

Correlación de los hallazgos clínicos y electrofisiológicos de la lesión medular experimental en ratas



FRANCISCO ALBERTO MANNARÁ, MD
NEUROCIRUJANO

AUTORES

^{1,2}FRANCISCO ALBERTO MANNARÁ, MD;
^{1,2}ALBERTO YORIO, MD; ²HÉCTOR COIRINI, MD;
¹SILVINA FIGURELLI, MD; ²ENRIQUE SEGURA, MD.

¹Hospital de Agudos Juan A. Fernández. (CABA)

²Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET).

E-mail: fmannara@hotmail.com

Resumen

Introducción: La lesión experimental de la médula espinal de rata a nivel de la metámera sacra reproduce un modelo animal con menor morbilidad que al realizarla en niveles metaméricos más altos. Las referencias bibliográficas respecto a procedimientos que permitan cuantificar clínicamente la espasticidad de la cola de la rata debido a lesión medular a nivel sacro son escasas. No existen estudios que correlacionen el grado de espasticidad de la cola con las respuestas electrofisiológicas en un modelo experimental de lesión medular a ese nivel. El propósito de este trabajo es evaluar la espasticidad de la cola de la rata utilizando una escala clínica y validarla por medio de su correspondencia con los hallazgos electrofisiológicos.

Materiales y método: Se realizaron cirugías espinales experimentales en ratas Sprague Dawley a nivel metamérico sacro para producir un cuadro clínico de espasticidad localizada exclusivamente en la cola de la rata. En el periodo posoperatorio se evaluaron clínicamente la paresia y el tono muscular y se valoró el grado de espasticidad por medio de una escala semicuantitativa del tono muscular. Asimismo, se efectuaron estudios electromiográficos de las respuestas de la cola (ondas M y F) a la estimulación del nervio caudal y se verificó que se había producido la lesión mediante el estudio de anatomía patológica.

Recibido: Febrero 2010
Aceptado: Abril 2010

Resultados: Todos los animales con lesión medular presentaron paresia de la cola. La espasticidad comenzó a manifestarse luego de la segunda semana. De acuerdo con la escala del tono muscular utilizada, 5 ratas presentaron espasticidad grado 2, una espasticidad grado 3 y las otras 3 grado 4. La electrofisiología evidenció patrones de respuesta acordes con la evolución clínica y con el grado de espasticidad.

Discusión: Los resultados obtenidos son concordantes con otros estudios en modelos experimentales de lesión medular alta (lumbo-sacra) y coincidentes con estudios de lesión medular baja (sacra), respecto al curso clínico de los efectos de la lesión medular y la evolución crónica con distintos grados de espasticidad. El presente estudio mostró que existe una correlación directa entre el grado de espasticidad y el patrón de respuestas electrofisiológicas, indicativas del grado de excitabilidad de las motoneuronas espinales.

Conclusiones: El modelo animal de lesión experimental de la médula espinal a nivel sacro permite realizar una evaluación clínica del grado de espasticidad en forma semicuantitativa en correspondencia con la exploración electrofisiológica.

Palabras clave: espasticidad; lesión medular; escala clínica; onda F

Abstract

Introduction: The experimental spinal injury at sacral level in rats provides an animal model with low morbidity than others with lesion at higher metameric levels. The information in literature concerning clinical quantification of tail spasticity in rats due to lesion at sacral level is scarce. There are no studies correlating the degree of tail spasticity with electrophysiological responses in an experimental animal model lesioning the spinal cord at this level. The purpose of this study is to evaluate the spasticity of rat tail using a clinical scale and validate it through the correlation with electrophysiological findings.

Materials and methods: Experimental spinal cord surgeries at a metameric sacral level were performed in Sprague Dawley rats to produce spasticity circumscribed to the tail. We followed up the specimens postoperatively with clinical and electrophysiological recordings, and categorized the spasticity with a semi quantitative scale. The electrophysiological registrations (M and F waves) were taken in the tail. Finally,

the rats were sacrificed and verified the lesion with histopathology.

Results: All the animals with spinal lesion presented tail paresis after the second week. The results were the followings: five rats presented spasticity grade 2; one rat presented grade 3; and the last three, grade 4. The electrophysiology showed pattern responses correlated with the clinical evolution of spasticity.

Discussion: The present investigation showed the correlation between the degree of spasticity and the electrophysiological recordings, which indicate the grade of excitability of alpha motoneurons.

Conclusions: These models allow performing a semi quantitative evaluation of the clinical degree of spasticity and correlate it with electrophysiology.

Key words: spasticity; spinal cord injury; clinic scale; F wave

Introducción

La lesión de la médula espinal se caracteriza por presentar déficit motor, sensitivo y esfinteriano distal al nivel de la lesión. Cuando la lesión se produce de manera aguda, la parálisis evoluciona desde una fase de hipotonía muscular a otra de hipertonía, denominada "espasticidad". Las alteraciones clínicas y fisiopatológicas provocadas por el daño traumático de la médula espinal son el resultado no sólo de la lesión primaria propiamente dicha, sino también de la conjunción de factores inflamatorios, necrosis hemorrágica progresiva, destrucción neuronal, proliferación glial y trastorno vascular, conocidas como lesiones secundarias y terciarias.¹ Los modelos animales experimentales de lesión medular constituyen una herramienta útil para la investigación de los mecanismos fisiopatológicos involucrados y los posibles procedimientos terapéuticos.

En la bibliografía se encuentran escalas clínicas de los efectos de la lesión medular experimental en ratas así como también hallazgos electrofisiológicos observados en el animal lesionado; sin embargo, es infrecuente el estudio de la correlación entre los hallazgos clínicos y los electrofisiológicos.^{2,3,4}

En este trabajo se utilizó un modelo experimental de lesión medular empleando ratas Sprague Dawley a las que se les produjo una lesión a nivel del segmento medular sacro.^{2,3,4,5}

El resultado esperado es la paresia exclusivamente de la cola. Esto implica una menor morbilidad que con las lesiones medulares a nivel torácico o lumbar, pues se evita el compromiso esfinteriano y de las extremidades posteriores.^{6,7}

Para evaluar de manera semicuantitativa la espasticidad que se manifiesta en la cola debido a la lesión del segmento medular sacro, es conveniente utilizar una escala cuyo puntaje se establezca en base a parámetros de observación clínica claramente especificados. En esta investigación hemos usado la escala de espasticidad específica para la cola de la rata descrita por Bennett *et al*,² la que hemos modificado en base a observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio y estructurado en forma de tabla.

Para obtener los datos electrofisiológicos de la espasticidad se realizó el registro de las respuestas electromiográficas de la cola a la estimulación del nervio caudal y se tomó en cuenta especialmente los parámetros de la onda F, que se considera dependiente del grado de excitabilidad de las motoneuronas espinales.^{2,3,8}

Los objetivos del presente trabajo son: a) examinar los hallazgos clínicos y electrofisiológicos de los efectos de la lesión medular en ratas, y b) correlacionar los parámetros clínicos y electrofisiológicos de la espasticidad a fin de validar la escala de espasticidad utilizada.

Materiales y método

Se utilizaron en total 14 ratas macho (ratos) Sprague Dawley, de 250 a 300 g, procedentes del bioterio del

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Se las dividió en dos grupos: uno experimental, compuesta por diez ratas a las que se les produjo una lesión medular, y el otro de control, constituida por una rata a la que se le efectuó una lesión simulada y otras tres ratas más a las que no se les sometió a ningún procedimiento quirúrgico.

Procedimiento clínico

Se utilizó una escala de cinco grados de tono muscular para evaluar la espasticidad en la cola de la rata, cada uno de los cuales se define en base a signos clínicos observables (Tabla 1). Se realizaron evaluaciones clínicas diarias.

Procedimientos quirúrgicos (Fotos 1 y 2)

Se utilizó anestesia profunda con una mezcla de ketamina (80 mg/Kg IP, intraperitoneal) y xilazina (10 mg/Kg IP). El control de la hemostasia se realizó con Gelfoam®. Se mantuvo la temperatura corporal a 37 °C. Se realizaron dos tipos de intervenciones quirúrgicas, a saber:

1. Lesión de la médula espinal: Utilizando un microscopio quirúrgico se efectuó la transección de la médula espinal a nivel de las láminas L1-L2 con un escisor para iridectomía. Se eligió dicho nivel porque justo está sobre el segmento medular correspondiente a la metámera S1, que a su vez corresponde a los miotomos de la cola de la rata. Se puso énfasis en el cuidado para evitar alguna lesión de las arterias espinales y radicales con la finalidad de prevenir la degeneración medular retrógrada de origen vascular.

Tabla 1. Escala de tono muscular de la cola de la rata

GRADO	CATEGORÍA	SIGNOS CLÍNICOS
0	Cola atónica.	Flexibilidad marcada y escasa resistencia a la movilización pasiva.
1	Cola tónica normal.	Flexibilidad habitual y resistencia perceptible a la movilización pasiva.
2	Cola hipertónica sin espasmos.	Actitud rectificada esporádica y resistencia marcada a la movilización pasiva.
3	Cola hipertónica con espasmos.	Espasmos laterales transitorios (segundos de duración) espontáneos o por estimulación táctil.
4	Cola hipertónica con actitud anómala permanente.	Cambio permanente de actitud de la cola (incurvada en forma de S).

(*) Para categorizar los diferentes grados de espasticidad, los grados 2 al 4 de tono muscular aumentado se designan agregando los signos clínicos obtenidos en el examen físico a las categorías anteriores.

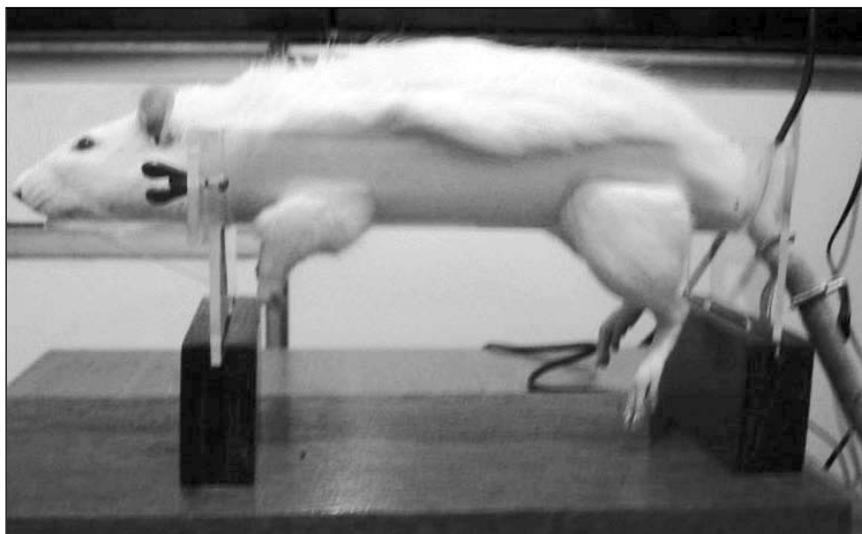


Foto 1. Preparación de la rata sobre un soporte quirúrgico. Se le han colocado los electrodos de registro caudal.

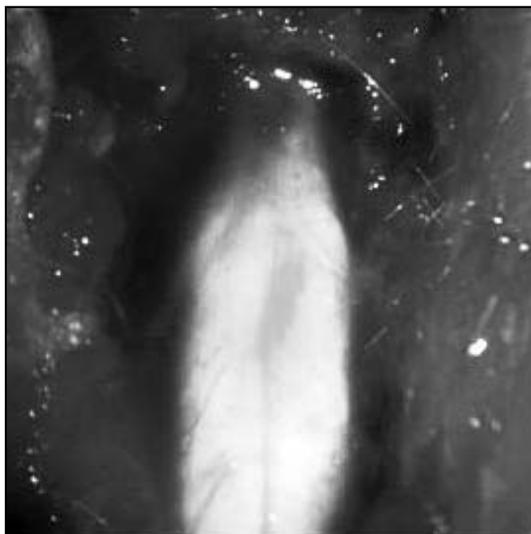


Foto 2. Fotografía microquirúrgica intraoperatoria que muestra el saco dural en el sitio de interés.

2. Operación con lesión falsa o simulada: Se efectuó sección de los tejidos blandos y laminectomía pero sin apertura de la duramadre ni lesión medular; finalmente, se suturó por planos hasta piel.

Estudios electrofisiológicos

Para el registro electrofisiológico se empleó anestesia ligera con ketamina (60 mg/Kg). Los registros electromiográficos de los potenciales compuestos de acción muscular se realizaron en el músculo de la cola mediante un electrodo coaxial; la estimulación del nervio caudal se efectuó por medio de electrodos colocados subcutáneamente. Las amplitudes de las ondas precoces y tardías se midieron en microvoltios y las latencias, en milisegundos. Los parámetros del

registro fueron: tiempo de análisis: 20 mseg; sensibilidad: 20-50 microvoltios; filtración de la señal: inferior a 300 Hertz y superior a 3000 Hz; intensidad del estímulo: 60 voltios; duración: 0,5 mseg.

Se obtuvo el registro de la onda tardía con estímulos de 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 Hz y se consideraron las variaciones de amplitud, expresadas en porcentajes, respecto a la respuesta máxima registrada. Los registros electrofisiológicos se realizaron en todos los animales, del grupo experimental y del control, durante la primera y tercera semanas posteriores a la cirugía.

Estudios histológicos

Los animales fueron sacrificados en forma incruenta en la cuarta semana posterior a la cirugía. La médula espinal fue removida y el segmento medular S1, disecado y fijado en formol al 10% durante 48 horas. Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos para determinar los grados de lesión medular en los diferentes niveles de la médula espinal, tanto proximales como distales al sitio de sección.

Resultados

Las cuatro ratas del grupo control (aquella con lesión medular simulada y las no operadas) no presentaron signos clínicos en la cola. Los datos electrofisiológicos obtenidos en estas ratas fueron los siguientes:

a) Actividad eléctrica constituida por los potenciales de acción de las unidades motoras asociadas a los movimientos activos de la cola.

b) La estimulación del nervio caudal provocó una onda temprana de configuración bifásica cuya latencia varió entre los 1,0 y 1,5 mseg, que fue designada como "onda M", y una onda tardía de amplitud y configuración variables, cuya latencia varió entre los 8 y 15 mseg, denominada "onda F" (Foto 3).

En los animales del grupo control la onda F varió de amplitud y configuración con estímulos repetidos a 0,25, 0,5 y 1 Hz y disminuyó significativamente de amplitud o desapareció con estímulos repetidos a 2, 4 y 8 Hz, en proporción directa a la frecuencia de estimulación.

Las 10 ratas operadas (100%) presentaron hipotonía y parálisis total de la cola inmediatamente distal a la lesión medular (Foto 4). La duración de la fase aguda o de hipotonía fue variable, entre 1 y 4 días después de la lesión. Además, en 3 ratas se observó una leve paresia en alguna de las extremidades posteriores.

Tomando como base la respuesta comportamental ante la estimulación táctil, se pudo constatar que las 10 ratas presentaron anestesia del segmento caudal de la cola y una rata, sensibilidad conservada en la mitad de la misma. Ninguna de las ratas operadas presentó compromiso esfinteriano.

Una de las ratas operadas falleció a los 5 días de la cirugía, sin recuperar el tono muscular de la cola. La hipertonía muscular de la cola (durante la fase crónica o de espasticidad) se manifestó en 2 ratas lesionadas a partir del día 11 posoperatorio y en las otras 7 restantes, después de la segunda semana. De acuerdo con la escala de espasticidad utilizada, 5 ratas (55%) presentaron espasticidad grado 2, una (11%) grado 3 y las otras 3 (33%) espasticidad grado 4.

Las exploraciones electrofisiológicas realizadas durante la fase aguda de la lesión medular permitieron observar que las respuestas electromiográficas de la cola a la estimulación del nervio caudal fueron variables. La onda M se observó en todos los casos, aunque con cambios en la amplitud y la configuración. La onda F se observó sólo en algunos casos, en los cuales tendía a desaparecer ante estímulos reiterados.

Los registros electrofisiológicos realizados en la fase crónica mostraron que los parámetros de la onda M fueron constantes. La amplitud y configuración de la onda F, aunque variables ante estímulos reiterados, lo fueron en menor grado que en los animales controles. A diferencia de lo observado en los animales del grupo control, los cambios en la frecuencia

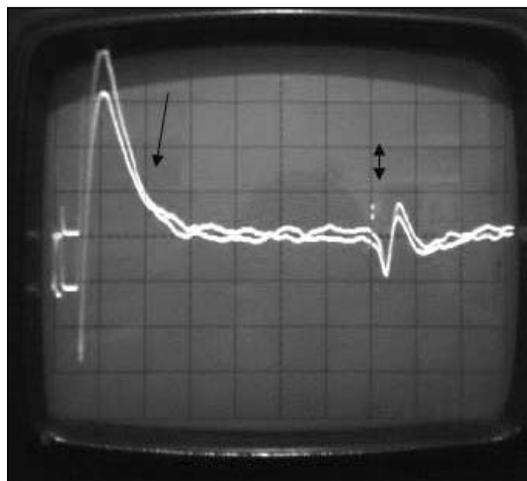


Foto 3. Se observa la onda temprana M (señalada con la flecha única) y la onda tardía F (doble flecha) en un espécimen con espasticidad caudal.

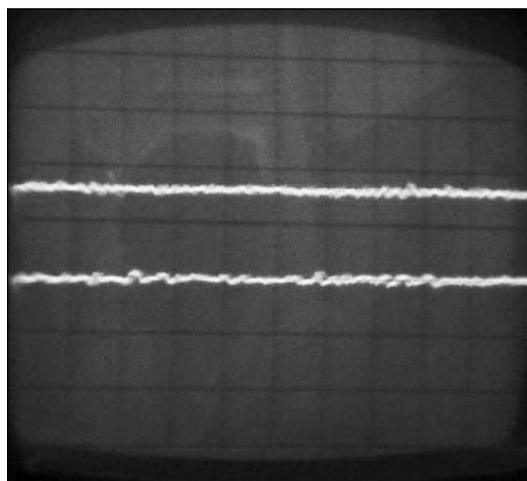


Foto 4. Registro electromiográfico en una rata con choque medular en el que se observa ausencia de respuesta.

de estimulación produjeron menor variación en la amplitud y conformación de la onda F. En las ratas con mayor grado de espasticidad (grados 3 y 4) las ondas F se observaron con escasa diferencia de amplitud en la mayoría de las series de estimulación a 2, 4 y 8 Hz.

La histología permitió corroborar la existencia de lesión medular completa en todas las ratas en las que se les practicó la lesión experimental. La anatomía patológica demostró sección medular a nivel de S1 y varias anomalías histológicas en los segmentos adyacentes a la zona lesionada: degeneración neuronal (vacuolización del neuropilo), astrogliosis. Además, los estudios inmunohistoquímicos evidenciaron un aumento marcado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), relacionada con la gliosis secundaria a la lesión.

Discusión

Nuestros resultados permiten demostrar que la lesión medular experimental en ratas se asocia a cambios clínicos y electrofisiológicos distintos según el tiempo transcurrido desde la lesión.

En las primeras dos semanas posteriores a la lesión existe un cuadro de parálisis flácida, atonía y arreflexia de la cola, que está asociado a una disminución de las respuestas electromiográficas respecto a los controles. Luego de la segunda semana se pueden observar signos clínicos de espasticidad en la cola y, asimismo, cambios en las respuestas electromiográficas.

El cuadro clínico temprano podría corresponder a la denominada "fase de choque medular", caracterizada por un marcado defecto de la respuesta neuromuscular de los segmentos corporales ubicados distalmente al nivel de la lesión medular; el cuadro clínico tardío correspondería a la fase de espasticidad.

En nuestro trabajo, la mayoría de los animales con lesión medular comenzó a manifestar signos clínicos y electromiográficos de espasticidad luego de la segunda semana de la lesión.

Estos resultados son coincidentes con lo reportado por otros autores, que describen parálisis muscular e hipotonía de la cola en el período temprano posterior a la lesión medular, asociadas a la ausencia o variabilidad de las respuestas electromiográficas, e hipertonía de la cola en relación a salvas de actividad electromiográfica a los 3 meses de realizada la lesión.^{2,4,5}

Según otros estudios, las diferencias en la duración de la fase de parálisis flácida y el momento de presentación de la espasticidad podrían estar en relación al tipo de lesión (isquémica o traumática).^{9,10}

Desde el punto de vista fisiopatológico, ambas fases clínicas son el resultado de alteraciones del balance entre los mecanismos inhibitorios y los excitatorios que normalmente actúan sobre las motoneuronas.

En la fase aguda existe un evidente defecto de los mecanismos excitatorios, que se manifiesta como una disminución de la actividad de las motoneuronas ubicadas en el segmento medular distal a la lesión. En la fase crónica, la recuperación de los mecanismos excitatorios se expresa mediante la reaparición de la reactividad neuromuscular.

No obstante, la lesión medular interrumpe las influencias inhibitorias que provienen del tronco cerebral y se proyectan a través de los fascículos laterales de la médula espinal.

Los aminoácidos monoaminérgicos no llegan a ejercer su influencia moduladora sobre las interneuronas y motoneuronas espinales.

En estas condiciones, la desinhibición medular resulta en un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas, que se presenta como un incremento de la descarga de los potenciales de acción sobre los músculos.

Nuestros resultados también concuerdan con los de otros investigadores respecto a la posibilidad de evaluar en un modelo animal de lesión medular a nivel sacro el grado de hipertonía muscular de la cola de la rata en forma semicuantitativa por medio de una escala de espasticidad.^{2,4}

En la bibliografía también se menciona que hay diferencias en la onda electromiográfica tardía de los animales con lesión medular respecto a los controles; esto se atribuye a un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas, resultante de la sección de las vías descendentes en la médula espinal.^{2,3,11,12}

A diferencia de tales trabajos, que estudian la onda electromiográfica tardía en otros segmentos corporales (por ejemplo la pata trasera) en modelos de lesión medular en niveles más altos,^{6,11,13,14,15,16} nuestros resultados muestran que en un modelo de lesión medular sacra el objeto de estudio clínico y electrofisiológico para evaluar la espasticidad podría ser la cola del animal.

Conclusiones

El modelo animal de lesión experimental de la médula espinal a nivel sacro permite realizar una valoración clínica y electrofisiológica del grado de espasticidad con eficacia y facilidad, sin afrontar las dificultades de los modelos experimentales en los que la lesión medular se produce en niveles más altos.

Los resultados del presente trabajo evidencian una clara correlación entre el grado de espasticidad, valorada mediante la evaluación clínica, y el tipo de patrón de las respuestas electrofisiológicas, lo cual permite otorgar validez a la escala semicuantitativa utilizada.

Referencias

01. Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008 Feb;209(2):368-77.
02. Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, Harvey PJ, Gorassini MA. Spastic long-lasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol*. 2004 May;91(5):2247-58.
03. Yorio A, Mannara F, Pennisi P, Figurelli S, Segura E. Changes in the F-wave of sacral segments by spinal cord injury in rats: clinical, histological and biochemical correlates. *Clinical Neurophysiology*. 2008;119:5172.
04. Li Y, Harvey PJ, Li X, Bennett DJ. Spastic long-lasting reflexes of the chronic spinal rat studied in vitro. *J Neurophysiol*. 2004 May;91(5):2236-46.
05. Harris RL, Putman CT, Rank M, Sanelli L, Bennett DJ. Spastic tail muscles recover from myofiber atrophy and myosin heavy chain transformations in chronic spinal rats. *J Neurophysiol*. 2007 Feb;97(2):1040-51.
06. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006 May;23(5):635-59.
07. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *Anat Rec*. 1977 May;188(1):45-7.
08. Mannará F, Figurelli S, Pennisi P, Segura E, Yorio A. Lesión experimental de la médula espinal sacra en la rata y correlato clínicoelectrofisiológico. En: Libro de Ponencias: LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata; 19-22 de noviembre 2008. *Medicina* 2008;68 Supl II:146.
09. Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, et al. Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: a qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience*. 2006 Sep 1;141(3):1569-83.
10. Joynes RL, Janjua K, Grau JW. Instrumental learning within the spinal cord: VI. The NMDA receptor antagonist, AP5, disrupts the acquisition and maintenance of an acquired flexion response. *Behav Brain Res*. 2004 Oct 5;154(2):431-8.
11. Carp JS, Tennissen AM, Chen XY, Wolpaw JR. H-reflex operant conditioning in mice. *J Neurophysiol*. 2006 Oct;96(4):1718-27.
12. Lee BH, Lee KH, Kim UJ, Yoon DH, Sohn JH, Choi SS, et al. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain. *Brain Res*. 2004 Sep 10;1020(1-2):37-44.
13. Kim Y, Aoki T, Ito H. Evaluation of parameters of serially monitored F-wave in acute cervical spinal cord injury. *J Nippon Med Sch*. 2007 Apr;74(2):106-13.
14. Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O, Goulding M. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):215-9.
15. Chen Y, Chen XY, Jakeman LB, Chen L, Stokes BT, Wolpaw JR. Operant conditioning of H-reflex can correct a locomotor abnormality after spinal cord injury in rats. *J Neurosci*. 2006 Nov 29;26(48):12537-43.
16. Carp JS, Tennissen AM, Chen XY, Wolpaw JR. Diurnal H-reflex variation in mice. *Exp Brain Res*. 2006 Jan;168(4):517-28.