el mismo grupo pudieron observarse en tres de los individuos signos de sensibilidad superficial.

Resultados de la Escala de Valoración Neurológica

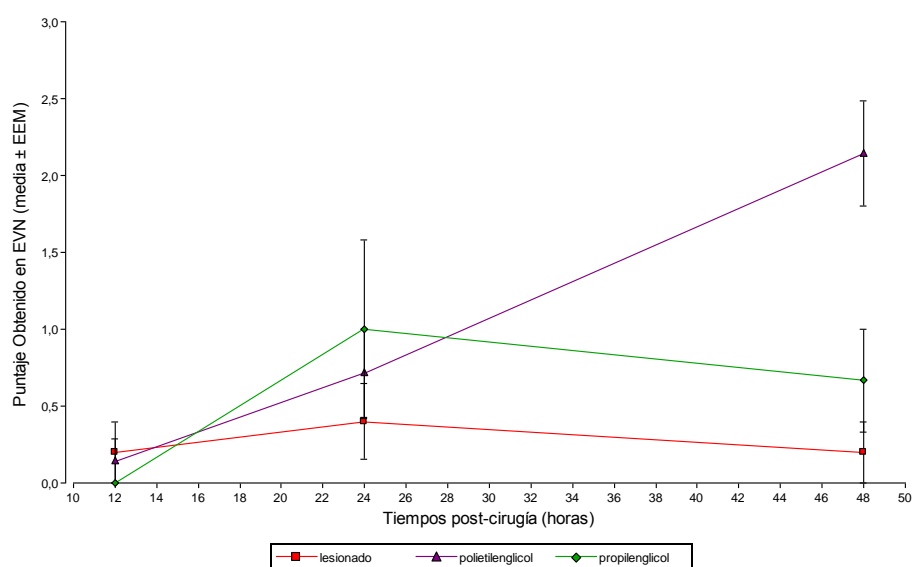


Gráfico 2. Se muestran los resultados para la prueba de valoración neurológica. Si bien se observa una mejora leve a las 24 horas en la respuesta en todos los grupos, en el único en el cual la misma se vuelve significativa a las 48 horas es en el grupo tratado con PEG400 ($F_{1,35} = 29,97$, $p < 0,0001$).

Histopatología

Como se ha comunicado previamente para el grupo “control”⁽⁸⁾, en los cortes realizados a las 24 y 48 horas posteriores a la cirugía se pudo observar una reacción infiltrativa en el espacio subdural, con neutrófilos y células mononucleares (macrófagos). Se observó también infiltración de células mononucleares en relación a la piamadre, que se encontraba desprendida. Esto se interpretó como la respuesta tisular basal propia de la laminectomía.

En el grupo “lesionado” se pudo observar la presencia de áreas con desorganización de la sustancia blanca específicamente ubicada de los cordones dorsales; la citoarquitectura de la sustancia gris de las astas dorsales se mantuvo conservada. En algunos cortes se observó la presencia de lesiones compatibles con edema vasogénico asociado a los vasos espinales dorsales relacionados al sitio de la aplicación del trauma. Si bien el área de lesión primaria quedó perfectamente definida (figura 2 A y B) no se observaron áreas con imágenes hemorrágicas o compatibles con lesión secundaria. Sin embargo, en una reducida proporción de casos ($0,27 \pm 0,11$; proporción \pm error estándar) fue posible observar la presencia de los quistes o vesículas en la mielina que envuelve a los axones del cordón dorsal (Figura 3 A) que caracterizan la fase secundaria o tardía de la lesión medular en la rata. Los cambios mencionados, salvo las lesiones quísticas, se encontraron en todos los animales lesionados. En los animales del grupo “PEG” sacrificados a las 48 horas se observó una mejoría en la citoarquitectura del cordón dorsal de la médula espinal, sin evidencia de edema intersticial ni edema vasogénico, no observándose lesión clínica. En los animales del grupo “PEG” sacrificados a las 48 horas se observó una reducción del grado de respuesta tisular, sin signos de edema ni insinuaciones de lesiones quísticas (Figura 4). Estas diferencias resultaron significativas al 5% en una prueba de χ^2 , como se muestra en la tabla 3 ($\chi^2 = 11,19$; $p = 0,0245$).

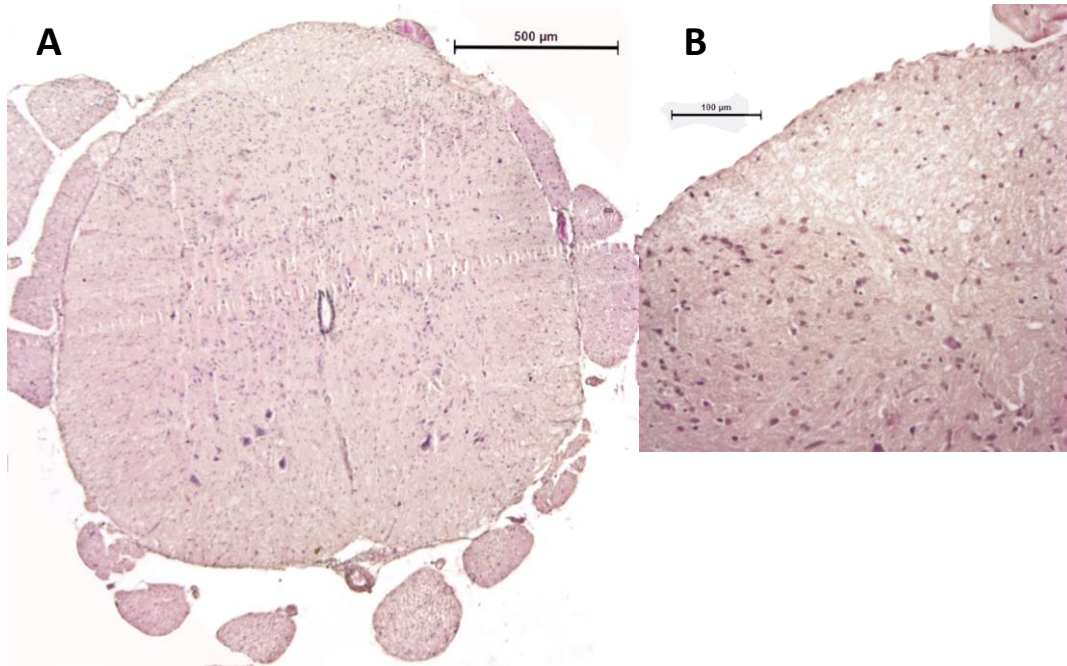


Figura 2. Fotografía de un corte transversal de médula espinal de una de las ratas lesionadas 24 horas luego de la cirugía. (4x; Hematoxilina/Eosina) A: en este caso el sujeto presentaba parálisis flácida completa de los miembros pelvianos y de la cola, ausencia completa de sensibilidad profunda y parálisis flácida de la vejiga urinaria. Flecha negra: edema y desorganización en la sustancia blanca del cordón dorsal B: preparación de una rata del grupo lesionado luego de 48 hs de realizado el TMA (20x; Hematoxilina/Eosina), obsérvese la presencia de edema intersticial y desorganización en la sustancia blanca del cordón dorsal µ

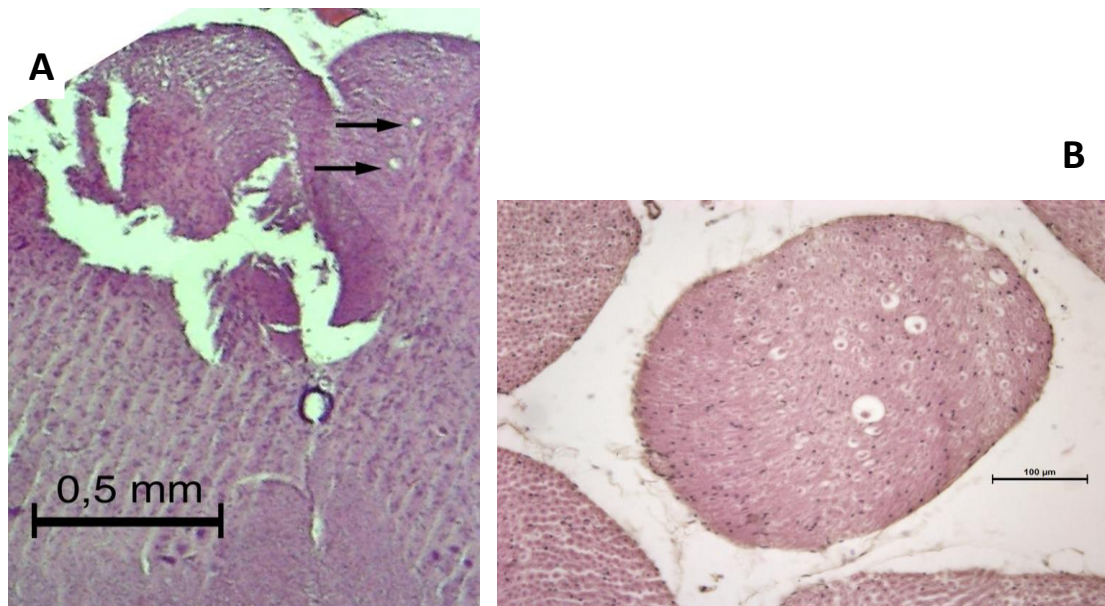


Figura 3. A: Fotografía de un corte transversal de médula espinal de una de las ratas del grupo “lesionado” 48 horas luego de la cirugía. (10x; Hematoxilina/Eosina). Se mantiene la reacción en la sustancia blanca; se puede apreciar la aparición de las “vesículas” que habitualmente se describen en las lesiones traumáticas de la médula espinal (flechas negras). B: Sección de la raíz dorsal la médula espinal (40x; Hematoxilina/Eosina) de una rata del grupo “lesionado” a las 48. Las flechas indican la presencia de fibras nerviosas con edema de mielina y lateralización del axón.

Hemos hallado la presencia de lesiones en las raíces dorsales de los nervios espinales en muchos cortes en los especímenes del grupo “lesionados”, tanto a las 24 como a las 48 hs. Las lesiones constan principalmente de edema de mielina con lateralización de la posición de axón, que afecta solamente a un grupo pequeño de fibras nerviosas, no observándose una lesión generalizada. Aunque esta lesión no fue constante en todos los especímenes si se observó frecuentemente (figura 3B).

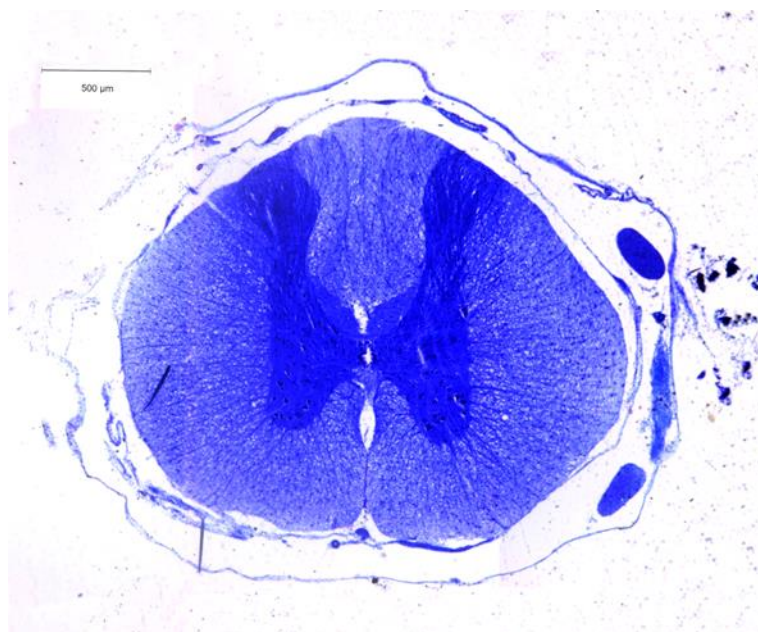


Figura 4. Fotografía de un corte transversal de médula espinal de una de las ratas del grupo “polietilenglicol” 48 horas luego de la cirugía. Si bien se observan signos leves de inflamación a nivel de las meninges en la zona lesionada, se observa una muy buena conservación de la estructura de la sustancia blanca de los cordones dorsales (4x; tinción de Nissl).

DISCUSIÓN

Si bien existen reportes previos en cobayos (*Cavia porcellus*)⁽¹⁰⁾ sobre el efecto a largo plazo del PEG₄₀₀ aplicado en lesiones espinales agudas, este trabajo es el primero que comunica y describe en ratas el efecto inmediato de la aplicación tópica a las 72 horas luego de producida la lesión.

El modelo de lesión seleccionado por impacto es el que mejor reproduce las condiciones clínicas del TMA. Además, puede realizarse de manera sencilla y repetible, requiriendo mínima disección y remoción de tejidos blandos y hueso^{(8) (46)}, contrariamente a los métodos de compresión que exigen una completa extirpación del arco vertebral de dos o tres vértebras.

Hemos observado que, a excepción de una mínima reacción inflamatoria sin signología neurológica, la laminectomía no introduce factores apreciables de confusión a la hora de evaluar los resultados⁽⁸⁾.

El cuadro clínico producido luego de la lesión traumática reprodujo resultados comparables a aquellos que se observan en pacientes veterinarios traumatizados espontáneamente de manera aguda. El cuadro de paraparesia flácida, con pérdida de reflejos (signo de neurona motora inferior) y con vejiga pletórica podría deberse al shock medular provocado por el trauma medular agudo. Se cree que este fenómeno de índole puramente neurológico⁽³⁸⁾ se produce debido a la pérdida de impulsos facilitadores descendentes hacia las neuronas motoras, lo que provoca hiperpolarización y excitabilidad transitoria reducida. Este cuadro puede confundir la localización neuroanatómica de la lesión, dando la apariencia de una lesión multifocal. La mejoría leve observada en todos los grupos lesionados a las 24 horas podría relacionarse a la desaparición del shock espinal, con la correspondiente instalación de un síndrome de neurona motora superior relacionado al sitio anatómico donde se realiza la lesión. En los seres humanos, el shock espinal puede durar semanas después de una lesión grave de la médula espinal. En perros, a menudo se resuelve en 24 horas^{(18) (39) (44)}.

Los cambios inmediatos al TMA (desprendimiento de la piamadre, pérdida de la función y desorganización estructural del cordón dorsal) se presentaron en todos los grupos, como era de esperarse de acuerdo a lo publicado previamente^{(10) (27)}. Sin embargo, los signos clínicos fueron significativamente revertidos en los animales del grupo "PEG", pero no en aquellos del grupo "propilenglicol", que se comportaron igual que los individuos del grupo "lesionado" (tabla 2). Este hecho nos permite pensar que el efecto protector de la función espinal es propio del PEG₄₀₀ y es inherente a su capacidad de sellar y reparar membranas celulares lesionadas. La función protectora del PEG₄₀₀ no solo se evidenció en la respuesta clínica neurológica de los animales lesionados sino también en los estudios histológicos realizados, disminuyendo de manera efectiva los elementos que normalmente se asocian al comienzo de la respuesta secundaria tales como el edema intersticial y vasogénico, la desorganización de la sustancia blanca (*white-matter sparing*) y la cavitación⁽²⁷⁾. Atribuimos al propio trauma aplicado sobre la zona de la lesión el hecho de los hallazgos inconstantes en la raíz dorsal. Es probable que, debido al tamaño de la punta del peso que se deja caer sobre la médula espinal se esté produciendo además un trauma sobre la emergencia de las raíces, por lo que se plantea para experimentos futuros trabajar con elementos del mismo peso, pero con una conformación diferente de la punta de la pesa.

Dadas las restricciones que en este estudio previo se realizaron sobre el tiempo de sobrevivencia de los animales lesionados, no han podido ser evaluados los resultados del efecto protector del PEG₄₀₀ a largo plazo. Este tipo de estudios es necesario, así como también el análisis de la respuesta a la aplicación sistémica del PEG₄₀₀, para poder evaluar el potencial terapéutico de este fusógeno celular.

| | 12 horas | | 24 horas | | 48 horas | |
|-----------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| Control | n = 6 | 5 ^a ± 0 | n = 7 | 4,67 ^a ± 0,21 | n = 7 | 4,71 ^a ± 0,18 |
| Lesionados | n = 6 | 0,2 ^b ± 0,2 | n = 6 | 0,4 ^b ± 0,24 | n = 4 | 0,2 ^b ± 0,2 |
| PEG | n = 7 | 0,14 ^b ± 0,14 | n = 7 | 0,71 ^b ± 0,29 | n = 7 | 2,14 ^c ± 0,34 |
| Propilenglicol | n = 2 | 0 ^b ± 0 | n = 3 | 1 ^b ± 0,58 | n = 4 | 0,6 ^b ± 0,33 |

Tabla 2. Resultados obtenidos en la EVN. Se muestran las cantidades de animales estudiados (n) y las medias con sus respectivos errores estándar. Para cada tiempo posquirúrgico las letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). En todos los casos se utilizaron pruebas para las medias confirmadas por pruebas para las medianas. Las comparaciones estadística paramétricas se realizaron bajo un esquema de medidas repetidas en el tiempo para controlar la perdida de grados de libertad.

CONCLUSIONES

La aplicación tópica del PEG₄₀₀ mostró tener capacidad de proteger a la médula espinal de los cambios patológicos postraumáticos, disminuyendo no solo la respuesta histopatológica sino también mejorando sensiblemente las condiciones clínicas neurofisiológicas de los animales de experimentación. Es necesario continuar con los estudios sobre los efectos protectores y reparadores del PEG₄₀₀ y de su inmenso potencial en el tratamiento farmacológico del TMA.

BIBLIOGRAFÍA

1. University of Pennsylvania IACUC Guideline. (2008, May). Rodent Anesthesia & Analgesia Formulary.
2. Adriani Marques, S., Ferreire Garcez, V., Del Bel, E. A., & Blanco Martinez, A. (2009). A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment. *Journal of Neuroscience Methods*, 177, 183-193.
3. Adrover, M. F., Guyot-Revol, V., Cheli, V. T., Blanco, C., Vidal, R., Alche, L., et al. (2003). Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 2(103-113).
4. American Spinal Injury Association. (2014, Julio 17). INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY. Retrieved from <http://lms3.learnspace.com/Images/Brand/120/ASIA/International%20Standards%20Worksheet.pdf>
5. American Veterinary Medical Association. (2013). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Schaumburg, IL.
6. Basso, D., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1996). Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight-Drop Device versus Transection. *Experimental Neurology*, 139, 244-256.
7. Bianchi, M., & Panerai, A. E. (2008). Anti-hyperalgesic effects of tramadol in the rat. *Brain Research*, 797, 163-166.
8. Blanco, C., Martín, E., Vidal Figueredo, R., Calaudi, P., Sánchez, G., Consejero, E., et al. (2014). Lesión Aguda Medular en la Rata. *Revista Argentina de Neurología Veterinaria*.

RESPUESTA MEDULAR POST-TRAUMÁTICA AL POLIETILENGLICOL

9. Borgens, R. B., & Blight, A. R. (1999). Functional reconnection of severed mammalian spinal cord axons with polyethylene glycol. *J. Neurotrauma*, 16.
10. Borgens, R., & Shi, R. (2000). Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *FASEB Journal*, 14.
11. Brisson, B. (2010, Sep). Intervertebral disc disease in dogs. *Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice*, 40(5), 829-858.
12. Chen, H., Quick, E., Leung, G., Hamann, K., Fu, Y., Cheng, J.-X., et al. (2009). Polyethylene Glycol protects injured neuronal mitochondria. *Pathobiology*, 76, 117-128.
13. Clark, G. (1981). *Staining Procedures* (4^o ed.). Baltimore, EEUU: Williams & Wilkins.
14. Constantini, S., & Young, W. (1994, January). The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *Journal of Neurosurgery*, 80, 97-111.
15. Di Rienzo J.A., C. F. (2012). *InfoStat*. Córdoba, Argentina.
16. Estrada-Mondaca, S., Carreón-Rodríguez, A., Parra-Cid, M., Ibarra-Ponce de León, C. V.-M., Vacanti, C., & Belkind-Gerson, J. (2007, noviembre-diciembre). Lesión de Médula Espinal y Medicina Regenerativa. *Salud Pública de México*, 49(6), 437-444.
17. Grimaldi, C., & French, D. (1995). Monoclonal Antibodies by Somatic Cell Fusion. *ILAR Journal*, 37(3), 125-132.
18. Hall, M. (1850). *Synopsis of the Diastaltic Nervous System: or The System of the Spinal Marrow, and its Reflex Arcs; as the Nervous Agent in all the Functions of Ingestion and of Egestion in the Animal Oeconomy.* (M. J., Ed.) Lomdon.
19. Harari, J., & Marks, S. (1992, Jul). Surgical treatments for intervertebral disc disease. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*, 22(4), 899-915.
20. Harlan Laboratories Inc., USA. (2008). *Hsd:Sprague Dawley (SD)* .
21. Klopstein, A., Navarro, X., & López-Vales, R. (2012). Administración de $\alpha\beta$ cristalina como nueva terapia para promover recuperación funcional en lesiones agudas de la médula espinal. *Trauma. Fundación MAPFRE*, 23(4), 235-239.
22. Knutton, S. (1979). Studies of membrane fusion. III. Fusion of erythrocytes with polyeth-ylene glycol. *J. Cell Sci.*, 36, 61-72.
23. Kohler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
24. Krähling, H. (1981). Investigations on polyethylene glycol-induced cell fusion-freeze fracture observations. *Acta Histochemica (Suppl.)*, 23, 219-223.
25. Krause T. L., F. H., L., B. M., & D., B. G. (1994). Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. *J. Neurosci.*, 14.
26. Lorenz, M. D. (2011). *Handbook of Veterinary Neurology.* (Saunders, Ed.) St. Louis, Missouri, EEUU: ELSEVIER.

27. Marques, S., Ferreira Garcez, V., Del Bel, E., & Blanco Martínez, A. (2009). A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment. *Journal of Neuroscience Methods*, 177, 183-193.
28. McDonlad, J., Liu, X., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S., Turetsky, D., et al. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine*, 5(12).
29. Meiri, H., Spira, M. E., & I, P. (1981). Membrane conductance and action potential of a regenerating axon tip. *Science*, 211, 709-716.
30. Mejía Durango, M. A., Cortés Díaz, S. A., & Gaviria Martínez, N. (2011). Laminectomía dorsal como resolución quirúrgica en estenosis lumbosacra en un canino de 1 año de edad. Reporte de un caso clínico. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(8).
31. Onifer, S., Rabchevsky, A., & Scheff, S. (2007). Rat Models of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery. *ILAR Journal*, 48(4), 385-395.
32. Peraza Campos, A. (1994). Análisis Farmacológico de la DL-4-HDROXI, 4-ETIL, 4-FENIL BUTIRAMIDA (HEPB) sobre la Contractibilidad in vitro de la Aorta Torácica en la Rata. Tesis de Maestría, Universidad de Colima. Facultad de Medicina, Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Colima, México.
33. Poon, P., Gupta, D., Shoichet, M., & Tator, C. (2007). Clip Compression Model Is Useful for Thoracic Spinal Cord Injuries. *Histologic and Functional Correlates*. 2007, 32(25), 2853–2859.
34. Rodrigues, N., Letaif, O., Cristante, A., Marcon, R., Oliveira, R., & Pessoa de Barros Filho, T. (2010). Standardization of Spinal Cord Injury in Wistar Rats. *Acta Ortopédica Brasileira*, 18(4), 182-186.
35. Roussos, I., Rodríguez, M., Villán, D., Ariza, A., Rodríguez, L., & García, J. (2005). Development of a Rat Model of Spinal Cord Injury and Cellular Transplantation. *Transplantation Proceedings*. Transplantation Proceedings, 37, 4127–4130.
36. Scott, H., & McKee, W. (1999, Sep). Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *Journal of Small Animal Practice*, 40(9), 417-422.
37. Sekhon, L., & Fehlings, M. (2001). Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *SPINE*, 26(24S), S2–S12.
38. Sherrington, C. (1897). Croonian Lecture: the mammalian spinal cord as an organ of reflex action. *Philos Trans*, 1908.
39. Sherrington, C. (1906, Sherrington CS. *The Integrative Action of the Nervous System*. Constable & Company LTD: London, 1906.). *The Integrative Action of the Nervous System*. London: Constable & Company.
40. Shi R. and Borgens R. B. (1999) Acute repair of crushed guinea pig spinal cord by polyethylene glycol. *J. Neurophysiol.* 81, 2.–2. (1999). Shi, R.; Borgens, R. B. *J. Neurophysiol.*, 81, 2406–2414.
41. Shi, R., & Borgens, R. (2000). Anatomic repair of nerve membrane in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol. *J. Neurocytol.*, 29.

RESPUESTA MEDULAR POST-TRAUMÁTICA AL POLIETILENGLICOL

42. Shi, R., & Pryor, J. D. (2000). Temperature dependence of membrane ealing following transection in mammalian spinal cord axons. *Neuroscience*, 98.
43. Shi, R., Asano, T., Vining, N. C., & Blight, A. R. (2000). Control of membrane sealing in injured mammalian spinal cord axons. *J. Neurophysiol.*, 84.
44. Smith, P. M., & Jeffery, N. D. (2005). Spinal shock –comparative aspects and clinical relevance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 788–793.
45. Talac, R., Friedman, J., Moore, J., Lu, J., Jabbari, J., Windebank, J., et al. (2004). Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*, 1505-1510.
46. Taoka, Y., & Okajima, K. (1998). Spinal Cord Injury in the Rat. *Progress in Neurobiology*, 56, 341-358.
47. Tebet, M., Pessoa Barrios Filho, T., Rocha Machado, I., Olivera Penna de Carvalho, M., Richieri Hanania, F., & Daci, K. (2003, abr/jun). Efeito da metilprednisolona na lesao medular em ratos: analise funcional e histologica. *Acta Ortopedica Brasileira*, 11(2), 80-87.
48. Vaquero, J., & Bonilla, C. O. (2008, octubre-diciembre). Efecto Neuroprotector de las células madres mesenquimales adultas en las fases iniciales de una lesión traumática de la médula espinal. *Trauma Fundación MAPFRE*, 19(4), 199-205.
49. Vaquero, J., Zurita, M., Oya, S., & Santos, M. (2006). Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neuroscience Letters*, 398, 129–134.
50. Villanova Junior, J., Locatelli-Dittrich, .., Fracaro, L., Kuniyoshi Rebelatto, C., Achcar Capriglione LG, S. B., Miara, L., et al. (2014, jun). Padronização e avaliação histológica de um modelo experimental de lesão medular. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.6, p.1066-1072., 44(6).
51. Webb, A., Ngan, S., & Fowler, D. (2010, May). Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Canadian Veterinary Journal*, 51(5), 485-492.
52. Wojcieszyn, J., Schlegel, R., Lumley-Sapanski, K., & Jacobson, K. (1983). Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J Cell Biol.*, 96(1), 151-159.
53. Xie, X., & Barrett, J. N. (1981). Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca²⁺-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. *J. Neurosci.*, 11, 3257–3267.
54. Yawo, H., & Kuno, M. (1985). Calcium dependence of membrane sealing at the cut end of the cockroach giant axon. . *J. Neurosci.*, 5, 1626–1632.