

# Estudio de la apoptosis oligodendroglial tras un traumatismo de la médula espinal y su modificación mediante la administración de metilprednisolona

## *Study of the oligodendroglial apoptosis after spinal cord injury and its modification by means of methylprednisolone administration*

Unidad de Investigación en Neurociencias  
Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro  
Madrid

Vaquero J.  
Zurita M.  
Oya S.

### RESUMEN

Teniendo en cuenta una posible relación entre desmielinización postraumática y apoptosis oligodendroglial, se ha estudiado el número de oligodendrocitos en apoptosis tras una lesión traumática de la médula espinal y su modificación tras la administración de metilprednisolona.

Ratas Wistar adultas fueron sometidas a una lesión traumática medular, causante de paraplejía. Las células en apoptosis fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal Mab F7-26 (apostain) a las 1, 4, 8, 24 y 72 horas y una semana después del traumatismo. El marcaje específico de células oligodendrogliales se hizo con el anticuerpo monoclonal anti-oligodendrocito MAB 1580.

La expresión de Apostain aumentó en el curso de las primeras ocho horas tras la lesión, afectando tanto a neuronas como a células gliales, disminuyendo posteriormente. Los animales tratados con metilprednisolona, a la dosis de 30 mg/kg, por vía intraperitoneal a los diez minutos de la lesión, mostraron una reducción en el número de oligodendrocitos marcados a partir de las 24 horas tras el trauma ( $p < 0,05$ ). Estudios de microscopía electrónica mostraron menor desmielinización en los animales tratados con metilprednisolona, coincidiendo con una disminución en el número de oligodendrocitos en apoptosis.

Estos hallazgos sugieren una relación entre fenómenos de desmielinización postraumática e inducción de apoptosis oligodendroglial. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la administración precoz de esteroides reduce la apoptosis oligodendroglial y de forma secundaria, los fenómenos de desmielinización axonal en la médula espinal traumatizada.

**Palabras clave:** Metilprednisolona, médula espinal, apoptosis, apostain, Mab F7-26.

Vaquero J, Zurita M, Oya S  
Estudio de la apoptosis oligodendroglial tras un traumatismo de la médula espinal y su modificación mediante la administración de metilprednisolona  
*Mapfre Medicina*, 2004; 15: 91-100

### Correspondencia:

J. Vaquero  
Servicio de Neurocirugía  
Hospital Universitario Puerta de Hierro  
San Martín de Porres, 4  
28035 Madrid

### ABSTRACT

Keeping in mind a possible relation between postraumatic demyelination and oligodendroglial apoptosis, the objective of this work is to study the number of apoptotic oligodendrocytes after spinal cord injury and its possible modification after methylprednisolone administration.

Adult Wistar rats were subjected to spinal cord injury, causing a paraplegia. On the damaged spinal cord tissue, the cells in apoptosis were identified using the monoclonal Mab F7-26 (apostain) at 1, 4, 8, 24 and 72 hours and a week after the trauma. The specific identification of oligodendroglial cells was carried out by means of the monoclonal anti-oligodendrocyte antibody MAB 1580.

The expression of Apostain increased in the course of the first eight hours after trauma, affecting to neurons and glial cells, and decreased in the course of the following hours and days. The animals treated with methylprednisolone (30 mg/kg, intraperitoneally, ten minutes after trauma) showed a reduction of the number of apoptotic oligodendrocytes, following the time point of 24 hours after trauma ( $p < 0,05$ ). Electron microscopy showed a reduction of the demyelination images in the group of animals treated with methylprednisolone, associated to a decrease in the number of apoptotic oligodendrocytes.

These findings suggest a causal relationship between demyelination and oligodendroglial apoptosis after spinal cord injury. On the other hand, our results support the effectiveness of the early administration of steroids after spinal cord injury, decreasing the oligodendroglial apoptosis and, in a secondary way, the axonal demyelination.

**Key words:** Methylprednisolone, spinal cord, apoptosis, apostain, Mab F7-26.

Vaquero J, Zurita M, Oya S  
Study of the oligodendroglial apoptosis after spinal cord injury and its modification by means of methylprednisolone administration  
*Mapfre Medicina*, 2004; 15: 91-100

### Fecha de recepción: 20 de noviembre de 2001

*Este estudio ha sido realizado por medio de una Ayuda de Investigación de la Fundación MAPFRE Medicina 2001.*

## INTRODUCCIÓN

---

En 1972 Kerr y cols. (1) denominan «apoptosis» a un proceso fisiológico de muerte celular diferente de la necrosis y que, desde el punto de vista morfológico, se caracteriza por una disminución del tamaño celular, formación de condensaciones nucleares y fragmentación de la cromatina por activación de endonucleasas (1-3). En la actualidad sabemos que la apoptosis puede ser inducida por múltiples factores como son hipoxia, isquemia, óxido nítrico, aminoácidos excitatorios o presencia de radicales libres (4-7) y se puede desencadenar en asociación con la necrosis en los tejidos dañados, como ocurre, por ejemplo, en el cerebro o en la médula espinal adulta después de un traumatismo (8-10).

Por otra parte, es bien conocido que tras un traumatismo medular severo se desencadenan una serie de alteraciones histopatológicas así como una cascada de mecanismos bioquímicos y metabólicos que afectan radialmente a la sustancia gris y a la sustancia blanca de la médula espinal y que frecuentemente son los responsables de los daños irreversibles que acompañan a la lesión inicial (11-13). Estas alteraciones tisulares incluyen, entre otros, cambios en la permeabilidad vascular, edema, necrosis celular y apoptosis (14-21), además de cambios bioquímicos como son liberación de iones calcio, de ácido láctico, generación de radicales libres, liberación de aminoácidos excitatorios, etc. (22-26) que pueden resultar en un importante déficit neurológico.

La implicación de la apoptosis en los traumatismos medulares fue demostrada por Crowe y cols. en 1995 (27) siendo la causante, al menos en parte, de la degeneración tisular en el sitio de lesión y de una desmielinización posttraumática. Hasta la fecha existen numerosos estudios en la literatura, tanto clínicos como experimentales, que ponen de manifiesto el papel que desempeña la apoptosis tras un traumatismo medular severo (27-33), aceptándose su implicación en la patogénesis de los daños secundarios posttraumáticos hasta el punto de haberse planteado la posibilidad de desarrollar terapias antiapoptóticas que pudieran disminuir la magnitud de estos daños (29, 31, 34, 35).

La metilprednisolona es un glucocorticoide con vida media plasmática entre 12 y 36 horas, y se considera capaz de producir un efecto beneficioso sobre el daño neurológico que se desencadena después de un traumatismo medular severo (36-39). Sin embargo, en la literatura no existe un claro acuerdo acerca de su verdadero efecto neu-

roprotector y su posible mecanismo de actuación sobre el sistema nervioso central.

En los últimos años se han desarrollado algunos estudios que aportan evidencias indirectas, en modelos de isquemia, del papel protector que podría estar desempeñando la metilprednisolona sobre el mecanismo de apoptosis (40), aunque no existen estudios en la literatura que vayan dirigidos a esclarecer el posible papel regulador que podría estar desempeñando la metilprednisolona sobre la apoptosis que se desencadena tras un traumatismo medular por contusión.

En el presente trabajo nos hemos planteado, en primer lugar, un estudio sobre el desarrollo de la apoptosis postraumática utilizando un nuevo procedimiento inmunohistoquímico en secciones en parafina para la detección de células apoptóticas en estadios tempranos, usando el anticuerpo monoclonal anti-ssDNA Mab F7-26 (apostain), capaz de detectar células apoptóticas sin que exista fragmentación internucleosomal (41-44).

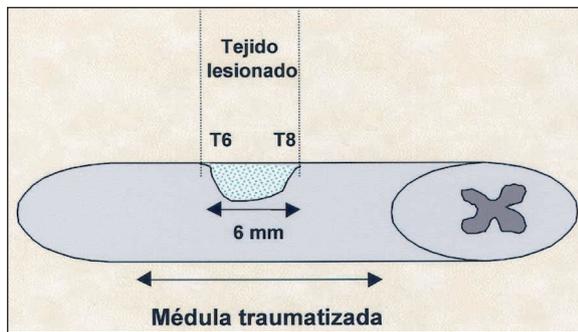
Por otra parte, teniendo en cuenta que algunos estudios cooperativos americanos sobre la lesión traumática medular adjudican un importante papel neuroprotector después de un trauma medular a la metilprednisolona (36-39), parece lógico estudiar el papel que puede desempeñar la administración de este esteroide sobre los fenómenos de apoptosis y de desmielinización, los cuales pueden incluirse entre las lesiones de daño medular secundario. Para ello, nos planteamos estudiar fundamentalmente la apoptosis oligodendroglial en las fases precoces de un traumatismo medular severo y su posible modificación por efecto de la administración precoz de metilprednisolona.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### Modelo experimental

Se ha utilizado un total de 96 ratas Wistar adultas entre 250 y 300 g de peso. Todos los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de diazepam (6 mg/kg) y ketamina (60 mg/kg). Posteriormente, todos los animales fueron sometidos a una laminectomía a nivel T6-T8 para exponer la duramadre. La lesión fue causada mediante el impacto sobre la zona medular expuesta de una barra de acero que posee una superficie en su extremo, de 12 mm<sup>2</sup> (Figura 1). El peso total de la barra era de 25 g y se dejó caer verticalmente sobre la superficie de la médula espinal desde una altura de 10 cm y guiada a través



**Figura 1.** Esquema que muestra la zona de lesión medular estudiada.

de un cilindro hueco adaptado al área de la laminectomía. La musculatura paraespinal y los tejidos subcutáneos fueron cerrados mediante suturas reabsorbibles (Surgilene, 3/0). Inmediatamente en todos los animales se observó una paraplejía total que permaneció invariable a lo largo de todo el estudio. Para conseguir en el postoperatorio un efecto analgésico a los animales se les administró subcutáneamente buprenorfina (0,02 mg/250 g de peso corporal).

Después de la cirugía, los animales fueron divididos al azar en dos grupos experimentales. El grupo control (48 animales) no recibió metilprednisolona y los animales del grupo tratado (48 animales) recibieron a los diez minutos de la lesión una dosis de 30 mg/kg de metilprednisolona por vía intraperitoneal. Las dosis de metilprednisolona utilizada en este estudio fue escogida de acuerdo con Hall y cols. (45), quienes establecen una curva dosis-respuesta para la metilprednisolona, viéndose que la administración de una dosis de 30 mg/kg después de la lesión es la dosis más efectiva para prevenir la isquemia postraumática cuando se administra durante los primeros 30 minutos después de la lesión. Otros estudios en gatos confirman cómo la dosis de 30 mg/kg de metilprednisolona tras la lesión contusiva es la más eficaz para inhibir las reacciones de peroxidación lipídica, atenuar la formación de radicales libres e incrementar la actividad ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$ )-ATPasa en la médula lesionada (46). Por otra parte, el momento de administración del fármaco tras el impacto traumático se hizo de acuerdo con los estudios previos de Yoon y cols. (47).

Todos los animales lesionados fueron sacrificados mediante anestesia intraperitoneal en grupos de 16 ratas en cada tiempo de estudio (ocho ratas del grupo control y ocho ratas del grupo metilprednisolona) a 1, 4, 8, 24 y 72 horas y una semana después del traumatismo medular. Las

ocho ratas correspondientes a cada grupo y tiempo de estudio fueron distribuidas al azar para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos o para los estudios de microscopía electrónica.

### Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

En todos los casos, se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido en los diferentes tiempos tras la lesión. Se identificaron las células en proceso de apoptosis mediante el marcaje con apostain (anticuerpo monoclonal anti-ssDNA, F7-26, Apostain 1:100, Alexis Biochemicals Corporation, USA). Además, se usaron controles negativos de inmunotinción utilizando suero normal de conejo como anticuerpo primario en el procedimiento habitual de tinción inmunohistoquímica. Algunos cortes se sometieron a doble tinción, usando el anticuerpo monoclonal anti-oligodendrocito MAB 1580 (1:200, Chemicon International, Inc., USA) para marcaje específico de oligodendrocitos.

### Recuento celular y estudio estadístico

Veinte cortes (separados entre sí aproximadamente entre 1 y 2 mm) correspondientes a la zona de lesión fueron seleccionados al azar de cada animal y el número de células apostain-positivas fue recogida de acuerdo con el número de núcleos inmunoteñidos en cada corte histológico. Este recuento fue realizado mediante un análisis por morfometría de imagen (Optimas, 6.2, Optimas Corporation, Bothell, WA, USA) usando una aplicación macro y fue hecho por dos investigadores entrenados en determinaciones del morfométricas, sin el conocimiento del grupo experimental del que cada muestra había sido obtenida. En general hubo un grado alto de acuerdo entre los observadores pero, en todo caso, la media de los valores establecida por estos investigadores se consideró como los valores finales.

Para cada grupo experimental, y para cada tiempo de estudio, el número total de células apostain-positivas por cada corte histológico de la zona de lesión se expresaron como los valores medios más sus desviaciones estándar. Los resultados en los dos grupos experimentales y a los diferentes tiempos de estudio se compararon usando el test de la t de Student, por medio del sistema estadístico InStat (v 1.01, Software de GraphPad Inc., San Diego, CA, USA), considerando estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## Estudios de microscopía electrónica

Para los estudios ultraestructurales, las muestras de tejido de médula espinal fueron fijadas con glutaraldehído al 3% en PBS, postfijadas con tetróxido de osmio al 1% en PBS durante tres horas, deshidratadas en una serie gradual de alcoholes e incluidas en araldita. Los cortes semifinos (1 micra) se tiñeron con azul de la toluidina. Los cortes ultrafinos se tiñeron con acetato de uranilo y se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-200.

## RESULTADOS

En el modelo experimental utilizado, la lesión medular causa una paraplejía irreversible y en el estudio morfológico de la médula espinal se observan, de forma precoz, cambios celulares compatibles con necrosis y con apoptosis (21). A lo largo del período de tiempo en que se realizó el estudio, ningún animal con trauma medular mostró signos de recuperación motora o sensitiva. En nuestro material, la detección de células apostain positivas confirma que la muerte celular por apoptosis ocurre de una forma cronológica específica en la fase aguda de la lesión, afectando tanto a neuronas como a células de glía. Aunque en el presente estudio se identificaron astrocitos en apoptosis, un número considerable de las células marcadas con apostain tenían una morfología y distribución propia de las células de oligodendroglía, lo que fue confirmado mediante el doble marcaje con apostain y MAB 1580.

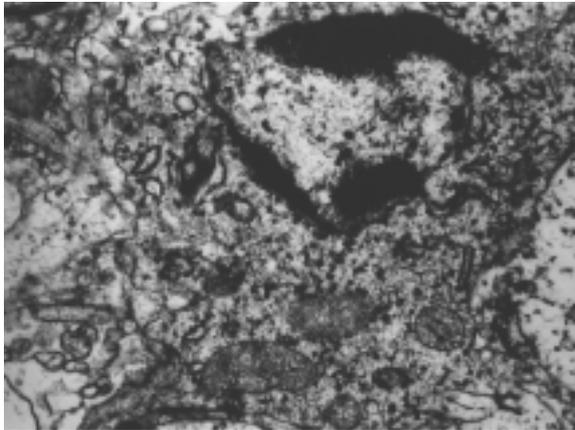
Una hora después de la lesión era evidente la existencia de un importante edema tisular en la médula espinal de todos los animales (tratados y no tratados) afectando mayoritariamente a la zona de los cordones posteriores. Por otra parte, la presencia de zonas de microhemorragias, células inflamatorias y neuronas con signos de degeneración, como son eosinofilia, pérdida de grumos de Nissl, picnosis nuclear con rechazo del núcleo a la perifería, morfología alargada (retracción y angulación del citoplasma) y vacuolas citoplasmáticas fue un hecho constante. En algunas ocasiones la ocupación masiva de la sustancia gris por parte de los hematies impidió la correcta visualización de la morfología neuronal. Los estudios inmunohistoquímicos mostraron una clara positividad al marcador apostain en neuronas pequeñas de las astas dorsales. Las neuronas motoras y neuronas intermedias mostraban escasa inmunopositividad para apostain. No todas las células

positivas para apostain mostraban cuerpos apoptóticos pues este marcador detecta estadios muy precoces de la apoptosis.

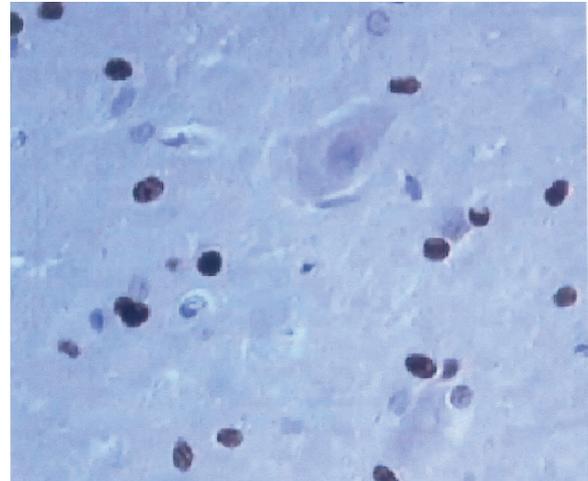
Los estudios de morfometría mostraron que el número de células de apostain-positivas era  $69 \pm 5,6$  en los cortes histológicos correspondientes a animales no tratados y  $72 \pm 3,5$  en los tratados con metilprednisolona. El número de células marcadas identificadas claramente como oligodendrocitos en apoptosis fue de  $35 \pm 6$  en animales tratados y de  $39 \pm 7$  en animales no tratados. El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia significativa entre los dos grupos ( $p > 0,05$ ).

A las cuatro horas tras la lesión, los cambios histopatológicos observados en la médula espinal en el segmento de lesión eran similares a los descritos en el grupo anterior, sin embargo, en la sustancia blanca el edema y las imágenes de desmielinización axonal eran más evidentes. La expresión de apostain también era similar a la del grupo anterior. La morfometría en este momento mostró un número de células apostain-positivas de  $72,4 \pm 3,5$  en las secciones medulares de animales no tratados y  $69 \pm 5,6$  células en los animales tratados. El número de células de aspecto oligodendroglial y marcadas con apostain fue de  $38 \pm 6$  y de  $41 \pm 4$  en animales tratados y no tratados, respectivamente. El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia significativa entre los dos grupos experimentales ( $p > 0,05$ ).

A las ocho horas de la lesión se podían identificar en el tejido medular traumatizado zonas de necrosis, fundamentalmente en la sustancia gris centromedular, persistiendo todavía focos hemorrágicos. Un importante edema tisular estaba presente en este período y estas áreas de edema vasogénico se asociaban con un ensanchamiento de los espacios extracelulares, fundamentalmente en la sustancia blanca. En los animales tratados con metilprednisolona el edema observado fue menor así como las imágenes de degeneración axonal y desmielinización. Se detectaban cuerpos apoptóticos tanto en células pequeñas redondeadas de aspecto glial como en células de aspecto neuronal muchas veces localizadas cercanas a áreas de necrosis en la sustancia gris. Las técnicas inmunohistoquímicas mostraron un importante incremento del número de células apostain positivas en la sustancia gris tanto de las astas anteriores y posteriores. Parte de estas células presentaban morfología neuronal (fundamentalmente neuronas motoras). Junto a las neuronas existían células apostain positivas que coexpresaban MAB1580, tipificándose como oligodendrocitos. Estas células fueron identificadas como oligodendrocitos en apoptosis por medio de la microscopía electrónica.



**Figura 2.** Oligodendrocito en fase precoz de apoptosis, a las 24 horas de la lesión traumática medular. Se observan típicas alteraciones, con agregaciones de la cromatina nuclear y conservación de las organelas citoplasmáticas. Microscopía electrónica, x 4.000.



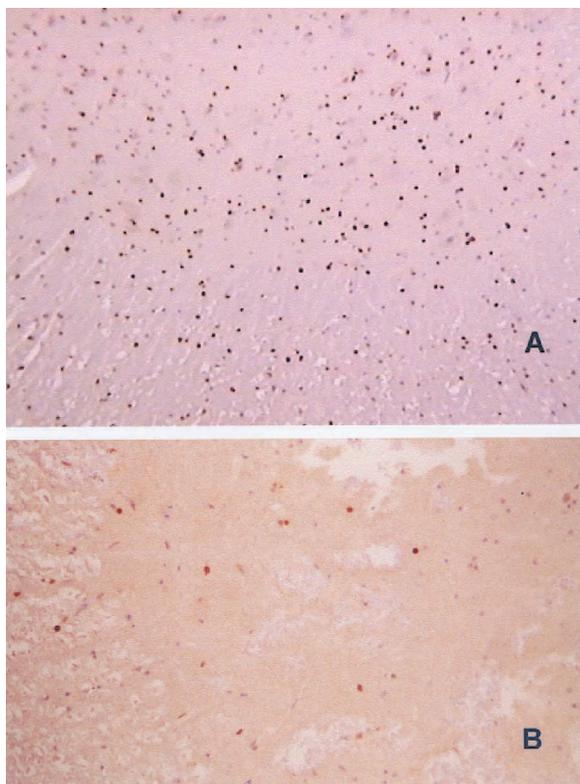
**Figura 3.** Oligodendrocitos marcados con apostain, en torno a neuronas no marcadas. Veinticuatro horas tras el traumatismo. Apostain, técnica ABC, x 400.

ca (Figura 2). Por otra parte, en la sustancia blanca también encontramos un aumento de células positivas para apostain con apariencia oligodendroglial que se mostraron MAB 1580 positivas, junto a astrocitos marcados con apostain. La morfometría mostró en este tiempo, un número de células apostain-positivas de  $172 \pm 4,6$  en los animales tratados y un número de células positivas de  $186 \pm 5,8$  en los animales no tratados. Las células de aspecto oligodendroglial marcadas con apostain fueron  $98,4 \pm 4,6$  en animales tratados y  $102,2 \pm 8,6$  en animales no tratados. El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia significativa entre los dos grupos ( $p > 0,05$ ).

A las 24 horas tras el traumatismo, en la zona de lesión el número de neuronas que persistían en la sustancia gris era muy pequeño. Se observaron claras áreas de necrosis con algunas células inflamatorias y focos de microhemorragia persistentes. A nivel de la sustancia blanca se visualizaba también imágenes de daño tisular con desestructuración de la morfología axonal e hipertrofia citoplasmática de las células de astroglia. La positividad a apostain era solamente observada en células redondeadas de núcleo oscuro y compacto con un halo claro perinuclear positivas para MAB-1580 y por tanto identificables como oligodendrogliales. Estas células se localizaron al azar a lo largo de toda la sustancia blanca. En la sustancia gris, la positividad a apostain era escasa en animales tratados y no tratados, respectivamente, aunque se identificaron oligodendrocitos apoptóticos entre neuronas de morfología conservada (Figura 3). El estudio morfométrico en es-

te momento mostró un número de células apostain-positivas de  $153,1 \pm 2,1$  en los animales no tratados y  $111 \pm 6,5$  células en los animales tratados, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). El número de células marcadas, identificadas como oligodendrocitos, fue de  $80 \pm 12,2$  en animales no tratados y de  $45 \pm 6,7$  en animales tratados ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

A las 72 horas de la lesión medular, en los animales no tratados las hemorragias tisulares estaban prácticamente ausentes, persistiendo, sin embargo, signos de degeneración tisular sobre todo en la región central y posterior de la médula espinal. Así, se podía observar la existencia de una cavidad centromedular y a nivel de la sustancia blanca un importante edema intersticial con lesiones sobre los axones mielinizados de los cordones medulares. En los animales tratados con MP también se observaron imágenes de degeneración axonal y de desmielinización, así como fibras mielinizadas con pérdida de la estructura axónica en su interior, pero fueron prácticamente inexistentes las zonas de extenso edema intersticial. La expresión de apostain estaba limitada prácticamente a la sustancia blanca afectando a células de aspecto morfológico oligodendroglial (MAB 1580 positivas) así como a algunas células de aspecto astrogliar. De forma muy excepcional se detectaba alguna neurona apostain positiva. La morfometría, en este momento, mostró un número de células apostain-positivas de  $98 \pm 3,2$  en los animales no tratados y de  $89 \pm 4,5$  células en los animales tratados, resultados sin diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Las células de aspecto oli-

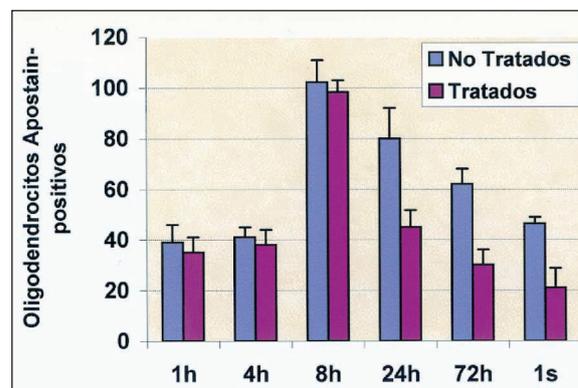


**Figura 4.** Panorámicas histológicas que muestran un grado extremo de diferencias en el número de oligodendrocitos en apoptosis, correspondientes a la sustancia gris medular, en animales no tratados (A) y tratados con metilprednisolona (B). 24 horas tras la lesión medular traumática. Apostain, técnica ABC, x 40.

godendroglial fueron  $62 \pm 6$  en animales no tratados y  $30 \pm 6$  en animales tratados ( $p < 0,05$ ).

Una semana tras el traumatismo, la positividad a apostain era muy escasa, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, afectando sólo a células de morfología glial y estando ausente en elementos neuronales. Estos resultados eran idénticos para ambos grupos experimentales donde los estudios morfométricos mostraron un valor para las células apostain-positivas de  $51,6 \pm 4,1$  para los animales no tratados y de  $47,2 \pm 3,4$  células para los animales tratados, sin diferencia entre los dos grupos ( $p > 0,05$ ). Las células oligodendrogliales marcadas fueron, como valor medio,  $46,4 \pm 2,6$  y  $21 \pm 7,6$  respectivamente, para el grupo de animales no tratados y tratados ( $p < 0,05$ ). La Figura 5 muestra los valores medios de células oligodendrogliales marcadas con apostain en los diferentes momentos tras la lesión y en los dos grupos experimentales.

Los resultados de microscopía electrónica que se llevaron a cabo sobre las muestras, entre una

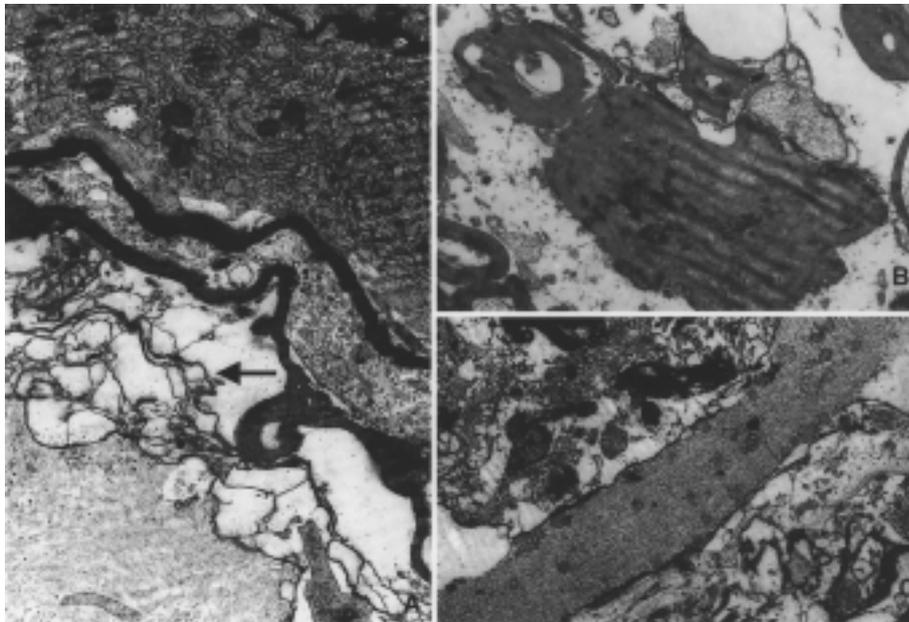


**Figura 5.** Gráfica que muestra los valores medios de oligodendrocitos en apoptosis, a lo largo del período de tiempo estudiado, en los dos grupos experimentales. A partir de las 24 horas tras la lesión, existe una clara diferencia, estadísticamente significativa, entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ).

hora y una semana después de la lesión, mostraron la coexistencia de células en necrosis y en apoptosis. Se pudieron identificar células en una fase temprana de apoptosis, mostrando la característica agregación de cromatina nuclear en masas densas, con la preservación de organelas citoplasmáticas. Posteriormente, se identificaron células en estadios más avanzados de la apoptosis mostrando la típica y clara retracción citoplasmática así como el desarrollo de protuberancias en la superficie celular y fragmentación del contenido nuclear, formando típicos cuerpos apoptóticos. Aunque las características del estudio ultraestructural no permitieron establecer resultados cuantitativos respecto a las imágenes de desmielinización, se observaron diferencias cualitativas en los diferentes períodos de tiempo estudiados y también según que los animales hubieran sido tratados o no con metilprednisolona. Así, se observó un mayor número de imágenes de desmielinización en los animales no tratados, siendo evidente este hecho a partir de las 24 horas de la lesión, con su máxima expresión a la semana del traumatismo (Figura 6).

## DISCUSIÓN

Tradicionalmente, la muerte celular que acontece después de un traumatismo medular severo ha sido explicada por el desencadenamiento de un proceso de necrosis, resultante del fenómeno hemorrágico e isquémico (hipoxia) y de la reacción inflamatoria que acompaña al daño tisular



**Figura 6.** Imágenes de microscopía electrónica, mostrando alteraciones mielínicas a lo largo del período de tiempo estudiado. **(A)** Desmielinización (flecha) a las 24 horas de la lesión (x 4.000). **(B)** Masas amorfas de mielina después de 72 horas tras la lesión traumática (x 8.000). **(C)** Denudamiento axonal con pérdida de la mielina, una semana después de la lesión traumática (x 4.000).

(48, 49). Hoy sabemos, sin embargo, que el mecanismo de apoptosis, como fenómeno de muerte celular programada, parece estar implicado activamente en la degeneración medular post-traumática, desempeñando un papel importante en los daños neurológicos que se van a establecer tras la fase aguda de la lesión traumática (4, 21, 26-28, 31, 33, 50, 51).

En el presente estudio hemos utilizado un nuevo procedimiento inmunohistoquímico en secciones en parafina para la detección específica de células apoptóticas en estadios muy tempranos, usando el anticuerpo monoclonal anti-ssDNA Mab F7-26 (apostain) (41-44). Los resultados obtenidos muestran la existencia de células apostain positivas tan sólo una hora después del traumatismo en la sustancia gris medular, tanto a nivel del componente neuronal como glial. Además, encontramos un importante número de células en apoptosis tipificables como de naturaleza oligodendroglial, con un pico de mayor expresión de células apostain positivas a las ocho horas de la lesión traumática.

Por otra parte, cuando se administra metilprednisolona encontramos que existe una disminución estadísticamente significativa del número de células apostain-positivas a las 24 horas del traumatismo, con una reducción significativa de la apoptosis oligodendroglial a partir de este momento y coincidiendo con una disminución en las imágenes ultraestructurales de desmielinización. Estos resultados parecen indicar que la administración de metilprednisolona es capaz de ofrecer

neuroprotección en cuanto a lograr una reducción significativa de la apoptosis celular, y en particular de la apoptosis que afecta a las células de oligodendroglía a partir de las 24 horas tras la lesión. Teniendo en cuenta que es a partir de las 24 horas cuando se aprecian ultraestructuralmente claras imágenes de desmielinización axonal y que estas imágenes se reducen significativamente en el caso de animales tratados con esteroides, es posible que la disminución de la desmielinización que acontece en los animales tratados puede estar relacionada con el efecto antiapoptótico logrado por estos fármacos sobre las células de oligodendroglía.

En nuestro material hemos podido observar que en períodos precoces de evolución post-traumática, la positividad al apostain está fundamentalmente localizada en la sustancia gris medular y en períodos más tardíos la positividad parece limitarse fundamentalmente a la sustancia blanca. Lou y cols. (33) aportan resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio, con una pequeña diferencia en el porcentaje de células apoptóticas en los diferentes tiempos, lo que puede ser debido a la alta especificidad del marcador de apoptosis que hemos utilizado, ya que apostain es una técnica que permite detectar células en apoptosis aún en ausencia de fragmentación del DNA.

La consideración de que los fenómenos de apoptosis desempeñan un papel en las lesiones secundarias que acontecen tras una lesión traumática medular nos debe llevar a plantearnos la utilidad de ciertas terapias antiapoptóticas dirigi-

das a frenar la cascada de eventos bioquímicos que ocurren de forma secundaria a la lesión traumática, fundamentalmente terapias con bcl-2 o con anticuerpos anticaspasas (29, 31, 34, 35). En cualquier caso, existen publicaciones a favor de que tras un traumatismo medular severo, la administración precoz y continuada de corticoides a dosis altas puede influir significativamente sobre las lesiones morfológicas que acontecen en el tejido lesionado, hecho que se correlaciona, en algunas ocasiones, con una importante recuperación funcional (20) y que, según nuestros presentes resultados, podría ser relacionado con un efecto antiapoptótico sobre las células oligodendrogiales, cuya principal función es la formación y mantenimiento de la estructura miélica. Esta hipótesis cobra un mayor valor si se tiene en cuenta que, en el momento actual, el mecanismo de actuación por el cual los corticoides podrían ejercer un efecto neuroprotector sobre las lesiones medulares es aún desconocido, implicándoseles en la disminución de catecolaminas en la zona de lesión (52, 53), en su capacidad de atenuar la formación de radicales libres (54) o en su efecto directo sobre los niveles de glutámico (55), e incluso parece tener actuaciones a nivel circulatorio, metabólico y de estabilización de la membrana (56), efecto sobre la peroxidación lipídica (39, 57, 58), formación de prostaglandinas por liberación de ácido araquidónico (59), en la formación de radicales libres del oxígeno (60, 61), efecto antiedema (20) o incluso antiinflamatorio (9, 62).

Además, se acepta que los glucocorticoides pueden estar regulando la expresión de ciertas moléculas en el sistema nervioso. Así, se conoce que la corticosterona es capaz de regular la expresión de PGA en astrocitos de la médula espinal contribuyendo a la regulación de la gliosis después de una lesión y que los oligodendrocitos y la microglia también son sensibles a la acción de los glucocorticoides. La inhibición de la peroxidación lipídica parece ser uno de los mecanismos más beneficiosos de la metilprednisolona, como se ha reflejado en estudios cooperativos que señalan que una dosis de 30 mg/kg es suficiente para atenuar la peroxidación lipídica postraumática (23, 46, 59). El descubrimiento de que la activación de un receptor de glucocorticoide inhibe la actividad transcripcional de ciertos factores nucleares que regulan la expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria como citoquinas, óxido nítrico o sintetasa inducible, ha aportado datos importantes acerca de las bases moleculares de la actividad de los glucocorticoides y es obvio que otros posibles mecanismos de actuación de los glucocorticoides sobre la apoptosis, no relaciona-

dos con los receptores de glucocorticoides, no pueden ser descartados.

En estudios previos, usando dexametasona tras una lesión medular, hemos podido comprobar que la dexametasona ejerce un importante efecto antiedematoso en el tejido medular traumatizado y reduce significativamente la desmielinización postraumática (20). La posibilidad de que este efecto esté mediado también por una acción antiapoptótica se deduce de observaciones previas que demuestran como la dexametasona logra una marcada reducción del número de células en apoptosis en la médula traumatizada, incluso antes de las primeras 24 horas tras la lesión (63). Estos hallazgos se encuentran en relación con los resultados obtenidos por Brandoli y cols. (64), quienes describen que la administración de dexametasona a altas dosis (20 mg/kg) puede reducir la apoptosis en la médula espinal de ratas sometidas a un traumatismo por contusión, suponiéndose que este efecto antiapoptótico es debido a su capacidad para reducir los niveles del receptor p75.

En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la administración sistémica de una dosis única de metilprednisolona (30 mg/kg) después de un traumatismo medular es capaz de disminuir significativamente el número total de células en apoptosis localizadas en el tejido medular traumatizado a las 24 horas de la lesión y que a partir de este momento, en los animales tratados, se aprecia una disminución significativa del número de oligodendrocitos apoptóticos y, al mismo tiempo, disminuyen las imágenes de desmielinización axonal en el tejido medular traumatizado. Estos hallazgos sugieren un importante papel de la apoptosis oligodendroglial inducida por el traumatismo en el desencadenamiento de lesiones secundarias de desmielinización, en las fases precoces tras un trauma medular severo. La posibilidad de bloquear parcialmente con metilprednisolona la apoptosis postraumática ofrece una nueva justificación para el empleo de esteroides en las fases iniciales de un traumatismo medular severo y justifica la necesidad de posteriores estudios, encaminados a un mejor conocimiento del papel que juega la apoptosis en las lesiones traumáticas del sistema nervioso.

## BIBLIOGRAFÍA

1. KERR J F R, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257.

2. WYLLIE A H. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284: 555-556.
3. SCHWARCH L M, OSBORNE B A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today*. 14: 582-590.
4. BEATTIE M S, FAROOQUI A A, BRESNAHAN J C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000; 17: 915-925.
5. LU J, ASHWELL K W, WAITE P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*. 2000; 25: 1859-1866.
6. BRUNE B, VON-KNTHEN A, SANDAU K B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 1998; 351: 261-272.
7. CUMMINGS M C, WINTERFORD C M, WALKER N I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21: 88-101.
8. NG I, YEO T, TANG W Y, SOONG R, NG P Y, SMITH D R. Apoptosis occurs after cerebral contusion in humans. *Neurosurgery*. 2000; 46: 949-956.
9. XU J, FAN G, CHEN S, WU S, XU X M, HSU C Y. Methylprednisolone inhibition of TFN-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 59: 135-142.
10. LINNIK M D, ZOBRIST R H, HATFIELD M D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993; 24: 2002-2009.
11. ALLEN A R. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J Nerv Ment Dis*. 1914; 41: 141-147.
12. TATOR C H, FEHLINGS M G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991; 75: 15-26.
13. ISAAC L, PEJIC L. Secondary mechanisms of spinal cord injury. *Surg Neurol*. 1995; 43: 484-485.
14. DOHRMANN G J, WICK K M, BUEY P C. Spinal cord blood flow patterns in experimental traumatic paraplegia. *J Neurosurg*. 1973; 38: 52-58.
15. GREEN B A, WAGNER F C. Evolution of edema in the acutely injured spinal cord: a fluorescent microscopic study. *Surg Neurol*. 1973; 1: 98-101.
16. LEMKE M, FADEN A I. Edema development and ion changes in rat spinal cord after impact trauma: injury dose-response studies. *J Neurotrauma*. 1990; 7: 41-54.
17. KOBRINE A I, DOYLE T F, MARTINS A N. Local spinal cord blood flow in experimental traumatic myelopathy. *J Neurosurg*. 1975; 42: 144-149.
18. VAQUERO J, OYA S, RAMIRO M J. Experimental traumatic effects about myelinated fibers in the spinal cord. *Invest Clin (Maracaibo)*. 1976; 17: 115-121.
19. ZHANG Z, KREBS C J, GUTH L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol*. 1997; 143: 141-152.
20. ZURITA M, OYA S, MORALES C, LÓPEZ J G, CEVALLOS C, VAQUERO J. Effects of dexamethasone administration on the posttraumatic demyelination in an experimental model of spinal cord contusion. En: *Polytraumatized*. Madrid: MAPFRE Medicina, 1994; 343-349 [In Spanish]
21. ZURITA M, VAQUERO J, ZURITA I. Presence and significance of CD-95 (Fas/Apo1) expression after spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 2)*. 2001; 94: 257-264.
22. YOUNG W. The role of calcium in spinal cord injury. *CNS Trauma*. 1985; 2: 109-114.
23. BRAUGHLER J M, HALL E D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1989; 6: 289-301.
24. PANTER S S, YUM S W, FADEN A I. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol*. 1990; 27: 96-99.
25. HAMADA Y, IKATA T, KATOH S, TSUCHIYA K, NIWA M, TSUTSUMISHITA Y, FUKUZAWA K. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996; 20: 1-9.
26. SPRINGER J E, AZBILL R D, KNAPP P E. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*. 1999; 5: 943-946.
27. CROWE M J, SHUMANN S L, MASTERS J N, BRESNAHAN J C, BEATTIE M S. Morphological evidence suggesting apoptotic nuclei in spinal cord injury. *Soc Neurosci Abstr*. 1995; 21: 232.
28. KATOH K, IKATA T, KATOH S, HAMADA Y, NAKAUCHI K, SANO T, NIWA M. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Letters*. 1996; 216: 9-12.
29. EMERY E, ALDANA P, BUNGE M B, PUCKETT W, SRINIVASAN A, KEANE R W, BETHEA J, LEVI A D. Apoptosis after traumatic human spinal cord. *J Neurosurg*. 1998; 89: 911-920.
30. CROWE M J, BRESNAHAN J C, SHUMAN S L, MASTERS J N, BEATTIE M S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine*. 1997; 3: 73-76.
31. LI G L, BRODIN G, FARROQUE M, FUNA K, HOLTZ A, WANG W L, OLSSON Y. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55: 280-289.
32. LIU X Z, XU X M, HU R, DU C, ZHANG J, MCDONALD J W, DANG H X, WU Y J, FAN J S, JACQUIN M F, HSU C Y, CHOI D W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997; 17: 5395-5406.
33. LOU J, LENKE L G, LUDWING F J, O'BRIEN M F. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998; 36: 683-690.
34. HARA H. Involvement of caspase on apoptosis in ischemia-induced neuronal cell death: usefulness of caspase inhibitors for strokes therapy. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1999; 113: 97-111.
35. LI M, ONA V O, CHEN M, KAUL M, TENNTI L, ZHANG X, STIEG P E, LIPTON S A, FRIEDLANDER R M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neurosci*. 2000; 99: 333-342.
36. BRACKEN M B. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone: results of a multicenter, randomized clinical trial. *J Neurotrauma*. 1991; 8 (Suppl 1): S47-S52.
37. BRACKEN M B, ALDRICH E F, HERR D L, HITCHON P W, HOLFORD T R, MARSHALL L F, NOCKELS R P, PASCALE M B, SHEPARD M J, SONNTAG V K, WINN H R, YOUNG W. Clinical measurement statistical analysis, and risk-benefit: controversies from trials of spinal injury. *J Trauma*. 2000; 48: 558-561.

38. BRACKEN M B, SHEPARD M J, COLLINS W F, HOLFORD T R, BASKIN D S, EISENBERG H M, FLAMM E, LEO-SUMMERS, MAROON J, MARSHALL L F, PEROT P L, PIEPMEIER J, SONNTAG V K H, WAGNER F C, WILBERGER J E, WINN H R, YOUNG W. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J Neurosurg.* 1992; 76: 23-31.
39. BRACKEN M B, SHEPARD M J, COLLINS W F, HOLFORD T R, YOUNG W, BASKIN D S, EISENBERG H M, FLAMM E, LEO-SUMMERS, MAROON J, MARSHALL L F, PEROT P L Jr; PIEPMEIER J, SONNTAG V K H, WAGNER F C, WILBERGER J E, WINN H R. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990; 322: 1405-1411.
40. KANELLOPOULOS G K, KATO H, WU Y, DOUGENIS D, MACKEY M, HSU C Y, KOUCHOUKOS N T. Neuronal cell death in the ischemic spinal cord: the effect of methylprednisolone. *Ann Thorac Surg.* 1997; 64: 1279-1286.
41. FRANKFURT O S, ROBB J A, SUGARBAKER E V, VILLA L. Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res.* 1996; 226: 387-397.
42. FERLINI C, KUNKL A, SCAMBIA G, FATTOROSI A. The use of apostain in identifying early apoptosis. *J Immunol Methods.* 1997; 205: 95-101.
43. TSAI Y M, ANSEVIN A T, HNILICA L S. Association of tissue-specific histones with deoxyribonucleic acid. Thermal denaturation of native, partially dehistonized and reconstituted chromatin. *Biochemistry.* 1989; 14: 1257-1265.
44. ZUNINO S J, SINGH M K, BASS J, PICKER L J. Immunodetection of histone epitopes correlates with early stages of apoptosis in activated human peripheral T-lymphocytes. *Am J Pathol.* 1996; 149: 653-663.
45. HALL E D, DANIEL L W, BRAUGHLER J M. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg.* 1984; 61: 124-130.
46. HALL E D, BRAUGHLER J M. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg Neurol.* 1982; 18: 320-327.
47. YOON D H, KIM Y S, YOUNG W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999; 40: 313-320.
48. BLIGHT A. Spinal cord injury models: Neurophysiology. *J Neurotrauma.* 1992; 9: 147-150.
49. BALLENTINE J D. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978; 39: 236-253.
50. YONG C, ARNOLD P M, ZOUBINE M N, CITRON B A, WATANABE I, BERMAN N E, FESTOFF B W. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma.* 1998; 15: 459-472.
51. TACCONI T. Neuronal death: is there a role for astrocytes. *Biochem Res.* 1998; 23: 759-765.
52. OSTERHOLM J L, MATHEWS G J. Altered metabolism following experimental spinal cord injury. Part I: Protection against traumatic spinal cord hemorrhagic necrosis by norepinephrine synthesis blockade with alpha-methyltyrosine. *J Neurosurg.* 1972; 36: 386-394.
53. OSTERHOLM J L, MATHEWS G J. Altered metabolism following experimental spinal cord injury. Part II: Protection against traumatic spinal cord hemorrhagic necrosis by norepinephrine synthesis blockade with alpha-methyltyrosine. *J Neurosurg.* 1972; 36: 395-401.
54. HALL E D. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1992; 76: 13-22.
55. OGATA T, NAKAMURA Y, TSUJI K, SHIBATA T, KATAOKA K. Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience.* 1993; 55: 445-449.
56. DEMOPOULOS H B, MILVY P, KAKARI S, RANSOFF J. Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema. En: J H Reulen, K. Schuermann (eds), *Steroids and Brain edema.* New York: Springer, 1973; 29-39.
57. DEMOPOULOS H B, FLAMM E S, SELIGMAN M L, PIETRONIGRO D D, TOMASULA J, DECRESCITO V. Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: effects of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60: 1415-1424.
58. KOC P K, AKDEMIR H, KARAKÜÇÜK E I, ÖKTEM I S, MENKÜ A. Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord.* 1999; 37: 29-32.
59. ANDERSON D K, SAUNDERS R D, DEMEDIUK P, DUGAN L L, BRAUGHLER J M, HALL E D, MEANS E D, HORROCKS L A. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma.* 1985; 2: 257-267.
60. SLATER A F, NOBEL S I, ORRENIUS S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem Biophys Acta.* 1995; 1271: 59-62.
61. BENTON R L, ROSS C D, MILLER K E. Spinal taurine levels are increased 7 and 30 days following methylprednisolone treatment of spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2001; 893: 292-300.
62. BARTHOLDI D, SCHWAB M E. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but no ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain Res.* 1995; 672: 177-186.
63. ZURITA M, VAQUERO J, OYA S, MORALES C. Dexamethasone decreases apoptosis-related cell death after spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine).* In press.
64. BRANDOLI C, SHI B, PFLUG B, ANDREWS P, WRATHALL J R, MOCHETTI I. Dexamethasone reduces the expression of p75 neurotrophin receptor and apoptosis in contused spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001; 87: 61-70.