



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Posgrado en Ciencias Ingeniería Biomédica

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias  
(Ingeniería Biomédica)

***“Efecto de andamios de PLA y PLA+ PPy/I en ratas con  
lesión de médula espinal por sección completa, evaluado a  
través de IRM”***

P R E S E N T A:

Gloria Stephanie Sánchez Morales

Asesor: Dr. J.C. Axayacatl Morales Guadarrama

Ciudad de México, a 23 de Agosto de 2022

## **DEDICATORIA**

*A Dios  
por darme la vida y estar siempre conmigo, guiándome en mi camino.*

*A mis padres quienes con su amor, apoyo, paciencia y esfuerzo me han  
permitido llegar a cumplir otro sueño más.*

*A mis hermanos por sus consejos, apoyo, y cariño, durante todo este tiempo,  
por estar conmigo en todo momento.*

*A mis sobrinos que con su amor y cariño me hacen muy feliz, siempre los llevo  
en mi corazón.*

*Gracias por todo.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante el periodo de duración de la maestría.

Agradezco al Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI3M) por permitirme realizar este proyecto dentro de sus instalaciones, así como al personal por todo el apoyo, ayuda y conocimientos que me brindaron durante mi estancia.

A mi asesor el Dr. J.C. Axayacatl Morales Guadarrama por todas sus enseñanzas, respaldo y dirección brindados durante todas las etapas del presente proyecto de investigación. Al Dr. Joaquín Azpiroz Leehan por ser mi tutor y guiarme al inicio de la maestría, gracias por sus consejos. A ambos siempre les estaré agradecida.

A mis compañeros y amigos de maestría Jannet, Ana, Rubén, Esteban y Rodolfo por compartir sus conocimientos, experiencias, consejos y días muy agradables durante este periodo.

A todos los profesores y a la coordinadora del posgrado que me ayudaron en mi formación y contribuyeron a mi crecimiento profesional. A los sinodales por tomarse tiempo de revisar el presente trabajo, sus comentarios y apoyo para realizar el documento final.

Y finalmente, agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, por permitirme ingresar a la Licenciatura y al posgrado en Ingeniería Biomédica.

## ÍNDICE

Índice de tablas y figuras.....	6
Resumen .....	9
Introducción.....	11
1. Marco teórico .....	13
1.1. Anatomía y función de la médula espinal .....	14
1.2. Epidemiología y Fisiopatología de la Lesión de Médula Espinal .....	16
1.3. Estrategias terapéuticas en lesión de médula espinal .....	19
1.4. Polímeros en aplicaciones biomédicas .....	22
1.5. Polipirrol dopado con yodo en lesión de médula espinal .....	27
1.6. Imagenología por Resonancia Magnética.....	29
1.6.1. Difusión por Resonancia Magnética .....	33
1.6.2. Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM) .....	37
2. Justificación .....	42
3. Hipótesis .....	43
4. Objetivos.....	43
4.1. Objetivo General.....	43
4.2. Objetivos específicos .....	43
5. Materiales y Métodos.....	44
5.1. Diseño Experimental.....	44
5.2. Procedimiento Quirúrgico .....	46
5.3. Estudio de Imagenología por Resonancia Magnética .....	47
5.4. Evaluación Funcional (BBB).....	50
6. Resultados y Discusión .....	52
6.1. Resonancia Magnética .....	52
6.2. Parámetros de difusión.....	54
6.3. Análisis Volumétrico en Médula Espinal .....	62
6.4. Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM).....	65
6.5. Evaluación Funcional (BBB).....	70
7. Conclusiones.....	73
8. Perspectivas.....	74

9. Bibliografía.....	75
Anexo .....	83

## Índice de tablas y figuras

Figura 1.1 Estructura de una neurona grande perteneciente al encéfalo (1).....	13
Figura 1.2 Corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal (2).....	15
Figura 1.3 Estructura de la médula espinal (2).....	16
Figura 1.4 Fisiopatología alrededor del sitio de lesión en etapa aguda/subaguda. ....	18
Figura 1.5 Fisiopatología alrededor del sitio de lesión en etapa crónica. ....	19
Figura 1.6 (a) Estructura química del ácido láctico y (b) poli- ácido láctico. ....	23
Figura 1.7 (a) Estructura química del pirrol y (b) polipirrol (PPy).....	25
Figura 1.8 Núcleo en ausencia de un campo magnético, gira alrededor de su eje en direcciones aleatorias. ....	30
Figura 1.9 En presencia de un campo magnético los núcleos se alinean de forma paralela al campo magnético $\beta_0$ cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia (RF) cambia la dirección de la magnetización a un plano transversal al campo magnético.....	31
Figura 1.10 Forma de onda sinusoidal decreciente de la señal recibida (caída de inducción libre [FID]). ....	32
Figura 1.11 Relajación longitudinal T1. ....	32
Figura 1.12 Relajación transversal T2.....	33
Figura 1.13 A) Movimiento anisotrópico, B) Movimiento isotrópico.....	34
Figura 1.14 Modelo tensorial de difusión. ....	35
Figura 1.15 Ecuación para el cálculo de la difusión radial.....	36
Figura 1.16 Ecuación para el cálculo de la difusividad media. ....	36
Figura 1.17 Ecuaciones para el cálculo del índice de FA. ....	37
Figura 1.18 Espectros normales para materia blanca (WM) (1) y materia gris (GM) (2). ....	38
Figura 1.19 Espectro de sujeto sano. A)Se observan los picos de NAA, Cr y dos picos de Cho, B) Además de los metabolitos de NAA,Cr y Cho, se observan los metabolitos de ml y Glx. .	40
Tabla 5.1 Asignación aleatoria de los 3 grupos experimentales. ....	44
Figura 5.1 Andamios. A) Andamios de PLA fabricados mediante la técnica de electrohilado. B) Andamios de PLA+PPy/I (andamios de PLA recubiertos por PPy/I sintetizados por plasma). ....	45
Figura 5.2 Laminectomía a nivel de novena vertebra torácica (T9). A)Aplicación de sedante y anestésico vía intramuscular (IM), B) y C)Localización de T9 y desinfección de piel,	

D)Laminectomía, E)Corte de meninges de forma longitudinal, F)Corte transversal en médula espinal, G)Colocación de andamios en ambos lados de la sección completa.....	47
Figura 5.3 Escáner 3T Philips Achieva y antena neurovascular.....	48
Figura 5.4 Preparación de los sujetos de experimentación. ....	48
Figura 5.5 Evaluación BBB en campo abierto. A)Sujeto sin movimientos en extremidades traseras durante evaluación, B)Sujeto presentando pasos plantares con soporte de peso en extremidades traseras. ....	51
Figura 6.1 Imágenes sagitales de resonancia magnética,T2W, una semana después de la lesión. A)Rata del grupo control. B) Rata con andamio de PLA. C) Rata con andamio de PLA+PPy/I.....	53
Figura 6.2 Imágenes sagitales de resonancia magnética,T2W, cuatro semanas después de la lesión. A)Rata del grupo control. B) Rata con andamio de PLA. C) Rata con andamio de PLA+PPy/I.....	54
Figura 6.3 Fracción de anisotropía (FA) de los 3 grupos de estudio.Región Caudal,Epicentro y Región rostral.Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=3 semana previa,n=3 semana 1,n=1 semana 4). ....	55
Tabla 6.1 Valores de fracción de anisotropía (FA).Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD.....	55
Figura 6.4 Tractografía. A) Rata sana. B) Trayectoria de fibras de materia blanca entre sujetos del grupo control, grupo PLA y grupo PLA+PPy/I, una semana después de la lesión. ....	56
Figura 6.5 Tractografía. A) Rata sana. B) Trayectoria de fibras de materia blanca entre sujetos del grupo control, grupo PLA y grupo PLA+PPy/I, cuatro semanas después de la lesión.....	57
Figura 6.6 Difusividad Media (MD) de los 3 grupos de estudio.Región Caudal,Epicentro y Región rostral.Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=3 semana previa,n=3 semana 1,n=1 semana 4). ....	58
Tabla 6.2 Valores de difusividad media (MD).Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. ....	58
Figura 6.7 Difusión Radial (RD) de los 3 grupos de estudio.Región Caudal,Epicentro y Región rostral.Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=3 semana previa,n=3 semana 1,n=1 semana 4).....	59
Tabla 6.3 Valores de difusión radial (RD).Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. ....	59
Tabla 6.4 Valores de difusión axial (AD).Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. ....	61
Figura 6.9 Médula espinal segmentada entre (T8-T10) en rata sana.....	62

Figura 6.10 Médula espinal segmentada entre (T8-T10) cuatro semanas después de la lesión. A) Rata del grupo control. B) Rata del grupo PLA. C) Rata del grupo PLA+PPy/I.....	63
Tabla 6.5 Valores correspondientes al volumen de cada segmentación, previamente antes de la lesión, una semana después de la lesión y cuatro semanas después de la lesión. Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=3 PREV, n=3 semana 1, n=1 semana 4). 64	64
Figura 6.11 Gráfica del análisis volumétrico en médula espinal de los tres grupos bajo estudio. Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=3 PREV, n=3 semana 1, n=1 semana 4).....	64
Figura 6.12 Estudio espectroscópico (ERM) en médula espinal sana. ....	65
Tabla 6.6 Frecuencia y amplitud de los metabolitos en médula espinal sana. ....	66
Figura 6.13 Estudio espectroscópico (ERM). A) Sujeto del grupo control una semana después de la lesión (n=1) B) Sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I una semana después de la lesión (n=1). ....	66
Figura 6.14 Estudio espectroscópico (ERM). A) Sujeto del grupo control cuatro semanas después de la lesión (n=1) B) Sujeto del grupo con andamio de PLA cuatro semanas después de la lesión (n=1) C) Sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I (n=1). ....	67
Tabla 6.7 Amplitud de los diferentes metabolitos observados en el epicentro de la lesión, cuatro semanas después de la lesión.....	68
Figura 6.15 Ratios entre metabolitos en sujetos de los 3 grupos experimentales, cuatro semanas después de la lesión (n=1).....	69
Tabla 6.8 Relación (ratios) entre metabolitos, cuatro semanas después de la lesión, en unidades arbitrarias (u.a.).....	70
Figura 6.16 Gráfica de la recuperación motora evaluada con la escala BBB. Los resultados están expresados como medias $\pm$ SD. (n=2 grupo control, n=3 grupo PLA, n=2 hasta semana 6 grupo PLA+PPy/I). ....	71

## Resumen

La lesión de médula espinal (LME) es un trastorno grave del Sistema Nervioso Central (SNC) que provoca daños en el tejido nervioso. A pesar de la amplia investigación en terapias para la lesión medular, aún no hay un tratamiento efectivo para restaurar completamente la estructura y función del tejido nervioso.

La ingeniería de tejidos (IT) mediante el uso de biomateriales ha permitido el desarrollo de andamios poliméricos que sirven como base para el crecimiento de diversos tejidos. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue proponer un protocolo para evaluar el efecto de los grupos con andamios de poliácido láctico (PLA) y poliácido láctico recubiertos con polipirrol dopado con yodo (PLA+PPy/I) sintetizados por plasma, así como grupo control, en una lesión de médula espinal por sección completa en fase aguda, en ratas, por medio de imágenes de resonancia magnética, utilizando un escáner de 3 Teslas.

Se realizó un estudio experimental, donde se utilizaron 9 ratas de la cepa Wistar (hembras), con peso de 250-300 g, divididas en 3 grupos: grupo control, animales con lesión de médula espinal por sección completa (sin andamios), grupo PLA, animales con lesión de médula espinal más andamio de PLA, y grupo PLA+PPy/I, animales con lesión de médula espinal más andamio de PLA+PPy/I. Se adquirieron imágenes por resonancia magnética con escáner de 3T antes de la lesión, una semana y cuatro semanas después de la lesión. Los valores de Fracción de Anisotropía (FA), difusividad media (MD), difusión radial (RD) y difusión axial (AD) así como tractografía se obtuvieron por postprocesamiento en el software DSI Studio. Los valores del análisis volumétrico de médula espinal se obtuvieron por postprocesamiento en el software 3D Slicer. El análisis de espectroscopía por resonancia magnética se analizó en la consola del equipo de 3T, cuatro semanas después de la lesión.

Semanalmente, con dos evaluadores en ciego, durante 8 semanas, se midió la recuperación de la función locomotora, de los sujetos de experimentación, bajo la escala de evaluación Basso, Beattie y Bresnahan (BBB).

Los índices de difusión cambiaron para los tres grupos bajo estudio, sin embargo, el grupo con andamio de PLA+PPy/I mostró cambios debido posiblemente a una reestructuración del tejido a través del implante. Tractografía y análisis volumétrico, confirmaron mayor integridad de la arquitectura en los tractos de materia blanca y mayor volumen en médula espinal en sujetos con éste andamio. Estudio espectroscópico, así como la relación (ratios) entre los diferentes metabolitos demostraron información relevante sobre una posible regeneración neuronal y niveles bajos de edema en sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I respecto a sujetos del grupo control y grupo con andamio de PLA. Finalmente, la evaluación funcional demostró que el grupo con andamio de PLA+PPy/I obtuvo una recuperación mayor, donde los sujetos mostraron pasos plantares frecuentes con soporte de peso y coordinación ocasional entre extremidades anteriores y posteriores.

El protocolo utilizado en ésta prueba de viabilidad demostró que es posible establecer el efecto de los andamios implantados en el epicentro de la lesión de médula espinal, en ratas, en fase aguda, a través de imágenes de resonancia magnética utilizando escáner de 3 Teslas. Además se comprobó que andamio de PLA+PPy/I, es una estrategia prometedora para el tratamiento de lesión de médula espinal en un modelo de lesión por sección completa, en fase aguda. Adicionalmente cabe mencionar que este trabajo es el primer estudio en el que se utilizan andamios en un modelo de lesión de médula espinal por sección completa, así como también esta investigación es punto de partida para seguir implementando la técnica de espectroscopía por resonancia magnética (ERM) en estudios posteriores de LME.

## Introducción

La lesión de médula espinal (LME) es un trastorno del Sistema Nervioso Central (SNC) que ocasiona una pérdida de funciones motoras, sensoriales y autonómicas por debajo de la zona afectada. Después de una LME se desencadenan una gran serie de eventos fisiopatológicos en el epicentro de la lesión, por mencionar algunos: inflamación, edema, desmielinización, muerte celular, hemorragia y formación de una cicatriz glial. Todos estos procesos afectan la regeneración axonal en el sitio de la lesión. Los principales tratamientos para la LME incluyen cirugía, uso de fármacos y rehabilitación, los cuales tienen muchas limitaciones pues sólo han demostrado mejorar la función neurológica hasta cierto punto.

La ingeniería de tejidos (IT) se encarga de reparar o regenerar tejido lesionado, con la ayuda de células o biomateriales implantados en la zona lesionada para así poder lograr nuevamente una regeneración en el sitio de la lesión. Los biomateriales se pueden utilizar en forma de andamios para proporcionar una estructura que ofrezca a las células dañadas un soporte que facilite la adhesión, crecimiento y diferenciación celular.

El polipirrol dopado con yodo (PPy/I) sintetizado por plasma es un material biocompatible que ha sido utilizado como implante en forma de partículas y como pastilla en modelos animales con lesión de médula espinal. Estos estudios han demostrado que el implante de PPy/I sintetizado por plasma da como resultado una recuperación motora en modelos animales con LME, neuroprotección en el sitio de lesión, reduce la inflamación y los efectos de la lesión. Aunque el modelo por contusión modela mejor las lesiones reportadas a nivel clínico, el modelo de lesión por sección completa altera completamente la continuidad del tejido y los cambios después de implantar biomateriales en el sitio de lesión se podrán establecer de forma más clara al diferenciar entre regeneración nerviosa debido al implante y no debido a la presencia de axones libres en el sitio de lesión.

En el presente estudio se muestra una estrategia para la LME mediante el uso de andamios de PLA y PLA+PPy/I; en estudio previo del grupo de investigación de IT de la UAM-I se ha demostrado en estudio in vitro que éstos andamios poseen las propiedades tanto fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para el crecimiento de células neuronales, los cuales podrían funcionar como soporte en el proceso de reparación y regeneración de tejido neuronal. Por lo cual es importante hacer uso de estos implantes ahora en un modelo in vivo y analizar el efecto de dichos implantes en el sitio de la lesión.

Por otro lado, las imágenes por resonancia magnética (IRM) son una herramienta que permiten de manera no invasiva tener una valoración anatómica de diversos tejidos y órganos del cuerpo humano. Teniendo técnicas avanzadas por resonancia magnética como las imágenes por tensor de difusión (DTI) y la espectroscopía por resonancia magnética (ERM) capaces de mostrar la magnitud y dirección de las moléculas de agua, así como la posibilidad de proporcionar una valoración bioquímica y metabólica en diversos tejidos. Con ayuda de éstas herramientas se logró evaluar la zona lesionada de la médula espinal, in vivo, de forma no invasiva, a todos los sujetos experimentales.

El contenido del presente estudio se desarrolla de la manera siguiente: en capítulo 1, se expone el marco teórico con la información necesaria para comprender el tema, en capítulo 2, 3 y 4; se plantea la justificación para la realización de este trabajo, hipótesis y objetivos. Posteriormente en capítulo 5 se muestra la metodología utilizada para llegar a los resultados y discusiones que se encuentran en capítulo 6. Para concluir se presenta las conclusiones y perspectivas en capítulos 7 y 8 respectivamente, en capítulo 9 se encuentra la bibliografía, para así finalmente terminar con un anexo.

## 1. Marco teórico

El Sistema Nervioso (SN) es una estructura compleja de mecanismos de control presente en el cuerpo humano, el cual desempeña 3 funciones principales: función sensitiva, integradora y motora. Se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) formado por médula espinal, bulbo raquídeo y encéfalo, y Sistema Nervioso Periférico (SNP) (1,2).

El SNC está constituido por dos tipos de células: neuronas y neuroglia (o simplemente glía). Las neuronas son la unidad funcional del tejido nervioso, las cuales al ser excitables son capaces de recibir, procesar y transmitir información a través de señales químicas y eléctricas. Una neurona tiene una estructura formada por: a) Soma: cuerpo de la neurona, redondeado, dentro de él se encuentra el núcleo celular, zona donde se ordenan y coordinan todas las funciones de la célula. b) Dendritas: prolongaciones gruesas e irregulares que salen del soma, y las cuales son áreas receptoras de señales provenientes de otras neuronas. c) Axón: prolongación que se origina del soma y lleva las señales nerviosas de una neurona a la siguiente (1). Figura 1.1

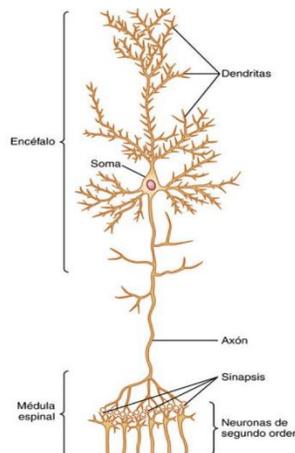


Figura 1.1 Estructura de una neurona grande perteneciente al encéfalo (1).

La sinapsis es la zona de contacto de la terminal de un axón (membrana presináptica) con la membrana de otra célula (membrana postsináptica). A

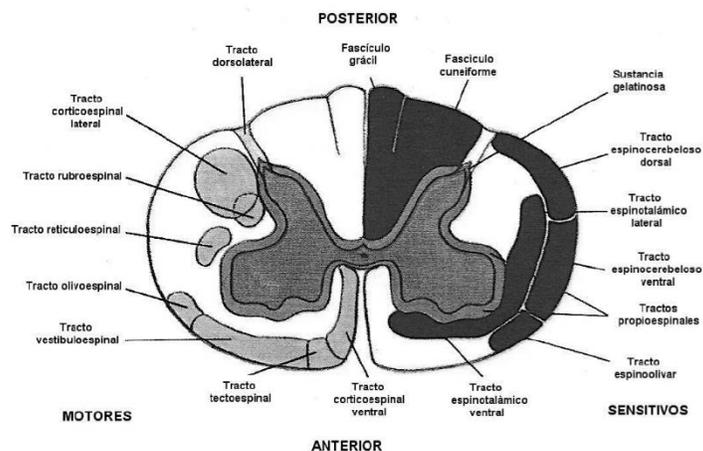
través de la sinapsis la información que conduce el axón de una neurona se transmite a otra, y ésta responde generando más información (excitándose) o menos (inhibiéndose). Las sinapsis más numerosas son las químicas (contienen neurotransmisores), pero también pueden ser eléctricas, lo que significa que el paso de la información de una célula a otra se realiza por sinapsis cuyas membranas presináptica y postsináptica se han fusionado dando lugar a puntos de baja resistencia eléctrica, y no necesitan neurotransmisor (1,3).

Por otro lado, la neuroglia, son células que desempeñan varias funciones: sirven de soporte a las neuronas, en lesiones reparan el área lesionada al regular la composición iónica y química del medio extracelular, defensa inmunitaria, fagocitación de elementos dañinos para las neuronas, metabolismo neuronal y mielinización de los axones. Entre las más importantes se encuentran los oligodendrocitos (células aislantes) que en SNC son capaces de recubrir de mielina a los axones, mientras que en SNP las responsables de la mielinización son las células de Schwann (2). El SNC consiste en el cerebro que se encuentra dentro del cráneo y la médula espinal que se extiende por el conducto vertebral hasta las vértebras lumbares. El cerebro es la parte principal del SN. Mientras que la médula espinal desempeña funciones como conducto para muchas vías nerviosas que van y vienen del encéfalo, y como parte integradora para muchas actividades nerviosas subconscientes.

### **1.1. Anatomía y función de la médula espinal**

La médula espinal está compuesta por áreas de sustancia gris y áreas de sustancia blanca. En corte transversal puede observarse una zona de sustancia gris, en forma de “H” o mariposa en el centro, que tiene los cuerpos de las neuronas medulares, ésta se subdivide en regiones conocidas como astas (anteriores y posteriores). Entre las cuatro astas, quedan limitadas cuatro porciones de sustancia blanca llamadas columnas o cordones medulares (columnas: anterior, posterior y laterales) por donde van las fibras que suben a tramos superiores y las que bajan a tramos inferiores. En el centro de la sustancia gris se encuentra el conducto epéndimo, por el cual circula el líquido

cefalorraquídeo (3). La sustancia gris de la médula espinal puede ser dividida en 2 componentes: motor y sensitivo. La parte motora comprende a las columnas anterior y lateral y da origen a las raíces anteriores. Contiene la asta anterior con motoneuronas que inervan a la musculatura estriada voluntaria. Las células de la columna lateral dan origen a fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo, torácico y lumbosacro las cuales abandonan la medula espinal con las raíces anteriores (2). Figura 1.2



*Figura 1.2 Corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal (2).*

Está rodeada por 3 membranas: duramadre, aracnoides y la piamadre, llamadas en conjunto meninges. La duramadre es la membrana más externa, es una cubierta tubular fibrosa y resistente. El espacio epidural separa a la duramadre de la columna vertebral y contiene tejido areolar laxo y plexos venosos. El espacio subdural es un espacio estrecho entre la duramadre y aracnoides subyacente. La aracnoides es una membrana transparente delgada, separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo que contiene el líquido cefalorraquídeo. La piamadre se adosa íntimamente a la médula espinal (2). Figura 1.3

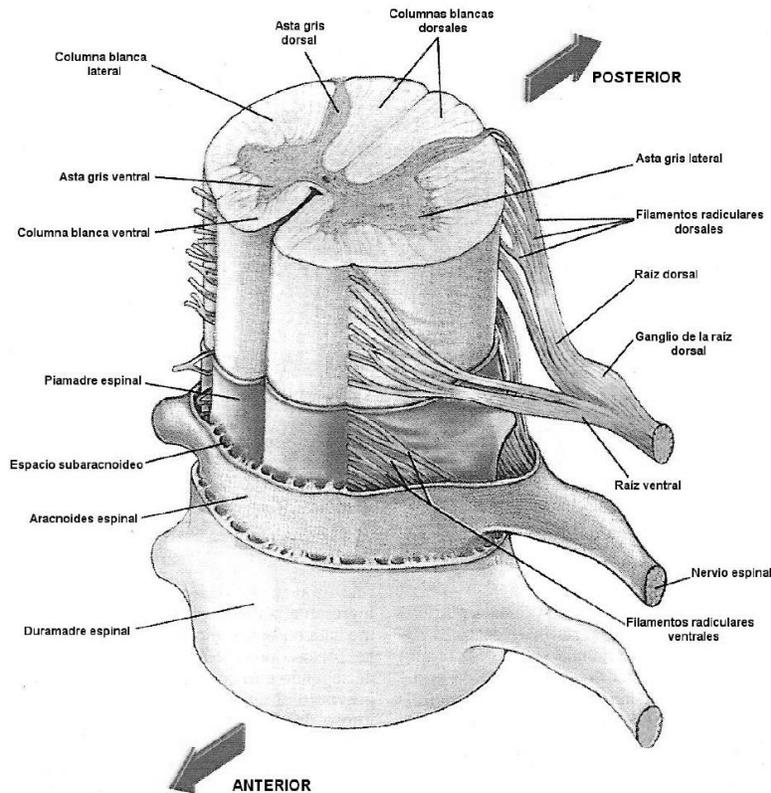


Figura 1.3 Estructura de la médula espinal (2).

## 1.2. Epidemiología y Fisiopatología de la Lesión de Médula Espinal

La Lesión de Médula Espinal (LME) es un trastorno del Sistema Nervioso Central (SNC) que ocasiona una pérdida de diferentes funciones nerviosas tanto motoras, sensitivas y autonómicas por debajo de la zona afectada.

El sitio de la lesión puede ocurrir en cualquier parte de la columna vertebral, sin embargo, las lesiones se localizan en gran medida en dos regiones anatómicas importantes: zona cervical (C5-C7) y zona torácica (T9-T10). Lesiones en las cervicales son las más frecuentes provocando tetraplejía, mientras que las que ocurren en zona torácica resultan en algún grado de paraplejía. Si bien el nivel anatómico de la lesión determina que regiones del cuerpo se ven afectadas, la integridad de la LME determinará la gravedad de pérdida de las funciones nerviosas. En una lesión completa, la médula espinal se corta en dos secciones distintas separando todos los tractos axonales ascendentes y descendentes,

mientras que en lesión incompleta sólo se separan algunos tractos axonales sin la necesidad de dividir a la médula espinal en dos secciones distintas (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado que la incidencia mundial de lesión medular (LM) tanto traumáticas y no traumáticas se situó entre 40 y 80 casos por millón de habitantes, aunque hasta el momento el 90% de las lesiones medulares han sido de origen traumático como consecuencia de accidentes de tráfico, caídas de altura y actos violentos como heridas por arma de fuego, etc (5). Estas lesiones representan un porcentaje muy importante de discapacidad en México y en el mundo, de los adultos jóvenes entre (15-29 años) con discapacidad, las lesiones a causa de un traumatismo representan la tercera razón con un 18.1%, y en adultos el porcentaje se incrementa a un 27.2% (6). Solo en México, en el año 2007, se calculó que anualmente esta lesión se presenta en 18.1 personas por millón de habitantes, siendo más frecuente en hombres con edad productiva entre 16 a 35 años (7).

La fisiopatología de una LME implica la activación de diversos mecanismos autodestructivos muy complejos en el sitio de la lesión y que son importantes analizar para poder establecer blancos terapéuticos eficaces. La LME puede dividirse en tres etapas principales: etapa aguda (menor a 48 horas) después de que se dio la lesión, subaguda (48 horas a 14 días) y crónica (> 3 meses). En etapa aguda/subaguda (daño primario) los primeros eventos bioquímicos observados son lesiones vasculares (hemorragias) que se presentan desde el inicio de la lesión y dentro de las 2 horas posteriores al daño, 6- 24 horas después hay presencia de edema en sustancia blanca que rodea la lesión y la hemorragia se expande a tejido adyacente (8). Así como también hay una liberación y sobreproducción de radicales libres que causan que se oxiden más rápidamente las células nerviosas (estrés oxidativo) y excitotoxicidad que generan una muerte neuronal primaria, a causa de la hiperactivación del neurotransmisor glutamato (9). Otros mecanismos que se presentan son apoptosis y necrosis causada por los astrocitos y oligodendrocitos, lo que resulta en degeneración walleriana y degeneración axonal; además de estar presente en todo momento la inflamación, por último en esta etapa comienza el proceso de la formación de una cicatriz glial debido a que los astrocitos se

activan y empiezan a secretar proteoglicanos de sulfato de condroitina, los cuales al empezar a formar la cicatriz van a impedir el crecimiento axonal y reorganización sináptica (10). Figura 1.4

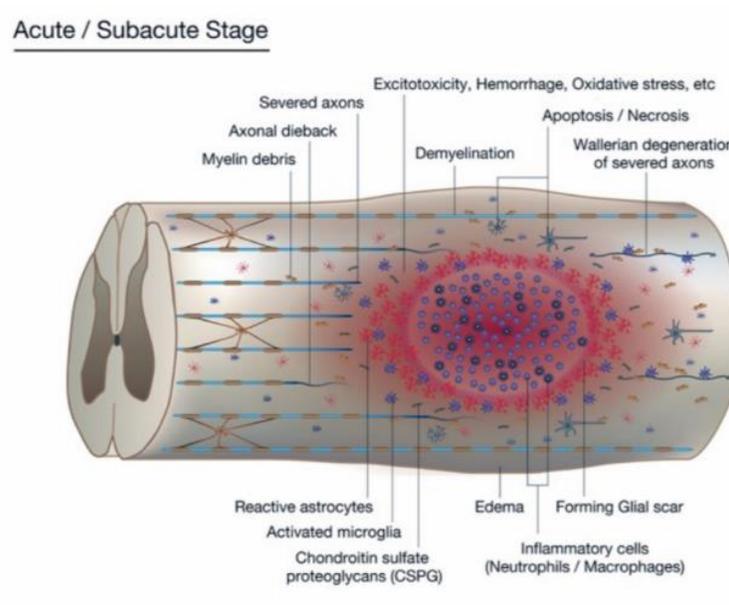


Figura 1.4 Fisiopatología alrededor del sitio de lesión en etapa aguda/subaguda.

Posteriormente en etapa crónica (daño secundario) ya se ha generado una cavidad “hueco” en el epicentro de la lesión que se encuentra rodeada de la cicatriz glial completamente ya formada. Como se mencionó anteriormente los astrocitos son los encargados de formar esta cicatriz glial que impide la regeneración de los axones, por otro lado aún en esta etapa la inflamación sigue presente en el sitio de lesión (9,10).

La desmielinización de los axones y la proliferación de estas células gliales forman un microambiente que no es propicio para la regeneración nerviosa, por lo cual la formación de esta cicatriz glial se considera como la principal causa de que los axones que se encuentran en el área lesionada no puedan crecer nuevamente (11). Además, la formación de esta cicatriz alrededor de la lesión;

tanto aísla y protege al tejido dañado, pero también obstaculiza la regeneración nerviosa (12). Figura 1.5

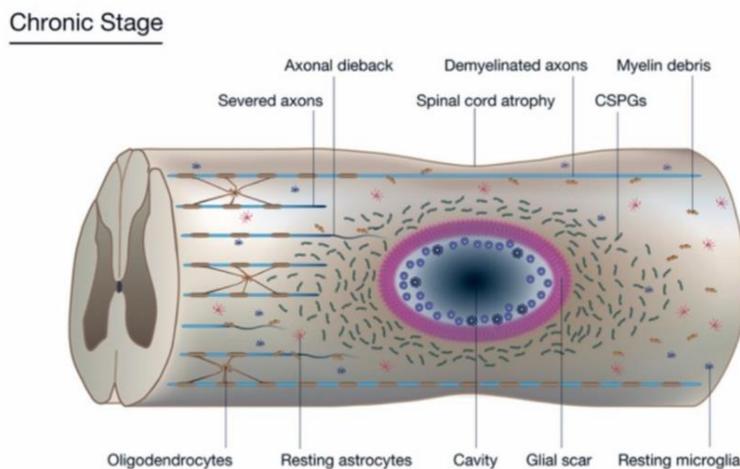


Figura 1.5 Fisiopatología alrededor del sitio de lesión en etapa crónica.

### 1.3. Estrategias terapéuticas en lesión de médula espinal

Actualmente no hay alguna estrategia terapéutica eficaz para la lesión de médula espinal (LME) debido a los diversos mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan tras la lesión, sin embargo, se han realizado varios tratamientos/estrategias para poder detener estos daños que afectan a las personas que presentan este padecimiento, y así poder ofrecerles una mejor calidad y esperanza de vida.

Entre algunos de ellos se encuentran los tratamientos de soporte y estabilización espinal donde se logra descomprimir la médula espinal y estabilizar las vértebras, pero esto sólo ayuda a que se minimice el efecto de la lesión ya que casi todos los individuos reciben metil-prednisolona como antiinflamatorio (7). Este esteroide se ha propuesto debido a que inhibe la

peroxidación de lípidos y de citoquinas inflamatorias, pero de acuerdo con estudios realizados tiene efectos muy limitados en los pacientes ya que no ha demostrado alguna recuperación neurológica o funcional y además el uso de una alta dosis de metil-prednisolona con lleva a diversos efectos adversos ya que aumenta el riesgo de infecciones, neumonía severa, sepsis, así como hemorragia gastrointestinal etc. Debido a lo anterior recientemente ya no se recomienda el uso de metil-prednisolona en la lesión de médula espinal (13) (14). Además, en gangliósidos, como el monosialotetrahexosilgangliósido GM-1 (Sygen) no se ha reportado alguna recuperación motora o sensitiva en pacientes que recibieron tanto baja y alta dosis de éste, por lo que los tratamientos farmacológicos aún no han podido demostrar que cambien de forma significativa el pronóstico neurológico de pacientes con LME (13,14).

Por otro lado, la minociclina, un antibiótico con efecto neuroprotector y propiedades antiinflamatorias el cual es utilizado en diversas enfermedades neurodegenerativas ha demostrado reducción de la inflamación en la zona de lesión, con mejoría en la función motora en pacientes con LME en etapa aguda y a nivel cervical, pero sin demostrar beneficios en un nivel torácico (15).

Riluzode, es un fármaco que además de tener un efecto neuroprotector, previene la estimulación de receptores de glutamato mediante el bloqueo de los canales de sodio reduciendo así la excitotoxicidad. Se han mostrado buenos resultados del riluzode en enfermedades como Esclerosis lateral, Parkinson, Huntington y Alzheimer. En estudios preclínicos se ha mostrado que este tratamiento reduce la espasticidad, así como promueve la preservación neuronal en ratas con lesión de médula espinal por hemisección a nivel cervical (16). Pero en estudios clínicos sólo ha demostrado una mejora en el puntaje motriz en pacientes con lesión incompleta a nivel cervical y no en pacientes con una lesión a nivel torácico (14).

Otras estrategias han sido las terapias de rehabilitación mediante la estimulación eléctrica, tratando de mejorar la conductividad de la zona a través de la reactivación de los nervios, pero esta sólo ayuda a los sujetos lesionados a recuperar algunas funciones motoras, también sólo han ayudado a la

disminución de ciertas complicaciones medicas tales como trombosis venosa, osteoporosis, fracturas de los huesos y fortalecimiento de extremidades. Por otro lado, ejercicios del piso pélvico o la musculatura abdominal han sido indicados en pacientes con lesiones medulares parciales y han demostrado una alta mortalidad (17-19).

Por último, ha surgido un interés en la ingeniería de tejidos (IT) la cual tiene como objetivo reparar o regenerar tejido lesionado, reactivando las funciones, implantando células o biomateriales en la zona de la lesión para así lograr nuevamente una comunicación neuronal y regeneración del tejido perdido. Aunque no ha sido una tarea fácil ya que el dispositivo de IT debe cumplir con regenerar el tejido de acuerdo con su función, inhibir la respuesta inmune e inhibir una cicatrización.

Se han probado materiales con la intención de proveer estructuras donde las células crezcan para unir los dos extremos de la médula espinal seccionados, estimulando el crecimiento axonal o celular en combinación con células del propio cuerpo y otros con el fin de responder a impulsos iónicos de las neuronas (20-23).

Una de las estrategias que se lleva a cabo en ingeniería de tejidos es la fabricación de andamios (scaffolds) que funcionen como una matriz extracelular (MEC) temporal que proporcione una estructura que ofrezca a células dañadas un soporte que facilite la regeneración neural; permitiendo así el crecimiento y diferenciación celular. Estos andamios además pueden actuar como un vehículo para entregar células, biomoléculas o nutrientes que modifiquen favorablemente el microambiente lesionado (15). Además, deben cumplir con diferentes características como poseer una porosidad, permeabilidad, topografía superficial adecuada, buena compatibilidad, así como su tasa de degradación debe coordinarse con la tasa de regeneración de axones. Las diferentes consideraciones ya mencionadas anteriormente que se deben seguir para la creación de andamios (scaffolds) implantables y así tratar la LME, son importantes ya que permitirán crear un microambiente permisivo para la regeneración axonal.

## 1.4. Polímeros en aplicaciones biomédicas

Los biomateriales son materiales diseñados para que tengan la capacidad de interactuar con sistemas biológicos y así puedan ayudar a los procesos de reparación y regeneración. Estos se han usado en diferentes aplicaciones terapéuticas desde las aplicaciones en liberación controlada de fármacos, así como también en la ingeniería de tejidos (24).

Los polímeros utilizados para la preparación de biomateriales se dividen en dos categorías: naturales y sintéticos o una combinación de ellos. Los naturales son polimerizados en seres vivos, como por ejemplo animales, plantas, microorganismos u hongos y posteriormente aislados para su uso. Estos tienen la ventaja de poseer una alta biocompatibilidad, una buena reacción inmune, funcionalidad y durabilidad. Sin embargo, tienen algunas limitaciones en su aplicación debido a su rápida degradación, incluyendo también su baja propiedad mecánica y alto riesgo de contaminación con especies microbianas como bacterias y hongos. La síntesis a gran escala de polímeros naturales también es otro objetivo difícil, así como la personalización de sus propiedades (25). Entre los principales polímeros naturales se encuentran el colágeno, queratina, almidón, celulosa, quitosano, ácido hialurónico, alginato etc.

Por otro lado, los polímeros sintéticos son materiales más versátiles, muchos de ellos son biodegradables ya que pueden descomponerse a medida que avanza la regeneración del tejido. Algunas de sus aplicaciones se encuentran en lentes de contacto, materiales odontológicos, vehículos farmacéuticos o como sustratos para ingeniería de tejidos (26). Además, tienen mejores propiedades mecánicas en comparación con los polímeros naturales (27). Por mencionar algunos polímeros sintéticos tenemos al poliácido-láctico (PLA), alcohol polivinílico (PVA), policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), estos son los más estudiados debido a su potencial en aplicaciones biomédicas. Los polímeros naturales y sintéticos se pueden preparar de diferentes formas: películas, andamios 3D, hidrogeles e implantes impresos en 3D (28-32).

El PLA es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en el área de ingeniería de tejidos, debido a que se degrada hidrolíticamente en ácido láctico, un subproducto metabólico, que se elimina mediante el metabolismo celular normal y por su alta citocompatibilidad lo hacen que sea adecuado para aplicaciones médicas. Pero no sólo por estas propiedades sino también por la quiralidad del ácido láctico (ácido L- y D-láctico) ya que se puede sintetizar el PLA con diferentes estereoregularidades (diferentes propiedades mecánicas, térmicas, tasa de degradación etc.) (33-34). El PLA es sintetizado por polimerización con apertura de anillo o policondensación del ácido láctico (35). Tiene en su estructura química moléculas de ácido láctico unidos por enlaces éster (36), tal como se observa en la Figura 1.6

El PLA es uno de los polímeros biodegradables más versátiles dada su biodegradabilidad inherente, biocompatibilidad, alta resistencia mecánica y módulo de Young al compararlo con materiales como el polietileno y poliestireno. Dado sus atributos se usa en industrias biomédicas y farmacéuticas como material implantable reabsorbible, cierre de heridas, dispositivos de fijación ósea y como vehículo para la administración controlada de fármacos (32,37).

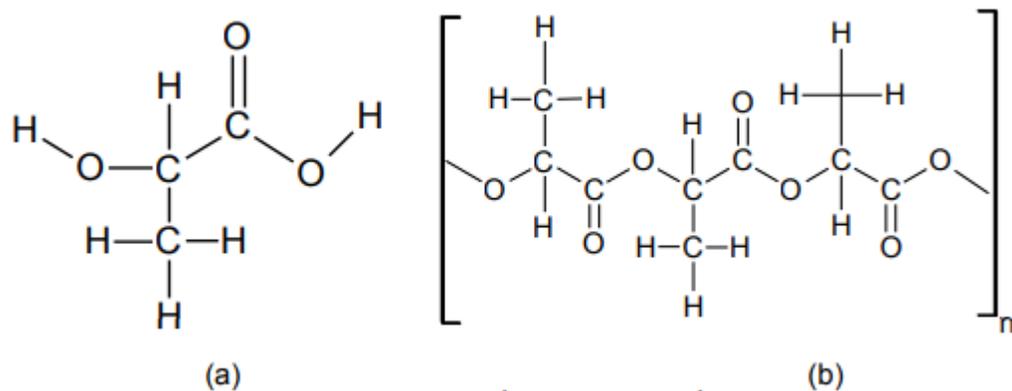


Figura 1.6 (a) Estructura química del ácido láctico y (b) poli- ácido láctico.

Se ha reportado que por la técnica de electrohilado se pueden obtener andamios nanofibrosos de PLA para mantener o mejorar la función de algunos tejidos dañados debido a la morfología tridimensional que favorece la unión celular, la administración de fármacos y una mejora en el proceso de

biofuncionalización. Cuando se implanta en el cuerpo humano puede degradarse en un tiempo de 6 meses a 2 años (37-41). Sin embargo, se están conjugando sus propiedades con otros polímeros para mejorar sus propiedades mecánicas, resistencia a la compresión y tracción, aumentar la conductividad eléctrica, aumentar la adherencia de células, etc (33).

También se han fabricado andamios de PLA generados a partir de la técnica de impresión 3D, en donde se reportó que estos andamios no son citotóxicos, ni generaron muerte celular. De acuerdo a pruebas de viabilidad celular se obtuvo que el PLA no disminuye la viabilidad sino que ofrece un beneficio al cultivo neural; siendo andamios de 500 $\mu$ m quienes mostraron mejores ventajas en cuanto a proliferación celular, por lo cual se puede decir que el tamaño de poro del andamio juega un papel importante en la viabilidad y proliferación celular. Por lo tanto el PLA, puede llegar a ser un buen candidato para la terapia de lesión de médula espinal (LME) (42).

Por otro lado, el polipirrol (PPy) es un polímero que está formado de heterociclos de pirrol (Py), Figura 1.7; en su estructura química tiene anillos de cinco miembros con heteroátomos de nitrógeno y se le considera un material biocompatible. El PPy es uno de los polímeros semiconductores más estudiados en el área biológica porque favorece la adhesión y crecimiento de diferentes tipos de células; también posee una buena biocompatibilidad, estabilidad térmica, fácil síntesis y alta conductividad en comparación de otros materiales. Una de las desventajas que presenta es su insolubilidad (hidrofobicidad) lo que restringe su procesamiento y su aplicación en otras áreas, sin embargo, se ha llegado a introducir la propiedad de degradación al combinar PPy con otros polímeros degradables como el PLA (43-49).

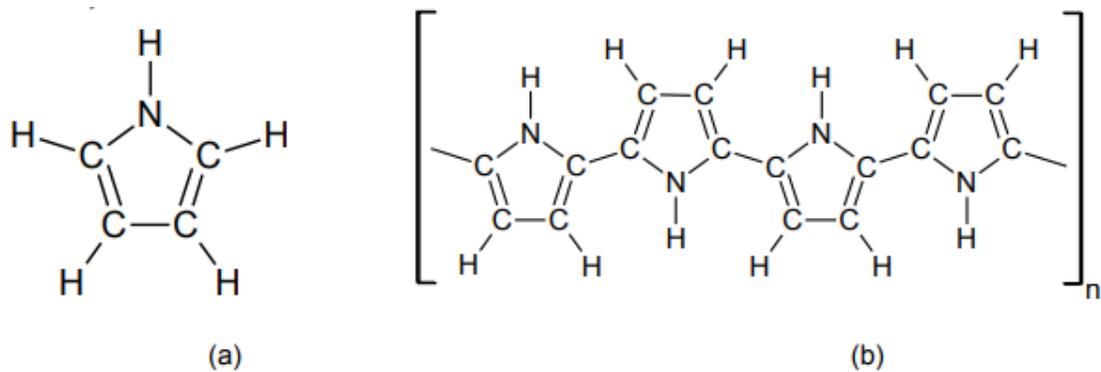


Figura 1.7 (a) Estructura química del pirrol y (b) polipirrol (PPy).

Se han analizado propiedades como biocompatibilidad y eficiencia para reparación de nervios mediante nanofibras de PLA/PPy. Para esto se sintetizó PPy mediante oxidación química obteniendo partículas esféricas para así posteriormente, dispersarlas en nanofibras electrohiladas de PLA. En este estudio *in vitro*, se encontró que hubo una buena biocompatibilidad entre el andamio y células, donde gracias al PPy la conductividad aumentó. Por lo tanto, se demostró que los andamios son capaces de controlar la orientación de las células “guía”, y la topografía de la superficie es de gran importancia para la interacción entre el biomaterial y las células (50,51).

Asimismo, se realizó un estudio *in vivo* e *in vitro* para la evaluación de la textura y propiedades biológicas de fibras porosas estructuradas obtenidas por electrohilado de PLA e hidroxiapatita (HA) con y sin recubrimiento de PPy con yodo sintetizado por plasma para la reconstrucción de tejido óseo, donde se reportó que las fibras recubiertas con PPy/I favorecieron e incrementaron la adhesión y proliferación celular para ser usadas en la médula ósea como fibras en comparación a las no recubiertas (52).

En 2019, se implantaron andamios electrohilados de PLA y PLA+PPy en un modelo *in vivo* de lesión de médula espinal (LME), donde se comprobó que andamio de PLA+PPy ayudó a disminuir el daño tisular al reducir la apoptosis y autofagia en las células neurales en comparación del andamio de PLA. Mediante marcadores inmunofluorescentes (GFAP y NF200) se observó que hubo una reducción de la activación de astrocitos y se aumentó la regeneración axonal en andamio de PLA+PPy. Además con evaluación funcional, Basso-Beattie-

Bresnahan (BBB) realizada por 6 semanas, se observó que hubo un mayor recuperación motora en animales con andamio de PLA+PPy a partir de semana 4 con un puntaje alrededor de 4, sin embargo, grupo control (lesión sin andamios) y grupo con andamio de PLA sólo se mantuvieron en un puntaje por debajo de 3. Por lo que se concluyó que el andamio electrohilado de PLA+PPy podría mejorar la relación superficie-volumen para promover la unión celular en el sitio de lesión además al ser un andamio conductor este es beneficioso para el microambiente y regeneración del tejido nervioso en una LME (53).

Además otra investigación uso andamios de PPy/PLA y PPy/PLA+ BMSCs (células del estroma de la médula ósea) en LME, donde pruebas de electrofisiología y función locomotora (BBB) con 6 semanas de evaluación (puntaje de 5.4) sugirieron que andamio de PPy/PL con BMSCs podría promover la recuperación funcional de la médula espinal. El buen puntaje en BBB sugirió que el andamio podría estar llenando el sitio de la lesión reduciendo la formación de cicatrices lo cual beneficia la regeneración axonal y la remielinización, ya que aunque el PLA podría estar promoviendo la regeneración pero su velocidad de conducción es baja, por lo que el PPy puede estar activando los canales iónicos de las membranas celulares. También se encontró que seis semanas después de la lesión hubo una menor cantidad de tejido cicatricial con el andamio de PPy/PLA en comparación con grupo control (lesión pero sin andamios). Abundante neurofilamento(NF) y marcador neuroespecífico (NeuN) positivo, y formaciones de mielina fueron detectados en el área lesionada. Además, el trasplante de BMSCs no solo mejoró la eficacia del PPy/PLA sino también logró una diferenciación de células neurales y neurogliales. Por lo tanto el andamio de PPy/PLA+BMSCs tiene un gran potencial para restaurar la conducción eléctrica y promover la recuperación funcional inhibiendo la formación de tejido cicatricial, promoviendo la regeneración de axones y puenteando la lesión (54).

Adicionalmente, en otro estudio pero usando andamios de colágeno/quitosano y colágeno/quitosano+bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) en un modelo por sección completa de LME en ratas, se encontró en evaluación funcional (BBB) que el andamio de colágeno/quitosano+bFGF demostró en ratas, una mayor recuperación de la función locomotora con una puntuación

aproximada a 10 durante 8 semanas de evaluación. Además se realizó DTI para evaluar la reparación de axones por tractografía con tensor de difusión (DTT), anisotropía fraccional (FA) y coeficiente de difusión aparente (ADC), una medida numérica de la materia blanca. Paralelamente a la recuperación de la función locomotora, el andamio de colágeno/quitosona+bFGF podría promover significativamente la regeneración de tractos de fibras nerviosas según los coeficientes de resonancia magnética nuclear (RMN) y tinción de inmunofluorescencia. En consecuencia, este andamio sugiere que da un microambiente favorable para la regeneración de tractos nerviosos y mejora la función locomotora, igualmente DTI es un método no invasivo efectivo para el diagnóstico y predicción del grado de recuperación después de una LME, teniendo una aplicación importante en la clínica para la predicción y reparación de una LME (55).

### **1.5. Polipirrol dopado con yodo en lesión de médula espinal**

Diversas investigaciones han utilizado el polipirrol (PPy) debido a que es un polímero estable, biocompatible e inerte en sistemas biológicos, además de poseer la gran capacidad de favorecer la adhesión y crecimiento celular. Debido a sus características químicas como la presencia de grupos amino heteroaromáticos y grupos nitrilo éste favorece la neuroprotección ante una lesión del Sistema Nervioso Central (SNC).

En lesión de médula espinal (LME), el polipirrol dopado con yodo (PPy/I) sintetizado por plasma ha sido empleado como implante en forma de pastilla, en una lesión por sección completa en ratas, donde conforme a resultados por imágenes por resonancia magnética y tomografía axial computarizada, el implante polimérico tuvo una mayor integración al tejido y preservación de la arquitectura respecto a grupo control (sin implante) (56).

Por otro lado, también usando el PPy sintetizado por plasma (en pastilla) y en una lesión por sección completa, de acuerdo a resultados el dispositivo implantado se integró mejor al tejido nervioso, reduciendo la respuesta inflamatoria y favoreciendo la recuperación funcional en animales a los que se

les implantó, en comparación con aquellos que recibieron el polímero sintetizado pero por métodos químicos y electroquímicos (57).

Además de lo anteriormente mencionado, se han hecho otras pruebas con variantes como forma de aplicación (pastilla o partículas), tipo de lesión (sección completa o por contusión) y sujetos de experimentación (ratas y primates no humano). Se ha demostrado que al utilizar polipirrol dopado con yodo (PPy/I) tanto en pastilla o partículas, la recuperación motora después de una LME por sección completa, en ratas, fue mayor respecto a otros polímeros sintetizados por plasma, así como también hubo una menor destrucción del tejido. Un factor importante que explique este fenómeno podría ser el dopante ya que produce que haya una mayor conductibilidad en el polímero y así mejorar sus propiedades fisicoquímicas para la adhesión celular. Por otro lado, mediante imágenes por resonancia magnética por difusión con parámetros de fracción de anisotropía (FA) y coeficiente de difusión aparente (ADC) se ha logrado identificar que la FA disminuye, y el ADC incrementa después de una lesión por contusión. Los resultados sugirieron que PPy/I es neuroprotector, ya que reduce la cantidad de tejido dañado y mejora la función motora, además de demostrar que la FA y el ADC son útiles como biomarcadores no invasivos después de una LME (58-60).

El usar partículas de PPy/I sintetizadas por plasma ha demostrado efectos neuroprotectores que favorecen la recuperación de la función motora en animales experimentales con LME. Sin embargo, su capacidad para migrar en el tejido hizo que se probara un vehículo en suspensión que permitiera la concentración de partículas en el sitio de la lesión. Pruebas in vivo demostraron que estas partículas no representaron riesgo para el desempeño de las funciones motoras en tejido sano, donde mediante el uso de imágenes por resonancia magnética (IRM) permitieron identificar las zonas en las que se extendió el daño posteriormente a una LME por contusión, sin embargo, no fue posible diferenciar entre la zona formada únicamente por quistes y aquellas en las que estuviera aglomerado el polímero; a pesar de ello fue posible observar que el tratamiento combinado de partículas de PPy/I sintetizadas por plasma suspendidas en una solución de la proteína (albumina) generó zonas con una

menor extensión de tejido dañado en relación con las que no recibieron tratamiento, esto se debe a las propiedades de la albumina ya que presenta diversas funciones importantes en el cuerpo, contribuyendo como reserva de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas, presenta capacidad de unión a una gran variedad de moléculas, y es la principal acarreadora de ácidos grasos además de su gran capacidad para disminuir efectos tóxicos al organismo (61).

Otro estudio mostró la viabilidad del uso de partículas de PPy/I sintetizadas por plasma (sin proteína albumina) como tratamiento en una LME en etapa crónica, en el cual se determinó que el uso de estudios por resonancia magnética permiten establecer el efecto longitudinal del polímero después de la lesión. Se obtuvieron datos cuantitativos tales como la FA y ADC, donde FA disminuyó y ADC incrementó después de la lesión, pero después de que se implantaron las partículas éstos parámetros cambiaron, FA aumentó y ADC disminuyó, lo cual sugirió que hubo una reestructuración del tejido nervioso gracias al implante. También se encontraron diferencias significativas entre las medias para FA y BBB (evaluación funcional cualitativa), evidenciando una mejor recuperación después de la LME para el grupo con el implante respecto al grupo control (sin implante), donde el grupo con implante obtuvo una puntuación BBB alrededor de 11 (62).

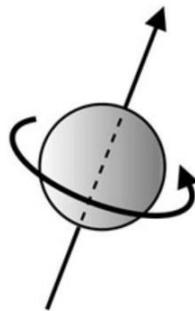
## 1.6. Imagenología por Resonancia Magnética

La Imagenología por Resonancia Magnética se basa en la interacción de los núcleos de Hidrógeno con un campo magnético externo ( $\beta_0$ ). Esta interacción provoca una frecuencia de precesión sobre los núcleos de Hidrógeno dependiente de la magnitud del campo magnético externo conocida como Frecuencia de Larmour.

$$\omega = \gamma\beta_0$$

Donde  $\gamma$  es la constante giromagnética, y es una constante específica para cada núcleo.

Cuando los núcleos se encuentran en ausencia de un campo magnético estos giran alrededor de su eje en direcciones aleatorias. Figura 1.8



*Figura 1.8 Núcleo en ausencia de un campo magnético, gira alrededor de su eje en direcciones aleatorias.*

Sin embargo, cuando son sometidos a un campo magnético externo ( $\beta_0$ ) los núcleos se alinean en forma paralela al campo magnético ya sea de forma paralela también conocida como de baja energía o antiparalelamente también conocida como estado de alta energía. La aplicación de una señal de radiofrecuencia (RF) da como resultado la absorción de energía de los núcleos atómicos cambiando así la dirección del dipolo magnético y su precesión a un plano transversal al eje del campo magnético ( $\beta_0$ ). Esta magnetización es la que da lugar a la señal de resonancia magnética. Cuando se quita la RF, la señal de resonancia magnética desaparece reduciendo la magnetización transversal y volviéndose a alinear con el campo magnético causando así la relajación longitudinal (T1) y la relajación transversal (T2) (63,64). Figura 1.9

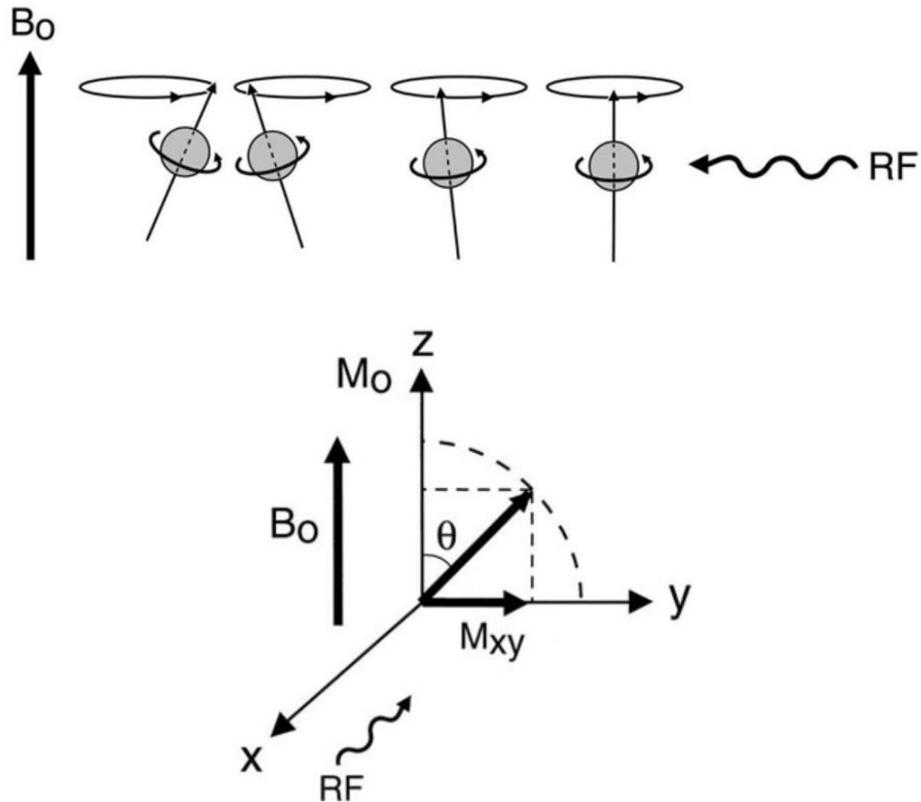


Figura 1.9 En presencia de un campo magnético los núcleos se alinean de forma paralela al campo magnético  $\beta_0$  cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia (RF) cambia la dirección de la magnetización a un plano transversal al campo magnético.

Los núcleos atómicos emiten energía a la frecuencia de Larmor. Entonces si se coloca una bobina receptora se podrá inducir un voltaje durante la precesión de los núcleos atómicos. Esta tensión inducida es conocida como “decaimiento de inducción libre” (FID). Esto es debido a que después de quitar la RF los espines comienzan a precesar libremente, además la señal comienza a decaer con el tiempo y porque los espines inducen una corriente en la bobina receptora (64). Figura 1.10

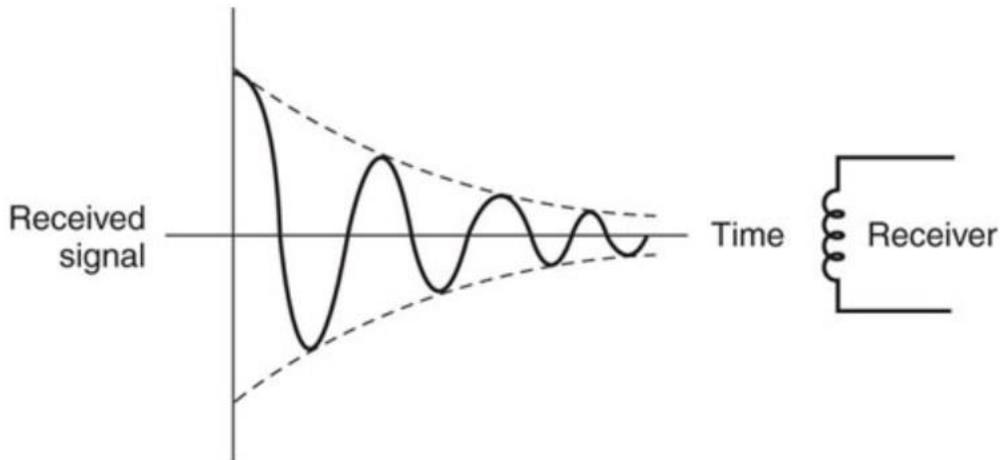


Figura 1.10 Forma de onda sinusoidal decreciente de la señal recibida (caída de inducción libre [FID]).

Tal como se mencionó anteriormente existen dos tipos de relajación; la primera de ellas es la longitudinal, esta se refiere al tiempo en que tardan los núcleos en devolver la energía que obtuvieron del pulso de RF a su alrededor en lo que regresan a alinearse al campo externo, este tipo de relajación es medida por la constante de tiempo  $T_1$ . Figura 1.11

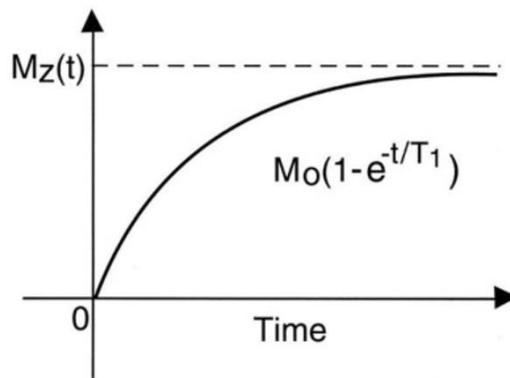


Figura 1.11 Relajación longitudinal  $T_1$ .

Por otro lado, la energía puede ser redistribuida en los núcleos sin desprenderse de ella, generando así una deslinealización transversal al campo externo, la cual es la relajación transversal, medida por una constante de tiempo  $T_2$  (64). Figura 1.12

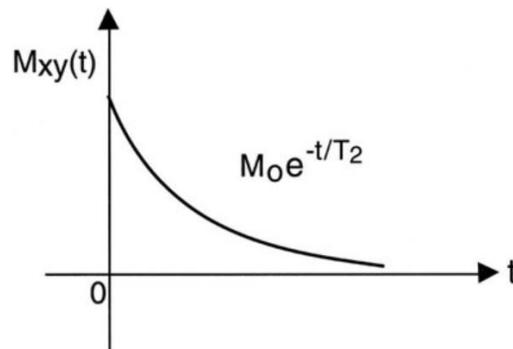


Figura 1.12 Relajación transversal  $T_2$ .

Adicionalmente el campo magnético se hace dependiente espacialmente a través de la aplicación de gradientes de campo magnético. Estos gradientes son pequeñas perturbaciones superpuestas al campo magnético, junto con los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  que son la base para el contraste de los diversos tejidos en la formación de imágenes (64).

Además de la obtención de imágenes por resonancia magnética existen otras técnicas avanzadas que proporcionan información complementaria a las imágenes anatómicas. Entre algunas de ellas están la difusión, perfusión y la espectroscopía por resonancia magnética (ERM).

### 1.6.1. Difusión por Resonancia Magnética

La difusión por resonancia magnética es una técnica avanzada de resonancia magnética, no invasiva, la cual permite la evaluación in vivo del movimiento de las moléculas de agua en los tejidos.

Esta técnica se basa en un tensor de difusión el cual se puede ver como un elipsoide de difusión, es decir, una superficie que describe el desplazamiento de las moléculas en múltiples direcciones dentro de un espacio tridimensional. La difusión del agua tiene las propiedades del movimiento Browniano, cuando no es contenida tiende a moverse de forma equitativa en todas direcciones, por lo tanto, es isotrópico. Pero cuando las mismas moléculas de agua se colocan en un sitio estructurado, adquieren la forma y movimiento de éste teniendo así un movimiento anisotrópico. Las difusiones en los tres principales ejes son definidas por eigenvectores, donde  $\lambda_1$  representa la dirección y magnitud de la difusión longitudinal, mientras que  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$  representan a los vectores alojados en los ejes restantes. Figura 1.13

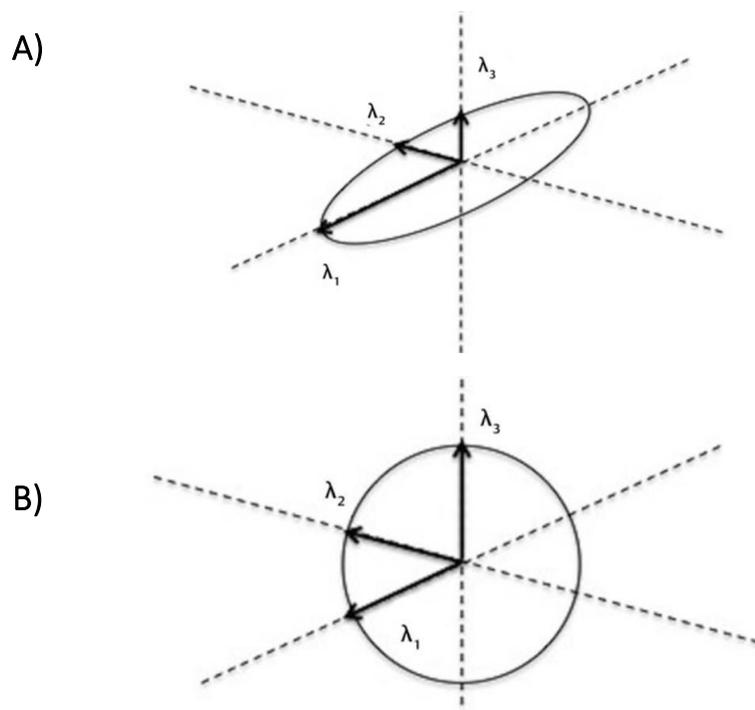


Figura 1.13 A) Movimiento anisotrópico, B) Movimiento isotrópico.

La difusión del agua en el cerebro es anisotrópica, lo que significa que las moléculas de agua se mueven paralelamente a las fibras de mielina y axones. Cuanto más alargado es el elipsoide, más alta es la anisotropía en el vóxel. El modelo tensorial se adopta para describir esta anisotropía de difusión y permite cuantificar los parámetros de anisotropía (relacionados con la integridad de la materia blanca) y reconstruir así la trayectoria de las fibras de materia blanca (tractografía). La difusión del agua está fuertemente restringida por la microestructura del tejido cerebral, y esta restricción es mayor cuando ocurre perpendicularmente a las fibras de materia blanca (anisotropía de difusión). Esta restricción a la difusión del agua tiene dos consecuencias importantes en primer lugar, cualquier cambio a nivel de citoarquitectura se reflejará en el DWI, lo que hace que este método sea extremadamente sensible a los cambios patológicos; y, en segundo lugar, basándose en la orientación de la difusión en un determinado vóxel, se pueden reproducir las trayectorias de las fibras de materia blanca (65).

Por otro lado, para que un tensor pueda ser reconstruido se requieren, al menos, seis direcciones de difusión no colineales. En el modelo tensorial, el ADC se mide en las tres direcciones perpendiculares x, y, z, y en todas sus combinaciones y en lugar de referirse a un ADC simple, se refiere al tensor de difusión, tal como se muestra en la Figura 1.14

$$\overline{\text{ADC}} = \begin{bmatrix} \text{ADC}_{xx} & \text{ADC}_{xy} & \text{ADC}_{xz} \\ \text{ADC}_{yx} & \text{ADC}_{yy} & \text{ADC}_{yz} \\ \text{ADC}_{zx} & \text{ADC}_{zy} & \text{ADC}_{zz} \end{bmatrix}$$

*Figura 1.14 Modelo tensorial de difusión.*

Esta matriz se determina para cada vóxel de la imagen. Posteriormente, la matriz se diagonaliza donde por medio de un proceso matemático todos los elementos fuera del diagrama se vuelven cero y los elementos diagonales se transforman para coincidir con el eje principal de difusión en el vóxel. Los nuevos elementos diagonales corresponden a tres eigenvectores ( $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$  y  $\epsilon_3$ )

con sus eigenvalores ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ ), representando las principales direcciones de difusión y sus difusividades asociadas, respectivamente (65).

El primer valor de  $\lambda_1$  se conoce como difusión axial porque representa la difusión paralela a la fibra. En Figura 1.15 se muestra como se calcula la difusión radial la cual se refiere a la difusión perpendicular a la fibra, calculada como  $(\lambda_2 + \lambda_3) / 2$ . Estudios experimentales sugieren que la difusión axial se puede utilizar para evaluar la integridad del axón y que la difusión radial es más sensible a la integridad de la mielina. Sin embargo, se debe tener cuidado porque esta interpretación no siempre es sencilla (66-68).

$$RD = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2}$$

*Figura 1.15 Ecuación para el cálculo de la difusión radial.*

Mientras que el ADC o difusividad media (DM) es el promedio matemático de las difusividades en los tres ejes principales ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ ), tal como se observa en Figura 1.16 y su valor puede aumentar o disminuir en función de la progresión histopatológica de una lesión (68).

$$ADC \approx MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

*Figura 1.16 Ecuación para el cálculo de la difusividad media.*

Adicionalmente el índice de fracción de anisotropía (FA) se calcula tal como se observa en Figura 1.17, este puede variar de 0 a 1, donde tejidos con alta anisotropía, como los tractos de sustancia blanca, tendrán un valor más cercano a 1 y mientras el valor sea cercano a 0 indicará un movimiento isotrópico(68). De acuerdo con estudios previos la FA es una buena métrica para evaluar la integridad axonal en cualquier tipo de lesión del SNC (67,69-73).

$$FA = \frac{\sqrt{3 \left[ (\lambda_1 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle \lambda \rangle)^2 \right]}}{\sqrt{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\text{Tr(ADC)}}{3} = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

Figura 1.17 Ecuaciones para el cálculo del índice de FA.

### 1.6.2. Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM)

La espectroscopía por resonancia magnética (ERM) es una técnica avanzada basada en resonancia magnética (RM) que proporciona información bioquímica, metabólica y funcional en diferentes tipos de tejidos de forma no invasiva, así como in vivo.

A diferencia de otras técnicas avanzadas de RM, la espectroscopía proporciona información sobre el microambiente químico de los núcleos atómicos en una gran variedad de grupos funcionales. Esto permite la detección de cambios en la concentración de varios metabolitos para determinar ciertos cambios debido a procesos patológicos (64).

Los átomos están rodeados por electrones. Estas nubes de electrones a su vez generan pequeños campos magnéticos a su alrededor que blindan a los átomos de cualquier campo externo. Si la frecuencia de resonancia es proporcional al campo magnético al cual está expuesto el núcleo, esto implica que la frecuencia de resonancia va a estar determinada por el campo magnético externo más el pequeño campo generado por las nubes de electrones. Esta pequeña variación de la frecuencia debido a las nubes de electrones se denomina “*chemical shift*” o desplazamiento químico (74). En lugar de proporcionar imágenes, la

espectroscopía proporciona espectros que consisten en picos individuales, cuyo cambio químico ayuda a identificar las especies que componen el pico. El espectro tiene un sistema de dos ejes, que representan la intensidad de la señal (eje vertical) y la posición de la señal en la frecuencia (eje horizontal), expresado en partes por millón (ppm) (64,74) Figura 1.18

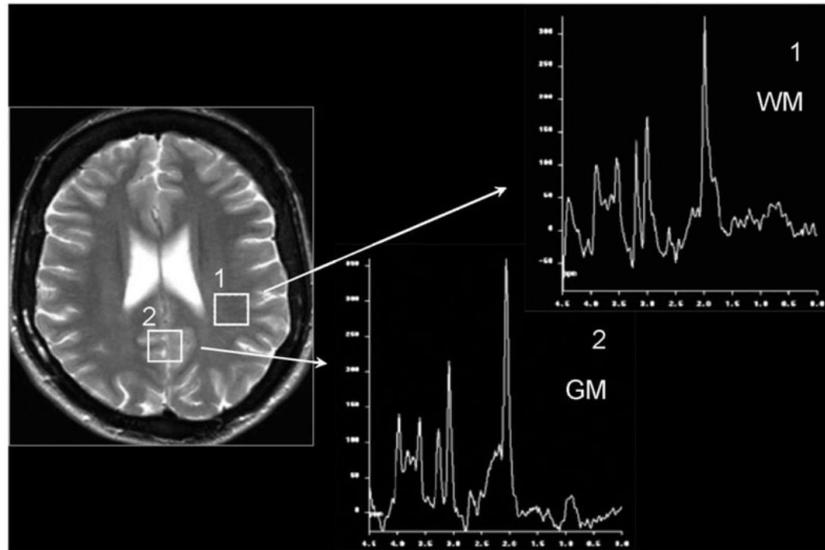


Figura 1.18 Espectros normales para materia blanca (WM) (1) y materia gris (GM) (2).

Tal como se mencionó anteriormente la ERM proporciona los patrones metabólicos en sus estados estables en diferentes tipos de tejido. Uno de los órganos más estudiados mediante ERM ha sido el cerebro, donde la espectroscopia de protones ( $^1\text{H}$ ) (o de núcleos de hidrógeno) y la de fósforo ( $^{31}\text{P}$ ) son de particular interés. La ERM de Hidrógeno es el método más aplicado clínicamente dado que la sensibilidad de RM es mucho más grande que para el fósforo permitiendo así una mejor resolución espacial, además por su gran abundancia en los tejidos vivos. Su desventaja principal es que la magnitud de la señal de los metabolitos es menor que la señal producida por el agua y también su dispersión química es pequeña, aproximadamente 10 ppm, por lo tanto, tiene que haber una buena homogenización del campo magnético (*shimming*) y suprimir la señal del agua para garantizar un buen resultado (74).

Debido a lo mencionado, antes de iniciar un proceso de adquisición de la información debe suprimirse la señal del agua mediante el uso de un pulso de saturación, conocido como CHESS (*chemical shift selective*), utilizando una frecuencia de banda estrecha centrada en la frecuencia de resonancia del agua o utilizando un pulso de inversión de 180 grados centrado en la resonancia del agua (75,76).

Hay dos secuencias que son utilizadas para excitar el volumen del tejido de interés: la primera es la secuencia PRESS (*Point Resolved Echo Spin Spectroscopy*) o simplemente Espín Eco, usa un tren de pulsos de 90-180-180 y detecta el siguiente espín eco en el segundo pulso de 180. La segunda es la secuencia STEAM (*Short Echo Stimulated Acquisition Mode*) la cual usa un tren de pulsos 90-90-90 y adquiere el siguiente eco estimulado en el último pulso de 90. Los espectros resultantes son muy similares entre los dos métodos, excepto que la técnica STEAM tiene un cociente señal a ruido intrínseco más bajo que la técnica PRESS en el mismo tiempo de eco (TE). Además, también se tiene que tomar en cuenta el método de la localización espacial del voxel de interés en la cual hay dos técnicas: voxel simple y voxel múltiple. Voxel simple estudia la adquisición del espectro de un solo volumen de tejido en una medición mientras que voxel múltiple estudia la adquisición de espectros de varios voxeles durante una sola medición (74).

Los principales metabolitos observados con tiempos de eco largos alrededor de (144- 288 ms) son el N-acetil-aspartato (NAA), Colina (Cho), Creatina (Cr), y Lactato (en situaciones patológicas), por otra parte, con tiempos de eco cortos (menores a 40 ms) además de los metabolitos antes mencionados se pueden observar metabolitos como el Glutamato (Glu), Glutamina (Glx) y Mioinositol (ml) (77)Figura 1.19

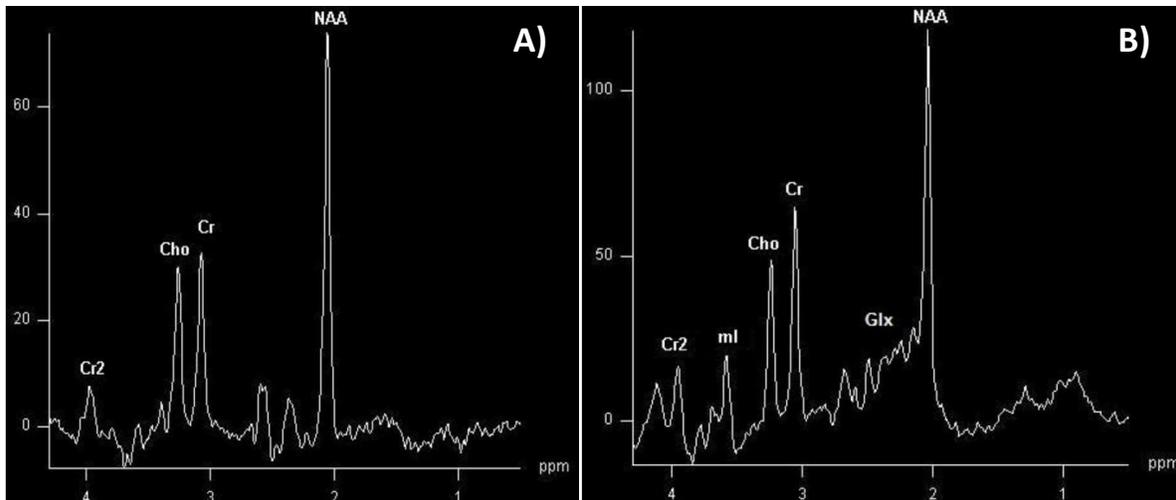


Figura 1.19 Espectro de sujeto sano. A) Se observan los picos de NAA, Cr y dos picos de Cho, B) Además de los metabolitos de NAA, Cr y Cho, se observan los metabolitos de ml y Glx.

Por mencionar algunos de los principales metabolitos en SNC, encontramos que el N-acetil-aspartato (NAA) es un marcador neuronal observado en 2.02 ppm, un decremento en este metabolito involucra una pérdida o daño neuronal y se puede ver en diferentes enfermedades neurodegenerativas tal como en neoplasias, epilepsia, esclerosis múltiple, hipoxia y demencia. La Colina (Cho) se detecta en 3.2 ppm, es fundamental para la síntesis del neurotransmisor acetil colina y de fosfatidilcolina, el principal constituyente de las membranas celulares. Los niveles de Cho reflejan el intercambio de membranas, la señal aumenta en casos de proliferación celular, como por ejemplo en tumores malignos. La Creatina total (Cr), así como la Fosfocreatina (PCr), es un marcador para la energía del metabolismo y mostrada en 3.0 ppm y 4.0 ppm. La Cr es usada como el estándar interno para normalizar las intensidades de resonancia de otros compuestos. Esta puede estar reducida en tumores con mayor actividad metabólica como los gliomas de alto grado. Por otro lado, el Lactato (Lac) es indicativo de isquemia o infiltración de células altamente glicolíticas como los macrófagos, no es visto en el espectro del cerebro en humanos sanos, sin embargo ha sido observado en quistes y tumores con composición quística o necrótica (77,78).

Además de poder analizar un aumento o disminución de los picos en los espectros de forma cualitativa hay otra técnica de cuantificación que permite

una evaluación más adecuada de los espectros y no sólo quedarse con una inspección visual. Este es el método de las razones entre metabolitos, donde las áreas en cada uno de los picos del espectro son reportadas como la razón entre estas y el área de un pico de referencia, por lo tanto se puede identificar anomalías metabólicas al encontrar variaciones entre las diferentes razones (79).

De acuerdo a éstas razones se ha encontrado que las razones de NAA/Cr y NAA/Cho han sido asociadas a viabilidad neuronal donde una disminución de éstos ha indicado daño neuronal (80,81). Adicionalmente en enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple, así como en neoplasias cerebrales el aumento en la razón Cho/Cr y Cho/NAA han indicado una degradación en la vaina de mielina y tumores con mayor densidad celular debido a la presencia de edema, respectivamente (82,83).

## 2. Justificación

La lesión de médula espinal (LME) es un trastorno del SNC que provoca daños progresivos e irreversibles en las funciones tanto motoras, sensitivas y autonómicas. Actualmente no existe algún tratamiento efectivo, por lo cual, es necesario seguir estudiando cada una de las formas de disminuir los padecimientos que esta con lleva, ya que será una manera de apoyar a este gran problema clínico.

Uno de los trabajos más recientes en la línea de trabajo de Ingeniería de Tejidos de la (UAM-I) demostró en estudio in vitro que andamios basados en PLA fabricados mediante electrohilado y modificados superficialmente con PPy/I, sintetizado por plasma, poseen las propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para el crecimiento de células neuronales, los cuales podrían funcionar como soporte en el proceso de reparación y regeneración de tejido neuronal (84).

Debido a su gran potencial se sugirió que éstos mismos andamios fueran usados en un modelo in vivo para el tratamiento de la lesión de médula espinal en fase aguda, ya que al proporcionar una forma tridimensional, los andamios podrían servir como matriz extracelular temporal y favorecer el anclaje de células, sinapsis y regeneración de tejido. Por lo que es primordial evaluar los efectos de los andamios en la zona de la lesión y así establecer la respuesta morfológica del tejido ante dicho implante.

Por lo tanto, el presente proyecto propone evaluar el efecto de andamios basados en PLA y PLA+PPy/I sintetizados por plasma en una lesión de médula espinal en etapa aguda, en sujetos de experimentación, ratas, por medio de imágenes de resonancia magnética (IRM) usando un escáner de 3 Teslas.

### 3. Hipótesis

Mediante la implementación de una prueba de viabilidad: utilizando IRM y prueba funcional (BBB), se podrá realizar seguimiento longitudinal al efecto de los andamios de PLA y PLA+PPy/I implantados en ratas con lesión de médula espinal.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo General

Proponer un protocolo para evaluar el efecto de los grupos con andamios de (PLA y PLA+PPy/I) así como grupo control en una lesión de médula espinal por sección completa, en fase aguda, en ratas, por medio de imágenes de resonancia magnética, empleando un escáner de 3 Teslas.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los andamios en la recuperación locomotora de ratas con lesión traumática de médula espinal en etapa aguda mediante la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan).
- Analizar la respuesta morfológica del tejido de la zona lesionada de las ratas del grupo control con lesión de médula vs grupo con lesión de médula más andamios por medio de imágenes de resonancia magnética.
- Analizar la evolución de la lesión mediante imágenes por tensor de difusión (DTI), tractografía, espectroscopía por resonancia magnética (ERM) así como con un análisis volumétrico.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Diseño Experimental

Estudio experimental, prospectivo y transversal. Se utilizaron 9 ratas sanas hembras de la cepa Wistar como sujetos de experimentación. Con edad de (8-9 semanas), y peso aproximadamente de 250-300 g.

Se hicieron 3 grupos aleatoriamente: grupo control, grupo con andamio PLA (poliácido láctico) y por último grupo con andamio PLA+PPy/I (poliácido láctico, recubierto de polipirrol dopado con yodo).

Grupos	
Control (n=3)	Ratas con modelo de lesión por sección completa (sin andamios).
PLA (n=3)	Ratas con modelo de lesión por sección completa y andamio de PLA.
PLA+PPy/I (n=3)	Ratas con modelo de lesión por sección completa y andamio de PLA+PPy/I.

*Tabla 5.1 Asignación aleatoria de los 3 grupos experimentales.*

#### Criterios de selección:

##### Criterios de inclusión

1. Ratas Wistar hembras sanas.
2. Ratas Wistar hembras con peso mayor a 250 gramos.

### Criterios de exclusión

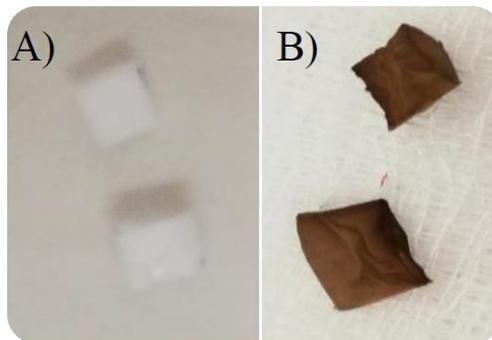
- 1- Ratas Wistar hembras que presenten alguna enfermedad antes del procedimiento quirúrgico.
- 2.- Ratas Wistar hembras que tengan un peso menor a 250 gramos.

### Ubicación del estudio:

La fase del experimento (cirugías para el implante de los andamios) se llevó a cabo en el quirófano experimental del Centro Nacional de Investigación en Instrumentación e Imagenología Médica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La adquisición de las imágenes de resonancia magnética fue a cargo de esta institución.

### Fabricación de andamios:

La fabricación de los andamios de PLA y PLA+PPy/I se llevo a cabo por y mediante el protocolo de Osorio,D. Los andamios de PLA se realizaron mediante la técnica de electrohilado y los andamios de PLA+PPy/I fueron recubiertos con PPy/I mediante la síntesis por plasma (84), Figura 5.1

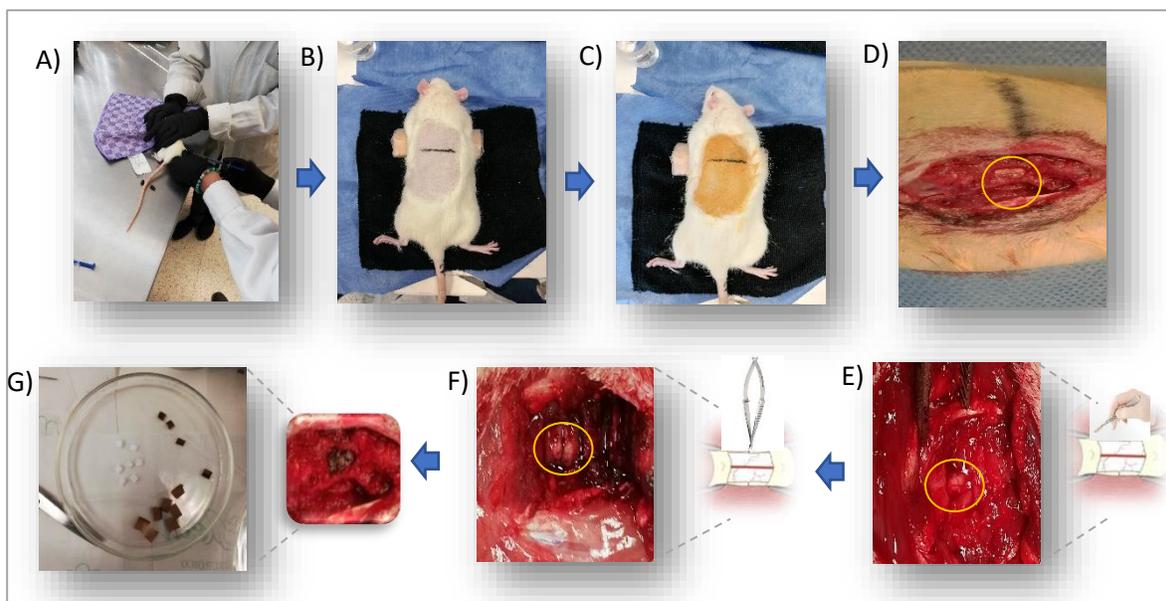


*Figura 5.1 Andamios. A) Andamios de PLA fabricados mediante la técnica de electrohilado. B) Andamios de PLA+PPy/I (andamios de PLA recubiertos por PPy/I sintetizados por plasma).*

## 5.2. Procedimiento Quirúrgico

A todas las ratas se les administró un sedante vía intramuscular (IM) con 0,1 ml de Xilacina (7-15 mg/kg), 5 minutos después se pesaron y de acuerdo con su peso se les administró un anestésico vía intramuscular (IM) 0,04 ml de Zoletil 50 (10-15 mg/kg) (85,86).

Antes de realizar incisión en la piel, se colocó una referencia a la altura de la novena vértebra torácica (T9) y se colocó solución antiséptica (yodo) en la zona para reducir microorganismos presentes en la piel y por lo tanto reducir el riesgo de alguna infección en la herida quirúrgica, a continuación se realizó una laminectomía para dejar expuesta la médula espinal (en la novena vértebra torácica T9). Con bisturí del número 3 se cortaron longitudinalmente las meninges, así a continuación se cortó completamente de forma transversal el tejido de la médula espinal. La transección se realizó hasta que quedará completamente separada, se verificó con un gancho microquirúrgico que no quedara alguna vía conectada. Posteriormente se insertaron los andamios en la zona lesionada ajustándolos a secciones de 3x3 mm, entre la cavidad de ambos lados de la sección transversal. Se colocó una lamina de PLA+PPy/I para cerrar meninges, finalmente músculo y piel fueron suturadas. Figura 5.2



*Figura 5.2 Laminectomía a nivel de novena vertebra torácica (T9). A) Aplicación de sedante y anestésico vía intramuscular (IM), B) y C) Localización de T9 y desinfección de piel, D) Laminectomía, E) Corte de meninges de forma longitudinal, F) Corte transversal en médula espinal, G) Colocación de andamios en ambos lados de la sección completa*

Se permitió que los sujetos de experimentación se recuperaran del anestésico para después suministrarles antibiótico 0,5 ml de enroflaxacina (Baytril) en bebedero, así como antiinflamatorio (5 ml de Paracetamol por cada 2 L de agua en bebedero) durante los primeros 5 días posteriores a la lesión.

Los primeros 7 días cada animal fue colocado en una caja individual dentro de un cuarto de alojamiento con temperatura promedio de 22°C (18-26°C), donde fueron alimentados con comida y agua ad libitum, manteniendo la temperatura corporal de cada rata de 35.9-38.2 °C (85). Se tuvieron los cuidados postoperatorios durante los primeros 30 días en observación diaria (día y noche) con la finalidad de realizar vaciado manual de vejiga hasta recuperar la autonomía. A lo largo de 8 semanas de evaluación también se les realizó estiramientos de extremidades, curaciones debido a irritación de la piel y a infecciones en herida.

### **5.3. Estudio de Imagenología por Resonancia Magnética**

Para los estudios de imagenología por resonancia magnética se utilizó el escáner Philips Achieva de 3 Teslas con antena neurovascular, ésta antena nos permitió adquirir imágenes de alta resolución, dicho resonador y antena se encuentran disponibles en las instalaciones del CI3M (Centro Nacional de Investigaciones en Instrumentación e Imagenología Médica) dentro de la UAM- Unidad Iztapalapa, tal como se muestra en la Figura 5.3.



*Figura 5.3 Escáner 3T Philips Achieva y antena neurovascular.*

Todas las ratas se sedaron nuevamente, se les cubrió las orejas con ayuda de unas gasas para evitar el estrés del ruido que genera el escáner, y finalmente se trató de inmovilizarlas para evitar movimientos durante la adquisición, Figura 5.4.



*Figura 5.4 Preparación de los sujetos de experimentación.*

Se adquirieron las imágenes por resonancia magnética una semana antes de la lesión, una semana después de la lesión, y cuatro semanas después de la lesión, a través de los parámetros:

- ✓ T1W.- Esta secuencia permitió obtener imágenes ponderadas en T1 de una forma relativamente rápida. Secuencia Gradient Echo, TE= 4.55 ms, TR= 9.84 ms, Slice Thickness= 0.4, Matriz= 1024x1024.

- ✓ T2W.- Esta secuencia permitió obtener rápidamente imágenes en alta calidad T2. Secuencia Spin Echo, TE= 80 ms, TR= 3000 ms, Slice Thickness= 2.0, Matriz= 512x512.
- ✓ EPI-DTI. - Técnica de muy rápida adquisición donde se generó una imagen a partir de un tensor de difusión. Con esta secuencia fue posible detectar cambios ocurridos en una fracción de segundo siendo menos sensible a artefactos de movimiento que otros métodos. Secuencia EPI, con 32 direcciones de muestreo, valor b= 800 s/mm<sup>2</sup>.
- ✓ Tractografía.- Mediante postprocesamiento, se reconstruyeron con una visión tridimensional los tractos nerviosos de la materia blanca en el sitio de la lesión.
- ✓ Análisis volumétrico.- Mediante postprocesamiento, se segmentó médula espinal (T8-T9) abarcando sitio de lesión para obtener variaciones volumétricas en el sitio de lesión de la médula espinal.
- ✓ Espectroscopía por resonancia magnética (ERM).- La localización del espectro se realizó en la consola del escáner, usando la técnica de voxel simple usando la secuencia PRESS (*point resolved spectroscopy*). Previamente se obtuvo una supresión del agua con la secuencia CHES (*chemical shift selective*) y se ajustó automáticamente el campo magnético a través del *shimming*. Este voxel se superpuso a imágenes en cortes coronales y sagitales; obtenidas por T1 y T2 para poder definir y marcar la lesión a estudiar.

#### **Análisis de datos obtenidos:**

- Una vez obtenidas las imágenes por resonancia magnética (IRM), las imágenes ponderadas en T1W y T2W fueron postprocesadas para obtener más información, segmentando la región correspondiente a la médula espinal, con las diferentes variaciones que sufrió cada uno de los sujetos, a lo largo del experimento. Se seleccionaron los vóxeles correspondientes entre las vértebras (T8-T10), dejando el epicentro de la lesión en el centro de la región seleccionada.
- Las imágenes ponderadas en difusión, se emplearon para la medición de los parámetros de FA, MD, AD y RD; se procesaron empleando el

software DSI studio (66). Se obtuvo la medición en la región de interés que abarcó el área de la zona con lesión (T8-T10) para cada secuencia en cada periodo de evaluación (antes de la lesión, una y cuatro semanas después de lesión).

- Se calculó el tensor de difusión mediante un algoritmo determinista de seguimiento de fibras, para estimar las trayectorias de las fibras de materia blanca. Usando como referencia fibras intactas (codificadas en color azul indicando una dirección rostro-caudal), se identificó el epicentro de la lesión y regiones caudal/rostral. Los umbrales de anisotropía y angular fueron de 0.25 y 25 grados respectivamente. Se descartaron los tractos con una longitud inferior a 10 y superior a 210 mm. Se límite a un total de 10,000 tractos.
- La segmentación para análisis volumétrico de la médula espinal se realizó mediante el software 3D Slicer.
- Se analizaron los espectros generados por la ERM, de acuerdo a amplitud y a la relación (ratios) entre metabolitos.

#### 5.4. Evaluación Funcional (BBB)

A cada una de las ratas se les realizó una evaluación funcional semanal durante 8 semanas, con dos evaluadores en ciego, midiéndose la recuperación de la función locomotora, bajo la escala de evaluación Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (87). Esta escala es no lineal y tiene 22 ponderaciones, donde el valor mínimo que se puede otorgar es 0, el cual indica la ausencia completa del movimiento en patas traseras. Conforme esta escala incrementa, comienza a indicar movimientos limitados en una o dos articulaciones (tobillo, rodilla o cadera) o movimientos más amplios en las 3 articulaciones que se analizan. Cuando se llega a valores superiores a 8 indica que ya hay colocación plantar sobre el suelo con soporte de peso y cada uno de los siguientes valores, indica mejor coordinación de los movimientos traseros con respecto a las patas delanteras. Al llegar a un puntaje de 14 se observa una mayor coordinación,

una estabilidad del tronco, una mayor separación y acomodo para los dedos de las patas traseras, así como levantamiento y posicionamiento de la cola. Finalmente, la última puntuación de 21 indica un movimiento normal durante la marcha en las patas traseras. La recuperación motora se evaluó en un campo abierto pero limitado, Figura 5.4, se registraron y analizaron videos de 4 minutos para cada sujeto. Se excluyó a todas aquellas ratas que tuvieran puntuaciones mayores a 1.5 en la escala BBB, después de 24 hrs; o mayores a 6 bajo esta misma escala, durante la primera semana de estudio.



*Figura 5.5 Evaluación BBB en campo abierto. A) Sujeto sin movimientos en extremidades traseras durante evaluación, B) Sujeto presentando pasos plantares con soporte de peso en extremidades traseras.*

Una vez concluido el protocolo todos los sujetos de experimentación que sobrevivieron fueron sometidos a eutanasia. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generaron fueron manejados conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (88). De igual forma todo el protocolo se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y las especificaciones de manejo de animales del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (85,88).

Todas las ratas que sirvieron de sujetos de experimentación fueron adquiridas en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa el cual se encarga de la producción, crianza, reproducción y mantenimiento de animales de laboratorio. Dicho espacio cumple con las condiciones y especificaciones técnicas señaladas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (89).

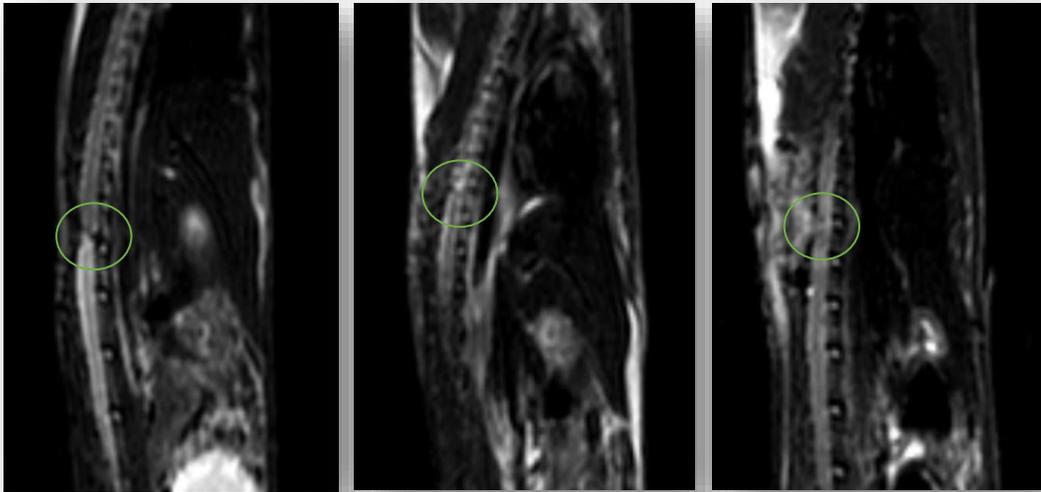
## 6. Resultados y Discusión

### 6.1. Resonancia Magnética

Se obtuvieron las imágenes de resonancia magnética de todos los sujetos de experimentación, en cada una de las semanas establecidas, una semana después de la lesión y cuatro semanas después de la lesión, las cuales permitieron observar cambios después de la lesión.

En la Figura 6.1 se muestra las imágenes sagitales, T2W, donde se realiza una comparación entre los 3 grupos de experimentación una semana después de la lesión.

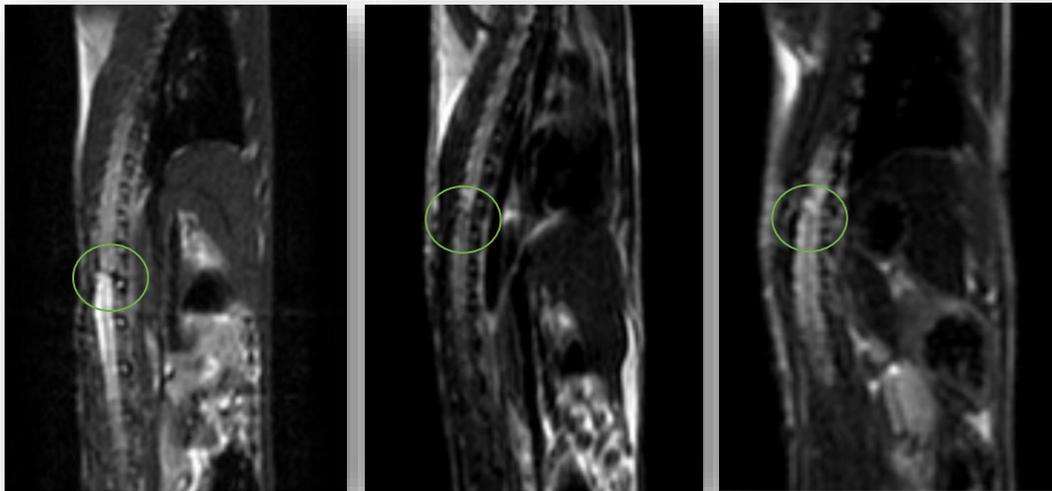
En sujeto del grupo control se puede observar una respuesta hipointensa en la región de interés (novena vertebra torácica) donde claramente se ve un espacio visible entre región rostral y caudal de la médula espinal, lo cual confirmaría que se llevo a cabo correctamente la lesión por sección completa, por otro lado, también en sujeto con andamio de PLA se aprecia un espacio entre ambas secciones de la médula, una pérdida de la arquitectura, así como una respuesta hiperintensa en la zona lesionada. Pero observando sujeto con andamio de PLA+PPy/I se puede observar una zona hipointensa en el centro de la médula y una mayor preservación de la arquitectura de la zona lesionada comparándolo con sujeto control y sujeto con andamio de PLA, sin embargo, hay presencia de vóxeles hiperintensos alrededor de la zona, lo cual podría sugerir presencia de edema alrededor de la zona.



*Figura 6.1 Imágenes sagitales de resonancia magnética, T2W, una semana después de la lesión. A) Rata del grupo control. B) Rata con andamio de PLA. C) Rata con andamio de PLA+PPy/I.*

En Figura 6.2 se muestra una comparativa en imágenes sagitales, T2W, entre sujetos de los 3 grupos experimentales cuatro semanas después la lesión.

En sujeto del grupo control se observa que continua el espacio entre región caudal y rostral, mostrando una respuesta hiperintensa en la región de interés, así como pérdida de la arquitectura en comparación de semana 1. Para sujeto con andamio de PLA se puede ver que aún muestra un claro espacio debido a la lesión y una ligera reducción en el diámetro del tejido en el epicentro de la lesión. Por el contrario, el sujeto con andamio de PLA+PPy/I muestra mayor preservación de la arquitectura en el epicentro de la lesión. Además al comparar entre semana 1 y semana 4 en imágenes sagitales, T2W, del sujeto con andamio de PLA+PPy/I se observa que los vóxeles hiperintensos alrededor de la zona lesionada, han disminuido, posiblemente debido a reducción de edema en la lesión.



*Figura 6.2 Imágenes sagitales de resonancia magnética, T2W, cuatro semanas después de la lesión. A) Rata del grupo control. B) Rata con andamio de PLA. C) Rata con andamio de PLA+PPy/I*

Por lo tanto, el protocolo que se utilizó para la adquisición de imágenes por resonancia magnética a través del escáner de 3 Teslas, indican que es posible evaluar longitudinalmente a los sujetos con lesión de médula espinal (LME), logrando identificar en el sitio de lesión los cambios estructurales ocurridos después de que los andamios son implantados.

## 6.2. Parámetros de difusión

### Fracción de Anisotropía (FA)

Los siguientes valores se obtuvieron del postprocesamiento de las imágenes de resonancia magnética mediante el software DSI Studio.

En la Figura 6.3 se puede observar en región caudal que todos los grupos tuvieron una caída en los valores de FA respecto a valores previos (antes de la lesión), sin embargo, grupo con andamio de PLA+PPy/I obtuvo valores de 0.44 y 0.49 en semana 1 y semana 4, respectivamente. Siendo estos valores mayores respecto a sujetos del grupo control y del grupo con andamio de PLA, donde se puede observar claramente una pendiente decreciente para el grupo control.

Para el epicentro, nuevamente se observa ésta tendencia donde los tres grupos tuvieron una caída de valores de FA respecto a valores previos, siendo grupo con andamio de PLA+PPy/I quien presenta valores más altos respecto a grupo control y grupo con andamio de PLA, manteniéndose en un valor de 0.42 en semana 1 y semana 4. Por último, para región rostral se observa la misma tendencia antes ya mencionada, donde grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene valores de 0.51 y 0.57 en semana 1 y semana 4, respectivamente. Los valores de FA de región caudal, epicentro y rostral, se pueden observar en Tabla 6.1

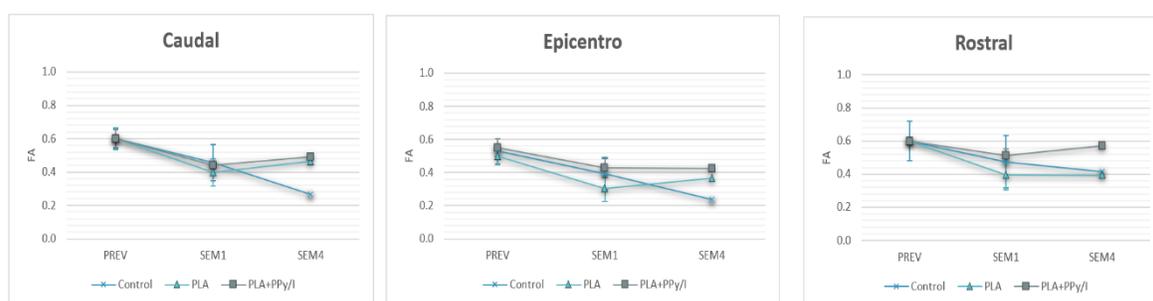


Figura 6.3 Fracción de anisotropía (FA) de los 3 grupos de estudio. Región Caudal, Epicentro y Región rostral. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=3 semana previa, n=3 semana 1, n=1 semana 4).

	Caudal			Epicentro			Rostral		
	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1
<b>Control</b>	0.6 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.10	0.26	0.50 $\pm$ 0.07	0.39 $\pm$ 0.09	0.23	0.6 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.15	0.41
<b>PLA</b>	0.6 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.08	0.46	0.50 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.07	0.36	0.6 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.08	0.39
<b>PLA+PPy/I</b>	0.6 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.02	0.49	0.55 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.05	0.42	0.6 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.03	0.57

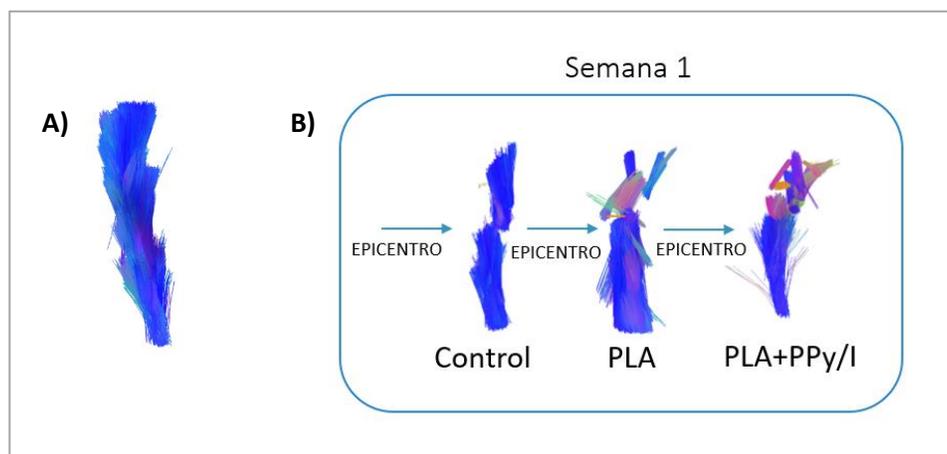
Tabla 6.1 Valores de fracción de anisotropía (FA). Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD.

De acuerdo con FA todos los grupos presentaron valores bajos después de la lesión de médula espinal, tanto en el epicentro como en regiones caudal y rostral; indicando que existe una difusión isotrópica al no existir una barrera que dirija el movimiento de las moléculas de agua, en el sitio de la lesión, todo esto debido a la degradación del tejido nervioso. Al comparar al grupo con

andamio de PLA+PPy/I respecto a grupo control y grupo con andamio de PLA, se observó que este obtuvo los valores más altos de FA sugiriendo que existe un movimiento restringido (difusión anisotrópica) en el sitio de la lesión.

Por otro lado, con el postprocesamiento de las imágenes de resonancia magnética con el software DSI Studio, se obtuvo el seguimiento de fibras de materia blanca para cada uno de los grupos bajo estudio en este trabajo.

En Figura 6.4 se muestra la trayectoria de las fibras de materia blanca después de realizar una segmentación de médula espinal (T8-T10), una semana después de la lesión, observando claramente que hay una mejor preservación de la arquitectura en las fibras de materia blanca para grupo con andamio de PLA+PPy/I y una evidente lesión por sección completa en los tractos para el grupo control y grupo con andamio de PLA.



*Figura 6.4 Tractografía. A) Rata sana. B) Trayectoria de fibras de materia blanca entre sujetos del grupo control, grupo PLA y grupo PLA+PPy/I, una semana después de la lesión.*

En la Figura 6.5 se muestra cuatro semanas después de la lesión, la trayectoria de las fibras de materia blanca, observando que aún continúa la pérdida de la arquitectura de los tractos para el grupo control, en grupo con andamio de PLA apenas comienza a apreciarse unas fibras en el epicentro de la lesión y su reestructuración no es tan clara, sin embargo, para grupo con andamio de

PLA+PPy/I ya se observa que hay un mayor número de fibras y una evidente reestructuración de los tractos, muy parecida a los tractos de una rata sana.

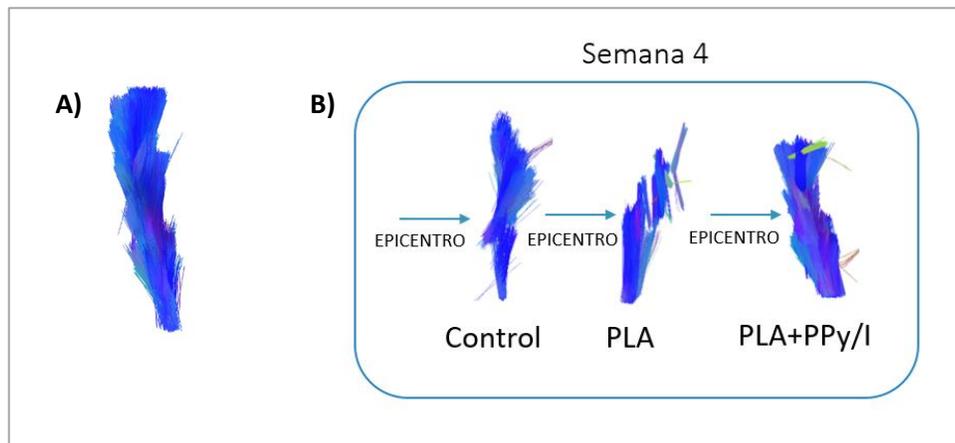


Figura 6.5 Tractografía. A) Rata sana. B) Trayectoria de fibras de materia blanca entre sujetos del grupo control, grupo PLA y grupo PLA+PPy/I, cuatro semanas después de la lesión.

## Difusividad media (MD)

De acuerdo a las mediciones de MD, Figura 6.6, se observa en región caudal claramente un aumento en los valores MD en los tres grupos experimentales, respecto a valores previos (antes de la lesión), pero grupo con andamio de PLA+PPy/I obtuvo los valores más bajos tanto en semana 1 y semana 4, de 0.88 y 0.74 respectivamente. Estos valores son menores al compararlos con grupo control y grupo con andamio de PLA, donde también se puede observar como grupo control tiene una pendiente creciente. Para epicentro se observa la misma tendencia un aumento de los valores de MD respecto a valores previos, sin embargo, grupo con andamio de PLA+PPy/I obtiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, 0.59 y 0.32 respectivamente. Finalmente, para región rostral se observa la misma tendencia antes ya mencionada, donde se observa que grupo con andamio de PLA+PPy/I tienen los valores más bajos en semana 1 y semana 4, de 0.38 y 0.32 respectivamente. Los valores de MD de región caudal, epicentro y rostral, se pueden observar en Tabla 6.2

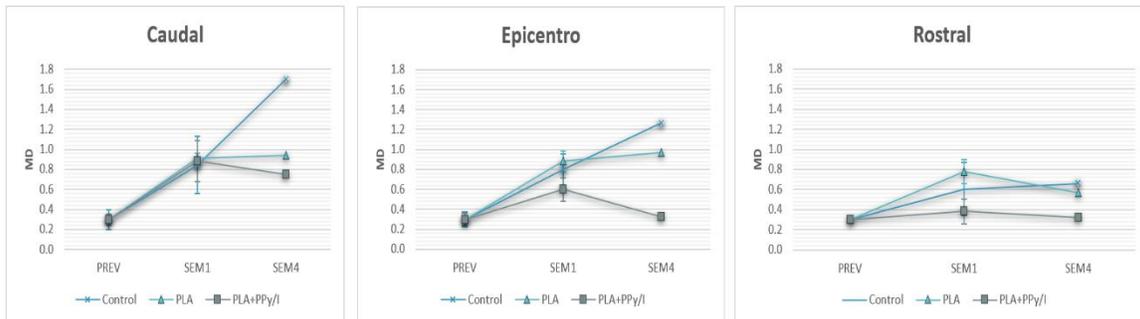


Figura 6.6 Difusividad Media (MD) de los 3 grupos de estudio. Región Caudal, Epicentro y Región rostral. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=3 semana previa, n=3 semana 1, n=1 semana 4).

	Caudal			Epicentro			Rostral		
	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1
<b>Control</b>	0.3±0.10	0.84±0.28	1.70	0.3±0.07	0.80±0.15	1.26	0.3±0.03	0.60±0.26	0.66
<b>PLA</b>	0.3±0.05	0.91±0.04	0.93	0.3±0.06	0.88±0.10	0.97	0.3±0.01	0.77±0.12	0.56
<b>PLA+PPy/I</b>	0.3±0.05	0.88±0.20	0.74	0.3±0.06	0.59±0.11	0.32	0.30±0.02	0.38±0.12	0.32

Tabla 6.2 Valores de difusividad media (MD). Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD.

De acuerdo a la literatura, valores altos en MD sugieren inflamación, quistes, así como pérdida de la integridad de las membranas celulares, por lo cual de acuerdo a los resultados antes mencionados, el grupo con andamio de PLA+PPy/I siendo el grupo que obtuvo los valores más bajos en MD, podría sugerir que estos andamios están ocasionando menor inflamación, menos formación de quistes así como una menor pérdida de membranas celulares en el sitio de la lesión.

## Difusión radial (RD)

Los valores de RD, Figura 6.7, muestran en región caudal un aumento de estos valores para los tres grupos experimentales, respecto a valores previos (antes de la lesión), siendo el grupo con andamio de PLA+PPy/I quien obtiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, 0.65 y 0.53 respectivamente.

En epicentro se observa la misma tendencia un aumento de los valores de RD respecto a valores previos, sin embargo, grupo con andamio de PLA+PPy/I obtiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, 0.49 y 0.24 respectivamente. Finalmente, para región rostral se observa la misma tendencia antes ya mencionada, donde se observa que grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, de 0.29 y 0.26 respectivamente. Todos los valores de RD se muestran en Tabla 6.3

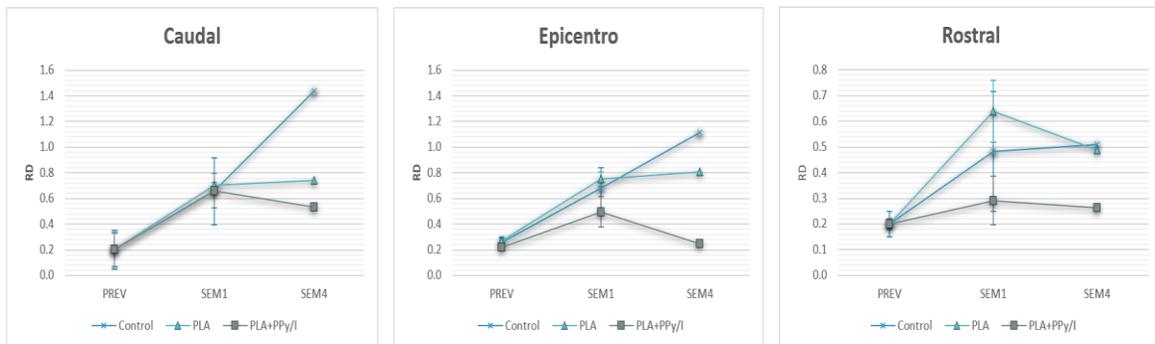


Figura 6.7 Difusión Radial (RD) de los 3 grupos de estudio. Región Caudal, Epicentro y Región rostral. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. ( $n=3$  semana previa,  $n=3$  semana 1,  $n=1$  semana 4).

	Caudal			Epicentro			Rostral		
	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1
<b>Control</b>	0.2 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.26	1.43	0.3 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.16	1.11	0.2 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.23	0.51
<b>PLA</b>	0.2 $\pm$ 0.13	0.70 $\pm$ 0.01	0.73	0.3 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.05	0.80	0.2 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.12	0.48
<b>PLA+PPy/I</b>	0.2 $\pm$ 0.13	0.65 $\pm$ 0.13	0.53	0.2 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.11	0.24	0.2 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.09	0.26

Tabla 6.3 Valores de difusión radial (RD). Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD.

De acuerdo a los resultados ya mencionados, y a la literatura, valores altos en RD sugieren daños a través de la vaina de mielina, por lo tanto como se pudo observar el grupo con andamio de PLA+PPy/I obtuvo los valores más bajos en éste índice, lo cual nos podría indicar que hubo un menor daño en la vaina de mielina en el sitio de lesión debido a la presencia del andamio de PLA+PPy/I.

## Difusión axial (AD)

En Figura 6.8 se pueden observar los valores referentes a la AD, en región caudal hubo un aumento de estos valores para los tres grupos experimentales, respecto a valores previos (antes de la lesión), siendo el grupo con andamio de PLA+PPy/I quien obtiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, 1.33 y 1.17 respectivamente. En epicentro se observa la misma tendencia un aumento de los valores de AD respecto a valores previos, sin embargo, grupo con andamio de PLA+PPy/I obtiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, 0.80 y 0.46 respectivamente.

Finalmente, para región rostral se observa la misma tendencia antes ya mencionada, donde se observa que grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene los valores más bajos en semana 1 y semana 4, de 0.57 y 0.55 respectivamente. Todos los valores de AD se muestran en Tabla 6.4

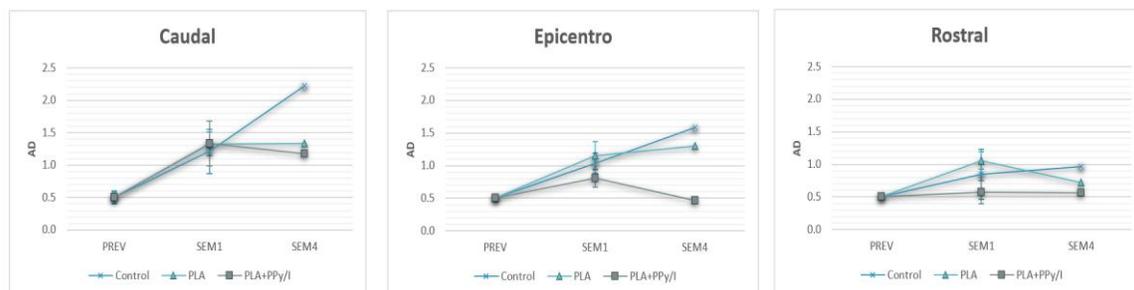


Figura 6.8 Difusión Axial (AD) de los 3 grupos de estudio. Región Caudal, Epicentro y Región rostral. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=3 semana previa, n=3 semana 1, n=1 semana 4).

	Caudal			Epicentro			Rostral		
	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1	PREV n=3	SEM1 n=3	SEM4 n=1
<b>Control</b>	0.5±0.10	1.21±0.33	2.22	0.5±0.05	1.04±0.15	1.58	0.5±0.03	0.85±0.38	0.96
<b>PLA</b>	0.5±0.08	1.32±0.18	1.33	0.5±0.04	1.15±0.22	1.30	0.5±0.01	1.05±0.13	0.72
<b>PLA+PPy/I</b>	0.5±0.01	1.33±0.34	1.17	0.5±0.04	0.80±0.13	0.46	0.5±0.01	0.57±0.17	0.55

*Tabla 6.4 Valores de difusión axial (AD). Los resultados están expresados como medias ±SD.*

Una disminución en valores de difusión axial (AD) ha sido relacionado a colapso axonal en el sitio de la lesión; en cambio en este estudio todos los grupos presentaron un aumento de estos valores en región caudal, epicentro, y región rostral; siendo el grupo con andamio de PLA+PPy/I el que obtuvo valores más bajos respecto a los grupos control y PLA, lo cual podría indicar que hay un daño axonal en la zona, sin embargo, al comparar esos resultados respecto a valores previos de la lesión, estos valores son más congruentes que los reportados en grupo control y grupo con andamio de PLA.

Por lo tanto, al analizar los parámetros de difusión (FA, MD, RD y AD), todos ellos cambiaron para los tres grupos bajo estudio, siendo grupo con andamio de PLA+PPy/I quien mostró mayores cambios debido posiblemente a una reestructuración del tejido a través del implante. Este comportamiento es muy similar a resultados de trabajos previos en el cual utilizaron al PPy/I pero en forma de partículas y con un modelo de lesión por contusión. Los resultados obtenidos de la tractografía para la visualización 3D de las fibras de materia blanca, permitieron evaluar la integridad y el cambio microestructural del sitio de lesión en la médula espinal, indicando que el grupo con andamio de PLA+PPy/I presentó tractos con mayor integridad de la arquitectura, lo cual sugiere que hay una mayor anisotropía en el epicentro de la lesión.

### 6.3. Análisis Volumétrico en Médula Espinal

Se segmentó la médula espinal desde (T8-T10) abarcando el sitio de lesión, a cada uno de los sujetos bajo experimentación, para así obtener el volumen en ( $mm^3$ ) de cada región segmentada encontrando los valores correspondientes a una semana después de la lesión y cuatro semanas después de la lesión, tal como se muestra en Tabla 6.5

#### Rata Sana

En Figura 6.9 se puede observar la segmentación de médula espinal (T8-T10) en corte coronal de médula espinal de rata sana, la cual obtuvo un volumen con valor aproximado a  $120 mm^3$ .

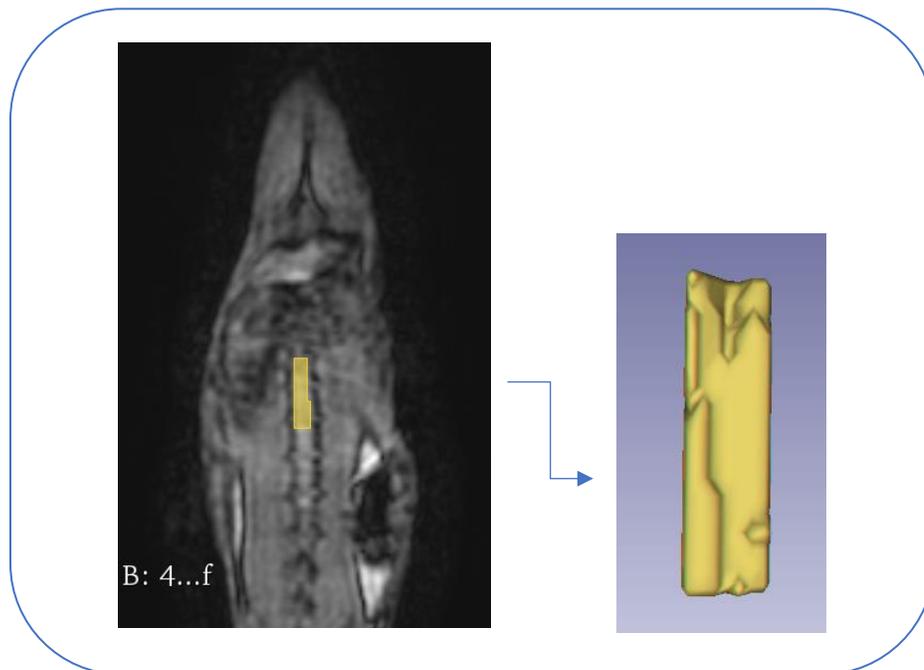


Figura 6.9 Médula espinal segmentada entre (T8-T10) en rata sana.

Se realizó una comparación de médula espinal entre sujeto del grupo control, sujeto del grupo PLA y sujeto del grupo PLA+PPY/l cuatro semanas después de la lesión. Se aprecia que la arquitectura de la médula espinal para sujeto del

grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene una mejor preservación de la arquitectura respecto a sujeto del grupo control y sujeto con andamio de PLA. Figura 6.10

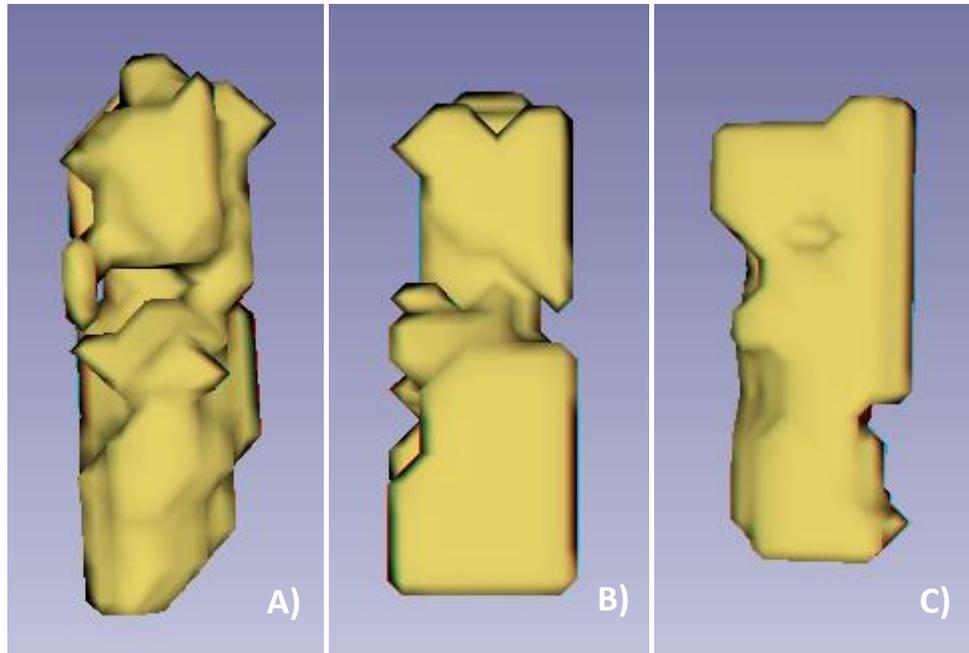


Figura 6.10 Médula espinal segmentada entre (T8-T10) cuatro semanas después de la lesión. A) Rata del grupo control. B) Rata del grupo PLA. C) Rata del grupo PLA+PPy/I.

En Figura 6.11 se muestra la gráfica del análisis volumétrico de médula espinal de cada grupo bajo estudio una semana después de la lesión y cuatro semanas después, donde se observa que el grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene el mayor volumen respecto a los otros grupos, ya que obtuvo un valor muy cercano a  $100 \text{ mm}^3$ , comparando este volumen con el volumen del grupo control que es aproximadamente a los  $50 \text{ mm}^3$ , el grupo con andamio de PLA+PPy/I tiene el doble del volumen. Además no se observan cambios respecto al volumen entre una semana después de la lesión y a cuatro semanas después de la lesión ya que los valores se mantienen alrededor del mismo rango.

	PREV n=3	Semana1 n=3	Semana4 n=1
Control	120±7.54	49.10±6.94	49.64
PLA	120±7.54	70.09±5.99	69.41
PLA+PPy/I	120±7.54	92.26±11.51	98.47

Tabla 6.5 Valores correspondientes al volumen de cada segmentación, previamente antes de la lesión, una semana después de la lesión y cuatro semanas después de la lesión. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=3 PREV, n=3 semana 1, n=1 semana 4).

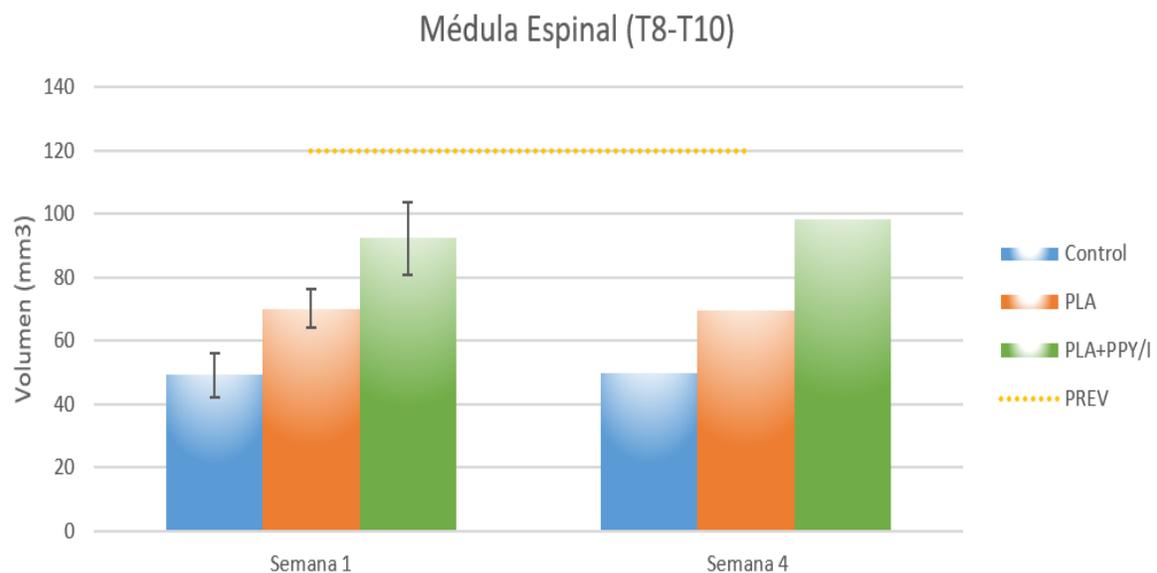


Figura 6.11 Gráfica del análisis volumétrico en médula espinal de los tres grupos bajo estudio. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=3 PREV, n=3 semana 1, n=1 semana 4).

El análisis volumétrico de médula espinal respaldan la información antes mencionada en los resultados de la tractografía, ya que el grupo con andamio de PLA+PPy/I presentó tractos con mayor integridad de la arquitectura, así como un mayor volumen en médula espinal respecto al grupo control y grupo con andamio de PLA.

## 6.4. Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM)

Se obtuvieron espectros localizados en epicentro de la lesión del grupo control, grupo con andamio de PLA y grupo con andamio de PLA+PPy/I, una semana después de la lesión y cuatro semanas después de la lesión. Antes de realizar los espectros correspondientes, se adquirió el espectro de una rata sana, para tomar sus valores como línea de base.

### Rata sana

En Figura 6.12 se puede observar el espectro de médula espinal sana que demuestra tres metabolitos presentes en el tejido: N-acetil-aspartato (NAA) el cual es un marcador neuronal a una frecuencia de 2.0 ppm con una amplitud aproximada de 0.0725, Colina (Cho) involucrada en síntesis de membrana aproximadamente a una frecuencia de 3.2 ppm con amplitud aproximada a 0.0825 y Creatina (Cr) un marcador de la homeostasis de la bioenergética celular a frecuencia de 3.0 ppm con amplitud aproximada a 0.0525. Los datos encontrados se resumen en Tabla 6.6

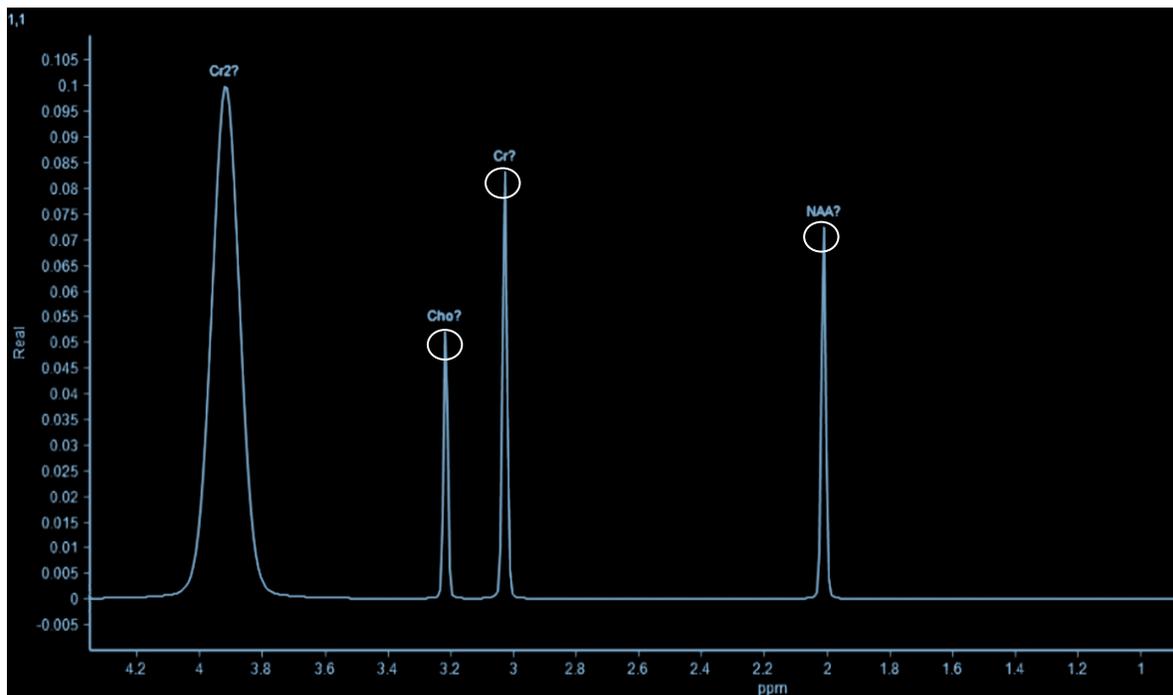


Figura 6.12 Estudio espectroscópico (ERM) en médula espinal sana.

Metabolito	Frecuencia (ppm)	Amplitud (u.a.)
NAA: N-acetil-aspartato	2.0	0.0725
Cr: Creatina	3.0	0.0825
Cho: Colina	3.2	0.0525

Tabla 6.6 Frecuencia y amplitud de los metabolitos en médula espinal sana.

Una semana después de la lesión, Figura 6.13, se muestran los espectros de sujeto del grupo control y sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I, por el contrario, para sujeto del grupo con andamio de PLA no se logró adquirir el espectro, posiblemente debido al tamaño del voxel que se coloca en la zona lesionada, ya que es muy pequeña y además está la presencia de líquido cefalorraquídeo circundante, motivo por lo cual pudo impedir el registro. A pesar de lo anteriormente mencionado, en los espectros adquiridos se puede ver la presencia de los principales metabolitos: N-acetil-aspartato (NAA), marcador neuronal a una frecuencia de 2.00 ppm, Colina (Cho) involucrada en síntesis de membrana a una frecuencia de 3.2 ppm y Creatina (Cr) un marcador de la homeostasis de la bioenergética celular a una frecuencia de 3.0 ppm

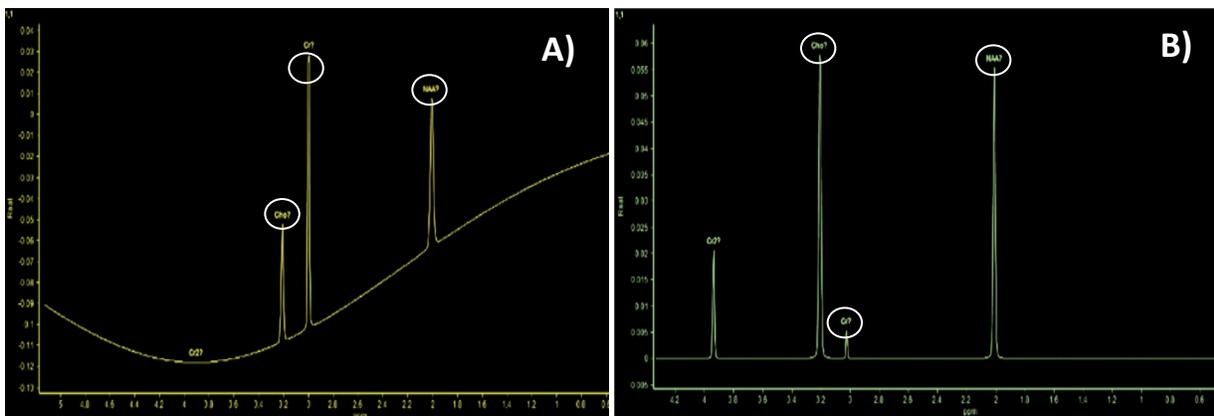


Figura 6.13 Estudio espectroscópico (ERM). A) Sujeto del grupo control una semana después de la lesión (n=1) B) Sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I una semana después de la lesión (n=1).

Cuatro semanas después de la lesión, Figura 6.14, se muestran los espectros de sujetos del grupo control, PLA y PLA+PPy/I. Se puede observar que en sujeto del grupo control, hubo una disminución del pico de N-acetil-aspartato (NAA) con amplitud de 0.02, de igual forma sujeto con andamio de PLA tuvo una disminución del pico de N-acetil-aspartato (NAA) con amplitud de 0.01, estos cambios sugieren que hay un daño neuronal en la zona, en cambio, sujeto con andamio de PLA+PPy/I tuvo un incremento del pico de N-acetil-aspartato (NAA) con amplitud de 0.07 el cual es un valor igual al valor de una rata sana, esto nos sugiere que posiblemente haya una regeneración neuronal en el sitio de la lesión. Por otro lado, el pico de Creatina (Cr) incremento en el sujeto con andamio de PLA con valor de 0.12, sugiriendo un aumento del metabolismo celular; siendo sujeto del grupo control quien tuvo un valor de 0.08 igual al de una rata sana, y sujeto con andamio de PLA+PPy/I quien tuvo un valor de 0.04 muy aproximado al de una rata sana. Finalmente observando el pico de Colina (Cho) sujeto del grupo control tuvo un valor de 0.04 muy cercano al de una rata sana, por otro lado, sujeto con andamio de PLA tuvo un incremento en este valor a 0.08 sugiriendo que hay síntesis de membranas celulares en el sitio de la lesión, pero a pesar de ello sujeto con andamio de PLA+PPy/I obtuvo un valor de 0.05 igual al de una rata sana, lo cual nos podría sugerir que hay una menor destrucción de membranas celulares en la zona lesionada. Los valores observados se resumen en Tabla 6.7

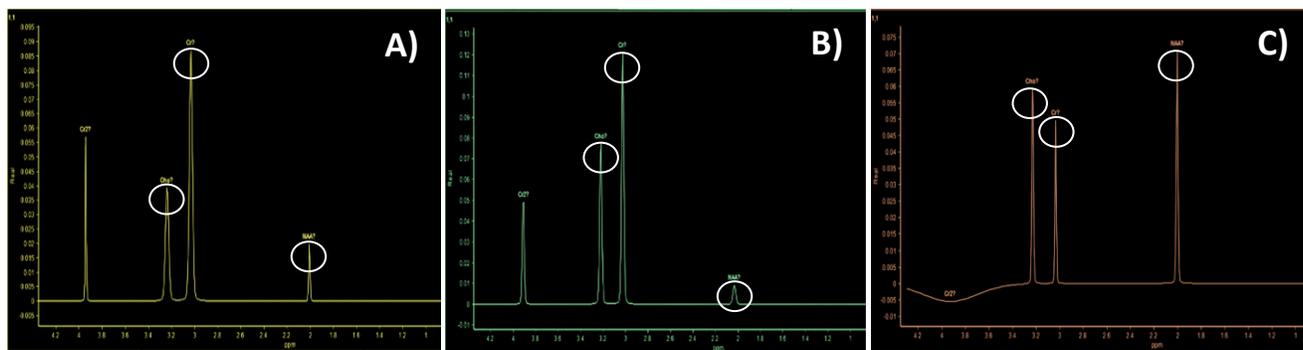


Figura 6.14 Estudio espectroscópico (ERM). A) Sujeto del grupo control cuatro semanas después de la lesión (n=1) B) Sujeto del grupo con andamio de PLA cuatro semanas después de la lesión (n=1) C) Sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I (n=1).

<i>Metabolito</i>	<i>Clasificación</i>			
	<i>Control</i> <i>n=1</i>	<i>PLA</i> <i>n=1</i>	<i>PLA+PPy/I</i> <i>n=1</i>	<i>Rata Sana</i> <i>n=1</i>
<i>NAA</i>	0.02	0.01	0.07	0.07
<i>Cr</i>	0.08	0.12	0.04	0.08
<i>Cho</i>	0.04	0.08	0.05	0.05

*Tabla 6.7 Amplitud de los diferentes metabolitos observados en el epicentro de la lesión, cuatro semanas después de la lesión.*

### **Relación (ratios) entre metabolitos**

En Figura 6.15 se observan los ratios entre los diferentes metabolitos, donde de acuerdo a NAA/Cr y NAA/Cho sujeto con andamio de PLA+PPy/I obtuvo el valor más alto respecto a sujeto del grupo control y sujeto con andamio de PLA; estos índices han sido asociados a viabilidad neuronal y una disminución de éstos indicaría daño neuronal; donde como ya se mencionó el sujeto con andamio de PLA+PPy/I fue el que presentó el mayor valor indicando una posible regeneración neuronal en el sitio de lesión.

Por otro lado, de acuerdo a Cho/Cr sujeto con andamio de PLA+PPy/I obtuvo el valor más alto comparándolo con valores que obtuvieron sujeto del grupo control y sujeto con andamio de PLA. De acuerdo a enfermedades neurodegenerativas un aumento en el ratio Cho/Cr ha indicado degradación en la vaina de mielina, sin embargo, debido al poco estudio de la ERM en lesión de médula espinal (LME) no se puede afirmar que realmente este sucediendo este fenómeno, pero, si analizamos Cho y Cr individualmente, nos podría sugerir que en el sitio de la lesión de sujeto con andamio de PLA+PPy/I puede estar ocurriendo un aumento en la síntesis de membranas celulares así como un aumento en el metabolismo celular.

Por último, con Cho/NAA sujeto del grupo control y sujeto con andamio de PLA obtuvieron los valores más altos, siendo sujeto con andamio de PLA+PPy/I el que obtuvo el valor más bajo y más cercano al valor de una rata sana. También de acuerdo a enfermedades neurodegenerativas un aumento en Cho/NAA ha sido relacionado a tejidos con mayor densidad celular debido a la presencia de edema. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos sujeto con andamio de PLA+PPy/I fue el que obtuvo el valor más bajo sugiriendo que hay menor edema en el sitio de lesión.

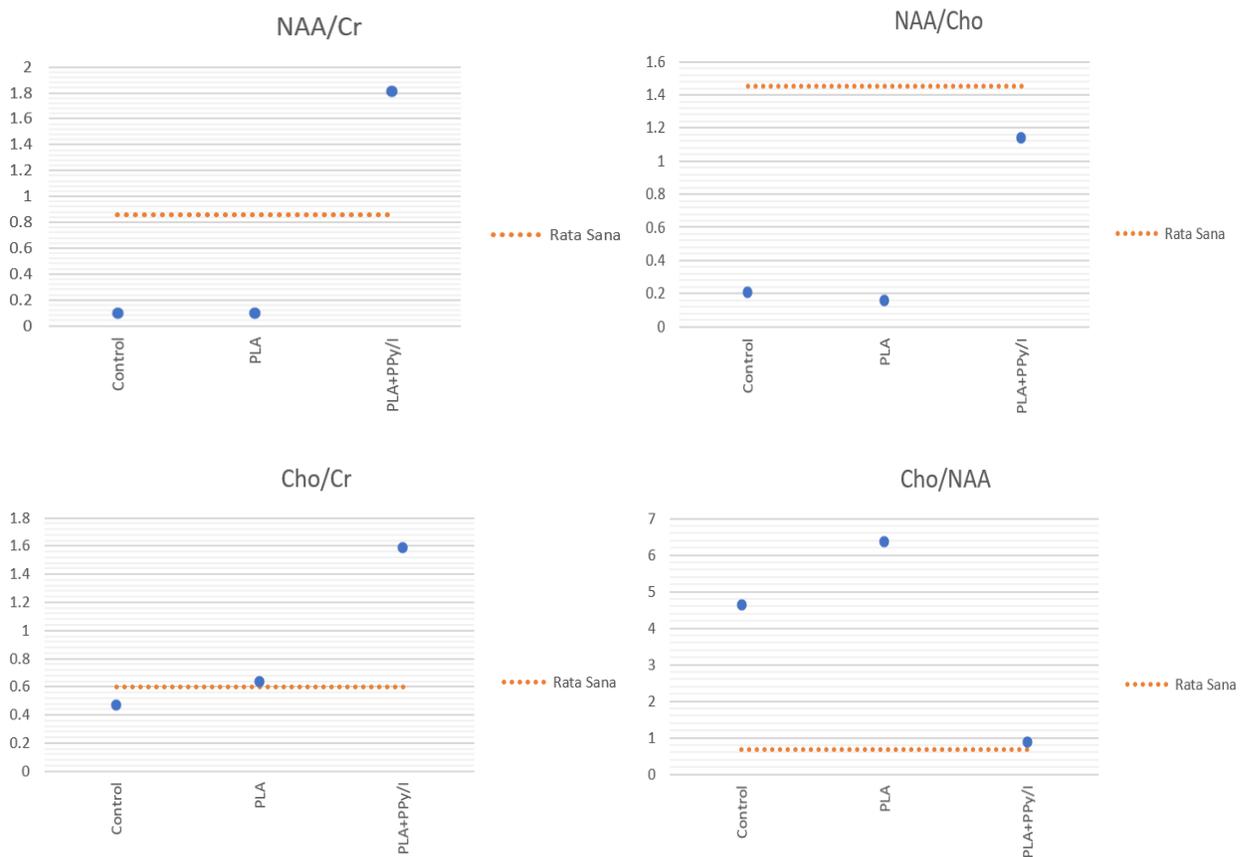


Figura 6.15 Ratios entre metabolitos en sujetos de los 3 grupos experimentales, cuatro semanas después de la lesión (n=1)

Metabolito	Clasificación			
	Control n=1	PLA n=1	PLA+PPy/I n=1	Rata Sana n=1
NAA/Cr	0.10	0.10	1.81	0.86
Cho/Cr	0.47	0.64	1.59	0.60
Cho/NAA	4.65	6.38	0.88	0.69
NAA/Cho	0.21	0.16	1.14	1.45

*Tabla 6.8 Relación (ratios) entre metabolitos, cuatro semanas después de la lesión, en unidades arbitrarias (u.a.)*

Por lo tanto, dado que el uso de ERM es muy limitado en la lesión de médula espinal (LME), debido al tamaño tan reducido de la médula espinal y a la presencia de líquido cefalorraquídeo circundante, los hallazgos obtenidos en ésta prueba de viabilidad servirán para elaborar un mejor protocolo de adquisición para futuros trabajos en la misma línea de investigación y además para otro tipo de enfermedades.

## 6.5. Evaluación Funcional (BBB)

Todos los animales incluidos en este estudio presentaron evaluaciones BBB con puntaje de cero al día siguiente de la lesión.

De acuerdo con la escala BBB, la puntuación de los sujetos del grupo control fue de 0 en la primera semana, 1.25 a las cuatro semanas y 1 a las ocho semanas, los sujetos presentaron ligeros movimientos de rodilla. Por otro lado, el grupo con andamio de PLA obtuvo 0.08 en primera semana, 1.33 a las cuatro semanas y 1.66 a las ocho semanas, donde los sujetos sólo mostraron movimiento extenso de una articulación y leve movimiento de otra (tobillo y rodilla).

Mientras que para el grupo con andamio de PLA+PPy/I se observaron valores de 0.37 para la primera semana, 9.75 para las cuatro semanas y 11.62 para la octava semana, donde sujetos presentaron pasos plantares frecuentes con soporte de peso y coordinación ocasional entre las extremidades anteriores y posteriores.

Se pueden observar que los valores BBB de sujetos del grupo control tienden a aumentar hasta la semana 4, sin embargo, para semana 5 comienzan a disminuir y en semana 6 aumentan ligeramente, para posteriormente tener un descenso que se mantiene hasta semana 8. Para sujetos del grupo con andamio de PLA los valores aumentan hasta semana 3 para luego mantenerse alrededor del mismo valor hasta semana 7, ya que para la semana 8 se observa un ligero aumento. Por lo contrario, para sujeto del grupo con andamio de PLA+PPy/I hay una tendencia creciente que persiste hasta la semana ocho, donde se nota que se tiene el mejor rendimiento entre estos tres grupos experimentales. Figura 6.16

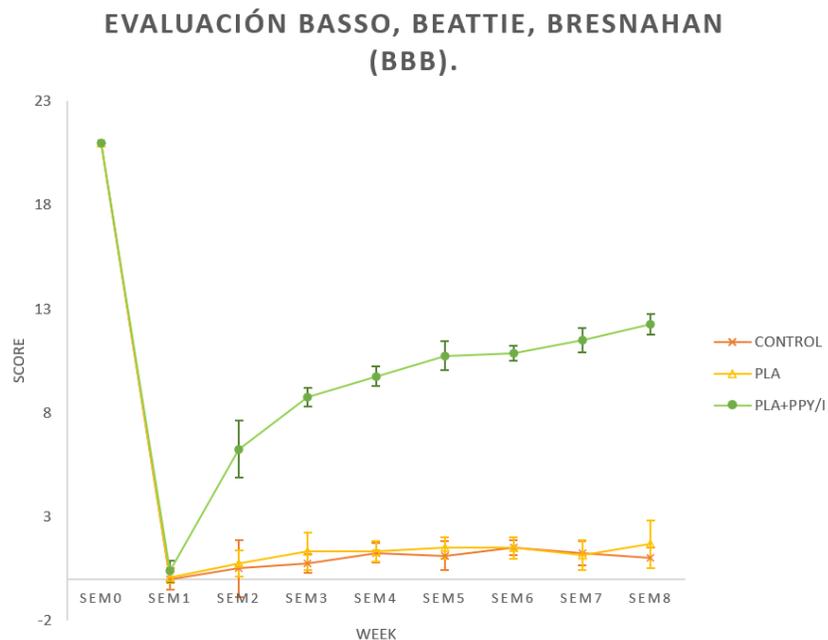


Figura 6.16 Gráfica de la recuperación motora evaluada con la escala BBB. Los resultados están expresados como medias  $\pm$ SD. (n=2 grupo control, n=3 grupo PLA, n=2 hasta semana 6 grupo PLA+PPy/I).

Por lo tanto, la evaluación funcional medida por la escala (BBB) mostró mayor recuperación de la función motora para grupo con andamio de PLA+PPy/I dentro de las 8 semanas de evaluación respecto al grupo control y grupo con andamio de PLA los cuales mantuvieron valores por debajo de un puntaje de 2.

A pesar del tamaño muestral pequeño, los sujetos con andamio de PLA+PPy/I obtuvieron una recuperación motora con una puntuación más alta comparándolos con los resultados de (Shu, Bing et al.,2019) donde se observó cambios a partir de la semana 4 con puntaje cercanos a 5 y usando andamios de PLA/PPy. Por otro lado (Liu, Xiao-Yin et al.,2019) obtuvieron un puntaje (alrededor de 10) muy parecido a los resultados mostrados en este trabajo, pero usando andamios a base de Colágeno/Quitosano+ factor de crecimiento bFGF, cabe mencionar que en este trabajo no se uso ningún factor de crecimiento.

Este comportamiento sugiere que el andamio de PLA+PPy/I que puede estar actuando como puente entre ambos extremos de la sección completa de la médula espinal, promoviendo una interacción en el tejido nervioso a través del sitio de lesión, además de proporcionar neuroprotección al decremenar el daño del tejido en el sitio de la lesión.

## 7. Conclusiones

- El protocolo utilizado en esta prueba de viabilidad mostró que es posible establecer el efecto de los andamios implantados en el epicentro de la lesión de médula espinal en ratas, en fase aguda, a través de imágenes de resonancia magnética utilizando un escáner de 3 Teslas.
- Las imágenes anatómicas T1 y T2 mostraron información longitudinal relevante sobre el estado de la lesión después de que los andamios fueron implantados.
- Los parámetros cuantitativos (FA, MD, RD, AD) proporcionaron información cuantitativa del efecto que tienen los andamios en el sitio de la lesión, siendo el grupo con andamio de PLA+PPy/I quien mostró mayores cambios respecto a grupo control y grupo con andamio de PLA.
- Análisis volumétrico y tractografía sirvieron para complementar la información obtenida al proporcionar información sobre la reestructuración del tejido nervioso.
- La espectroscopia por resonancia magnética (ERM) es una técnica viable que ofrece una valoración bioquímica, metabólica y funcional del tejido nervioso en el sitio de la lesión de medula espinal. Además de complementar de forma adecuada a estudios imagenológicos y a evaluación motora. Por lo tanto este trabajo es punto de partida para seguir implementando ésta técnica en estudios posteriores de LME.
- El andamio de PLA+PPy/I es una estrategia prometedora para el tratamiento de lesión de médula espinal en un modelo de lesión por sección completa, en fase aguda. Aunque es necesario aumentar el número de sujetos, los resultados de esta prueba de viabilidad muestran que es posible establecer el efecto de los implantes a través de IRM.

## 8. Perspectivas

- Emplear técnicas histológicas que comprueben los hallazgos encontrados en los parámetros de difusión y espectroscopia reportados en este estudio.
- Utilizar diversos biomarcadores para determinar si hay regeneración neuronal a través del andamio de PLA+PPy/I, angiogénesis, así como formación de cicatrices gliales en el sitio de lesión.
- Ampliar el tamaño de sujetos experimentales para lograr realizar correlaciones estadísticas con los diferentes parámetros propuestos.
- Estandarizar la adquisición de ERM para su aplicación a futuro en estudios de diagnóstico clínico y modelos animales con lesión de médula espinal.

## 9. Bibliografía

1. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica Barcelona: Editorial Elsevier; 2011.
2. Guyton AC. Anatomía y fisiología del sistema nervioso: Editorial Médica Panamericana; 1997.
3. Fernández JA, Villanúa MA, López A. Anatomía y fisiología del cuerpo humano: Editorial McGraw-Hill; 2013.
4. Siebert JR, Eade AM, Osterhout DJ. Biomaterial Approaches to Enhancing Neurorestoration after Spinal Cord Injury: Strategies for Overcoming Inherent Biological Obstacles. *BioMed Research International*. 2015; 752572: p. 1-20.
5. Organización Mundial de la Salud. Lesiones de la médula espinal perspectivas internacionales; 2013. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>.
6. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Las personas con discapacidad en México: una visión censal; 2004. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/discapacidad.aspx>.
7. Estrada S, Carreón A, Parra MC, Ibarra C, Velasquillo C, Vacanti C, et al. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud pública de México*. 2007; 49(6): p. 437-444.
8. Díaz A. Mecanismos de daño y neuroprotección en la lesión traumática de médula espinal. *Mensaje Bioquímico*. 2013; 37: p. 69-108.
9. Lara SY, Laureani AJ, García LI, Ortiz R, Morgado C, Beltrán L, et al. Mecanismos bioquímicos desencadenados después de la lesión de médula espinal. *Revista Neurobiología*. 2020; 11(28): p. 1-21.
10. Katoh H, Yokota K, Fehlings M. Regeneration of spinal cord connectivity through stem cells transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019; 248(13): p. 1-23.
11. Yang B, Feng Z, Feng C, Liwei Y, Chenggui W, Kesi S, et al. Strategies and prospects of effective neural circuits reconstruction after spinal cord injury. *Cell Death and Disease*. 2020; 11(6): p. 1-14.
12. Papa S, Mauri E, Rossi F, Perale G, Veglianese P. Introduction to spinal cord injury as clinical pathology. En.: Elsevier; 2020. p. 1-12.

13. Ballesteros V, Marré B, Martínez C, Fleiderman J, Zamorano J. Lesión de la médula espinal. Actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/Columna*. 2012; 11(1): p. 73-76.
14. Rouanet C, Reges D, Rocha E, Gagliardi V, Silva GS. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2017; 75(6): p. 387-393.
15. Venkatesh K, Ghosh SK, Mullick M, Manivasagam G, Sen D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and tissue research*. 2019; 377(2): p. 125-151.
16. Ulndreaj A, Badner A, Fehlings M. Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury. *F1000Research*. 2017; 6.
17. McDonald JW, Sadowsky C. Spinal cord injury. *Lancet*. 2002; 359(9304): p. 417-425.
18. Pérez C, Sánchez D, López M, Morgado C, Beltrán L, Coria G, et al. Aplicaciones terapéuticas para la lesión de médula espinal. *Revista electrónica neurobiología*. 2018; 9(21): p. 1-16.
19. Burns A, Marino R, Kalsi-Ryan S, Middleton J, Tetreault L, Dettori J, et al. Type and timing of rehabilitation following acute and subacute spinal cord injury: a systematic review. *Global spine journal*. 2017; 7(3S): p. 175S-194S.
20. Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al avance de la Ciencia y la Tecnología en México. Estrategia para el tratamiento de lesiones por sección completa de médula espinal basada en implantes de polímeros sintetizados por plasma; 2010. Disponible en: <http://www.inin.gob.mx/plantillas/librosinin.cfm>.
21. Olayo R, Ríos C, Salgado H, Cruz G, Morales J, Olayo M, et al. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2008; 19(2): p. 817-826.
22. Xiang S, Pan W, Kastin A. Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord. *Current Pharmaceutical Desing*. 2005; 11: p. 1267-1277.
23. Barakat D, Gaglani S, Neravetla S, Sanchez A, Andrade C, Pressman Y, et al. Survival, integration, and axon growth support of glia transplanted in to the chronically contused spinal cord. *Cell Transplantation*. 2005; 14: p. 225-240.
24. Kalirajan C, Dukle A, Nathanael A, Oh T, Manivasagam G. A critical review on polymeric biomaterials for biomedical applications. *Polymers*. 2021; 13(17:3015): p. 1-27.

25. Austin MJ, Rosales AM. Tunable biomaterials from synthetic, sequence-controlled polymers. *Biomater Sci.* 2019; 7: p. 490-505.
26. Osorio M, Henao L, Velásquez J, Cañas A, Restrepo L, Gañán P, et al. Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. *DYNA. Revista de la Facultad de Minas.* 2017; 84(201): p. 241-252.
27. Mi H-Y, Jing X, Turng L-S. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Journal of Cellular Plastics.* 2015; 51(2): p. 165-196.
28. Yan R, Chen Y, Gu Y, Tang C, Huang J, Hu Y, et al. A collagen-coated sponge silk scaffold for functional meniscus regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2019; 13(2): p. 156-173.
29. Gao Q, Niu X, Shao L, Zhou L, Lin Z, Sun A, et al. 3D printing of complex GelMA-based scaffolds with nanoclay. *Biofabrication.* 2019; 11.
30. Xu X, Zhou G, Li X, Zhuang X, Wang W, Cai Z, et al. Solution blowing of chitosan/PLA/PEG hydrogel nanofibers for wound dressing. *Fibers and Polymers.* 2016; 17: p. 205-211.
31. Chen X, Zhou L, Xu H, Yamamoto M, Shinoda M, Kishimoto M, et al. Effect of the application of a dehydrothermal treatment on the structure and the mechanical properties of collagen film. *Materials.* 2020; 13(2).
32. Cheng Y, Zhang Y, Wu H. Polymeric fibers as scaffolds for spinal cord injury: a systematic review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* 2022; 9.
33. Santoro M, Shah S, Walker J, Mikos A. Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews.* 2016; 107: p. 206-212.
34. Bigg DM. Polylactide copolymers: Effect of copolymer ratio and end capping on their properties. *Advances in polymer technology.* 2005; 24: p. 69-82.
35. Lopes MS, Jardim AL, Filho RM. Poly(Lactic Acid) production for tissue engineering applications. *Procedia engineering.* 2012; 42: p. 1402-1413.
36. Yamamoto M, Ishikawa T. *Tissue Engineering: Fundamentals, techniques and applications: Editorial Cell Biology Research Progress;* 2012.
37. Luckachan GE, Pillai CKS. Biodegradable polymers-a review on recent trends and emerging perspectives. *Journal of Polymers and the Environment.* 2011; 19: p. 637-676.
38. Zamani F, Jahanmard F, Ghasemkhan F, Amjad-Iranagh S, Bagherzadeh R, Tehran M. *Nanofibrous and nanoparticle materials as drug-delivery systems: Editorial Elsevier.*

39. Kumbar S, Laurencin C, Deng M. Natural and syntetic biomedical polymers. 1st ed.: Editorial Elsevier; 2014.
40. Okonkwo P, Ezurike C, Okonkwo E. Aplication of biopolymer composites in super capacitor. Biopolymer composites in electronics.2017 p. 487-503.
41. Sevim K. Modelling of drug release from biodegradable polymers.Diss. Department of Engineering. 2017.
42. Rubio E, Santos H, Paredes A, Castillo C. Cultivo de células progenitoras neurales humanas sobre andamios de ácido poli-láctico (PLA) generados por impresión 3D para su aplicación en lesiones medulares. CNIB 2016. 2016.
43. Dubal D, Lee SH, Kim JG, Kim WB, Lokhande C. Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. Journal of materials chemistry. 2012; 22(7): p. 3044-3052.
44. Wang L, Li XG, Yang YL. Preparation,properties and applications of polypyrroles. Reactive and Fuctional Polymers. 2001; 47(2): p. 125-139.
45. Muller D, Rambo C, Recouvrex D, Porto L, Barra G. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. Syntetic Metals. 2011; 161(1-2): p. 106-111.
46. Guimard N, Gomez N, Schmidt C. Conducting polymers in biomedical engineering. Progress in Polymer Science. 2007; 32(8-9): p. 876-921.
47. Kasisomayajula S, Qi X, Vetter C, Croes K, Pavlacky D, Gelling V. A structural and morphological comparative study between chemically synthesized and photopolymerized polypyrrole. Journal of Coatings Technology and Research. 2010; 7(2): p. 145-158.
48. Whypych G. Handbook of polymers. 2nd ed.: Editorial Elsevier; 2016.
49. Gajendiran M, Choi J, Kim SJ, Kim K, Shin H, Koo HJ, et al. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2017; 51: p. 12-26.
50. Zhou JF, Wang Yg, Cheng L, Wu Z, Sun Xd, Peng J. Preparation of polypyrrole-embedded electrospun poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Neural Regeneration Research. 2016; 11(10): p. 1644-1652.
51. Zhou J, Cheng L, Sun X, Wang X, Jin S, Li J, et al. Neurogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells on aligned electrospun polypyrrole/polylactide

- composite nanofibers with electrical stimulation. *Frontiers of Materials Science*. 2016; 10(3): p. 260-269.
52. Flores M, Raya A, Esquiliano D, Ontiveros P, Islas N, Morales J, et al. Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue-bone in vivo: study in rabbit. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2018; 67(7): p. 427-437.
53. Shu B, Sun X, Liu R, Jiang F, Yu H, Xu N, et al. Restoring electrical connection using a conductive biomaterial provides a new therapeutic strategy for rats with spinal cord injury. *Neuroscience letters*. 2019; 692: p. 33-40.
54. Raynald , Shu B, Liu XB, Zhou JF, Huang H, Wang JY, et al. Polypyrrole/polylactic acid nanofibrous scaffold cotransplanted with bone marrow stromal cells promotes the functional recovery of spinal cord injury in rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2019; 25(9): p. 951-964.
55. Liu XY, Liang J, Wang Y, Zhong L, Zhao CY, Wei MG, et al. Diffusion tensor imaging predicting neurological repair of spinal cord injury with transplanting collagen/chitosan scaffold binding bFGF. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2019; 30.
56. Morales A, Salgado H, Morales J, Ríos C, Cruz G, Díaz A, et al. CAT and MRI studies of spinal cord injured rats implanted with PPy/I. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 2013; 34(2): p. 145-155.
57. Álvarez L, Salgado H, Olayo R, Cruz G, Olayo M, Díaz A, et al. Effect of polypyrrole implants synthesized by different methods on spinal cord injuries of rats. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 2015; 36(1): p. 7-21.
58. Morales A, Salgado H, Grijalva I, Morales J, Ríos C, Cruz G, et al. Spinal cord injury of Rhesus Monkey implanted with PPy/I plasma polymer, MRI study. *IFMBE Proceedings*. 2015; 49: p. 174-177.
59. Cruz G, Mondragón R, Díaz A, Manjarrez J, Olayo R, Salgado H, et al. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Journal of Materials Science*. 2012; 23(10).
60. Mondragon R, Ríos C, Roldán E, Cruz G, Olayo M, Olayo R, et al. Delayed injection of polypyrrole doped with iodine particle suspension after spinal cord injury in rats improves functional recovery and decreased tissue damage evaluated by 3.0 Tesla in vivo magnetic resonance imaging. *The spine journal: official journal of the north american spine society*. 2017; 17(4): p. 562-573.

61. Fabela O, Salgado H, Medina L, Álvarez L, Sánchez S, Mondragón R, et al. Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2017; 29(1).
62. Hernández A. Estudio del efecto del polipirrol dopado con yodo sintetizado por plasma, en ratas con lesión crónica de médula espinal, por medio de MRI. Tesis de maestría, UAM-I, CDMX.
63. Abragam A. *The principles of nuclear magnetism*: Oxford University Press; 1961.
64. Hashemi R, Bradley W, Lisanti C. *MRI: The basics*. 3rd ed.: Lippincott Williams & Wilkins.
65. Leite C, Castillo M. *Diffusion weighted and diffusion tensor imaging: A clinical guide*: Thieme Medical Publishers; 2016.
66. Murgoci A, Baciak L, Cubinkova V, Smolek T, Tvrdik T, Juranek I, et al. Diffusion tensor imaging: tool for tracking injured spinal cord fibres in rat. *Neurochemical research*. 2020; 45(1): p. 180-187.
67. Chen B, Tan Q, Zhao W, Yang Q, Zhang H, Gao F, et al. Diffusion tensor imaging and electrophysiology as robust assays to evaluate the severity of acute spinal cord injury in rats. *BMC neurology*. 2020; 20(1): p. 1-10.
68. Vedantam A, Jirjis M, Schmit B, Wang M, Ulmer J, Kurpad S. Diffusion tensor imaging of the spinal cord: insights from animal and human studies. *Neurosurgery*. 2014; 74(1): p. 1-8.
69. Lee CY, Huisinga JM, Choi IY, Lynch S, Lee P. Correlation between spinal cord diffusion tensor imaging and postural response latencies in persons with multiple sclerosis: A pilot study. *Magn Reson Imaging*. 2020; 66: p. 226-231.
70. Kaushal M, Shabani S, Budde M, Kurpad S. Diffusion tensor imaging in acute spinal cord injury: a review of animal and human studies. *Journal of neurotrauma*. 2019; 36(15): p. 2279-2286.
71. Zhao C, Rao JS, Pei XJ, Lei JF, Wang ZJ, Zhao W, et al. Diffusion tensor imaging of spinal cord parenchyma lesion in rat with chronic spinal cord injury. *Magnetic resonance imaging*. 2018; 47: p. 25-32.
72. Sun Y, Yang C, Zhu X, Wang JJ, Liu XY, Yang XP, et al. 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *Journal of biomedical materials research*. 2019; 107(9): p. 1898-1908.

73. Bazley , Pourmorteza A, Gupta S, Pashai N, Kerr C, All A. DTI for assessing axonal integrity after contusive spinal cord injury and transplantation of oligodendrocyte progenitor cells. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference. 2012; 2012.
74. Londoño A, Arbelaez A, Ascencio JL. Aplicación de la espectroscopia por resonancia magnética en el estudio de las enfermedades del sistema nervioso central. Acta Neurol Colomb. 2006; 22(1): p. 42-54.
75. Hock A, Henning A, Boesiger P, Kollias S. H-MR spectroscopy in the human spinal cord. AJNR Am J Neuroradiol. 2013; 34(9): p. 1682-9.
76. Near J, Harris A, Juchem C, Kreis R, Marjanska M, Oz G, et al. Preprocessing, analysis and quantification in single-voxel magnetic resonance spectroscopy: experts' consensus recommendations. NMR in Biomedicine. 2021; 34(5): p. 1-23.
77. Scheau C, Preda E, Popa G, Ghergus A, Capsa R, Lupescu G. Magnetic resonance spectroscopy--a non-invasive method in evaluating focal and diffuse central nervous system disease. J Med Life. 2012; 5(4): p. 423-427.
78. Duetzmann S, Pilatus U, Seifert V, Marquardt G, Setzer M. Ex vivo <sup>1</sup>H MR spectroscopy and histology after experimental chronic spinal cord compression. Journal of Spine Surgery. 2017; 3(2): p. 176-183.
79. Lozano A, Barbosa N, Agulles L. Análisis de espectros de resonancia magnética. Revista Colombiana de Cancerología. 2013; 17(1): p. 11-17.
80. Moffett J, Ross B, Arun P, Madhavarao C, Namboodiri A. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. Prog Neurobiol. 2007; 81(2): p. 89-131.
81. Palmero R, Jiménez A, Rodríguez R, Hernández H, Galarraga J, Machado C. Evaluación no invasiva mediante resonancia magnética del meduloblastoma desmoplásico. A razón de un caso. Revista Mexicana de Neurociencia. 2004; 5(6): p. 635-640.
82. Oz G, Alger J, Barker P, Bartha R, Bizzi A, Boesch C, et al. Clinical proton MR spectroscopy in central nervous system disorders. Radiology. 2014; 270(3): p. 659-79.
83. Hock A, Henning A, Boesiger P, Kollias S. (1)H-MR spectroscopy in the human spinal cord. AJNR Am J Neuroradiol. 2013; 34(9): p. 1682-9.
84. Osorio D. Desarrollo de un composito para reparación y regeneración de nervio periférico. Tesis de Maestría, UAM-I, CDMX.

85. Vargas B, Ambriz D, Navarro M, Trejo A, Rodríguez G, González M, et al. Manejo de animales del bioterio de la UAM-I. 2018;1era edición, UAM (Unidad Iztapalapa).
86. Romero W, Batista Z, Lucca M, Ruano A, García M, Rivera M, et al. El 1,2,3 de la experimentación de animales de laboratorio. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2016; 33(2): p. 288-299.
87. Basso D, Beattie M, Bresnahan J. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma. 1995; 12(1): p. 1-21.
88. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación, 23 de abril de 2003.
89. NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.

## Anexo

### Escala BBB

Grado	Observaciones
0	No se observan movimientos en patas traseras (PT).
1	Movimiento limitado de una o dos articulaciones, usualmente de (cadera/rodilla).
2	Movimiento amplio de una articulación con o sin movimiento limitado de otra.
3	Movimiento amplio de dos articulaciones.
4	Movimiento limitado de las tres articulaciones de las PT (cadera, rodilla y tobillo).
5	Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
6	Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
7	Movimiento amplio de las tres articulaciones de las PT (cadera, rodilla y tobillo).
8	Barrido sin soporte de peso, o colocación plantar de la pata sin soporte de peso.
9	Colocación plantar con soporte de peso cuando no está caminando o pasos ocasionales, frecuentes o constantes con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
10	Pasos ocasionales con soporte plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y patas traseras (PT).
11	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
12	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT.
13	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT.
14	Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, hay rotación interna o externa de patas, cuando hace contacto con el piso o al despegar. También puede haber pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales.
15	Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia

	delante. Al hacer contacto con el piso hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo.
16	Pasos plantares constantes y coordinados entre PD y PT durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo pero la rota al levantarla.
17	Pasos plantares constantes y coordinados entre PD y PT, durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia adelante. Al hacer contacto con el piso hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
18	Pasos plantares constantes y coordinados entre PD y PT durante la marcha. La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
19	Pasos plantares constantes y coordinados entre PD y PT durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrasta la cola ocasionalmente o todo el tiempo.
20	Pasos plantares constantes, marcha coordinada y separación de los dedos constante. Al hacer contacto con el piso y levantar, hay predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, la cola esta levantada constantemente y hay inestabilidad del tronco.
21	Igual al anterior, pero, el tronco constantemente estable.

## Productividad del trabajo

- Efecto de andamios de PLA y PLA+PPy/I en ratas con lesión de médula espinal por sección completa, evaluado a través de IRM., Sánchez G.S. et al. IEEE EMBS International Student Conference 2021 in Latin America., Guadalajara, México, Noviembre 2021. – Tercer lugar (Student Competition)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00146

Matrícula: 2191800514

Efecto de andamios de PLA y PLA+PPy/I en ratas con lesión de médula espinal por sección completa, evaluado a través de IRM.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE DAMIAN CARRILLO RUIZ  
DR. JOSE EFREN ISRAEL GRIJALVA OTERO  
DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

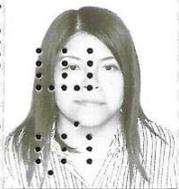
MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: GLORIA STEPHANIE SANCHEZ MORALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*A PROBAR*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



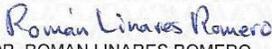

GLORIA STEPHANIE SANCHEZ MORALES  
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERPANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE



DR. JOSE DAMIAN CARRILLO RUIZ

VOCAL



DR. JOSE EFREN ISRAEL GRIJALVA OTERO

SECRETARIO



DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ