



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Básicas e Ingeniería**

**Doctorado en Ingeniería Biomédica**

# Implante de andamios recubiertos con polímero de pirrol plasma dopado con yodo en lesión medular

Tesis que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Ingeniería Biomédica

Presenta

M.C. Diana María Osorio Londoño

Asesores: Dr. Roberto Olayo González y Dr. Axayácatl Morales Guadarrama

Colaboración: Dra. Yessica Heras Romero

*Sinodales:* Dra. Iris Angélica Feria Romero

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Dr. Luis Concha Loyola

Dr. Gustavo Pacheco López

Dr. Ernesto Alejandro Roldán Valadez

México, noviembre de 2023

## Agradecimientos

A mi familia, que con su cariño e incondicionalidad me impulsan a seguir adelante cada día.

A la UAM-I y sus profesores, por darme la oportunidad de abrir mis horizontes.

A México y el Conahcyt, quienes me han brindado la oportunidad de recibir el apoyo económico necesario para llevar a cabo esta investigación.

A mis asesores el Dr. Olayo González y el Dr. Axayácatl Morales por creer en mí, por sus valiosas enseñanzas y llenarme de su entusiasmo.

A la Dra. Yessica Heras, que con su apoyo constante como médica veterinaria, investigadora, referente y amiga, me abrió un mundo de nuevas posibilidades.

A la Dra. Iris Feria, la Dra. Anabel Jiménez, el Dr. Luis Concha, el Dr. Ernesto Roldán y el Dr. Gustavo Pacheco quienes enriquecieron este trabajo con su visión y perspectiva.

Al Dr. Luis Tovar y Romo por su confianza, su tiempo y valiosos aportes a este trabajo.

A la Dra. María de los Ángeles Guerrero Aguilera responsable del Bioterio de la UAM-I, que gracias a su amabilidad y sus enseñanzas sobre bienestar animal, fue posible sobrellevar el reto emocional de manejar animales paralíticos.

A la Dra. María del Rocío Ortiz Pedroza, quien siempre estuvo dispuesta a ofrecer su experiencia y equipos necesarios para entender los fenómenos electrofisiológicos alterados tras una lesión de médula espinal.

A Rafa, Uriel, Marco, Eric y todo el equipo del CI3M quienes me dieron la confianza para utilizar el equipo de resonancia magnética y me compartieron su experiencia para adquirir mejores imágenes.

A Martín, por su disposición y sus consejos en el manejo de animales lesionados.

A Luz Montaña, Gamaliel Clares, Graciela Ruiz, Katerin Pimentel, Gabriela Sánchez, Berenice Guzmán, Carolina Ochoa, Jazmín Vázquez, Gloria Sánchez, Diana Laura Aguilar y Gustavo García por su contribución en el cuidado de los animales.

A Jocelyn Alvarado, Teresa Gómez, Daniel Ruiz, amigas y amigos, por su invaluable apoyo.

A la Dra. Araceli Díaz por su generosidad y confianza.

A Marina, Cristina Aranda, Sandra Daniela Rodríguez Montaña, el Dr. Abraham Rosas-Arellano y la Dra. Ruth Rincón-Heredia por su valiosa contribución a este trabajo.

## Resumen

La lesión de médula espinal (LME) es una condición que afecta la función motora, sensorial y autonómica. Cada año, se reporta una incidencia de entre 40 y 80 casos de lesión traumática y no traumática de médula espinal (ME) a nivel mundial. Se estima que más de 27 millones de personas viven con esta condición. Independientemente del tipo de lesión primaria, ésta produce una serie de fenómenos en el sitio de la lesión llamada lesión secundaria, la cual agrava la condición del paciente, produce la formación de una cicatriz glial en fases crónicas, desconexión de circuitos neuronales y la falla de la regeneración tisular. A pesar de las diversas estrategias que se han propuesto para la recuperación de la función y la estructura tisular, actualmente no existen tratamientos efectivos para la LME.

El polímero de pirrol dopado con yodo sintetizado por plasma (pPPy-I) es un material biocompatible que se ha estudiado como implante en forma de partículas en suspensión en modelos de contusión y como pastilla en modelos de sección completa de ME. Estos estudios demuestran que el polímero facilita neuroprotección, presencia de neuronas y conos de crecimiento en el sitio de la lesión, mielinización, adhesión celular y supervivencia, diferenciación, moderación de la respuesta inflamatoria y los efectos de la lesión secundaria como quistes y formación de cicatriz glial, y finalmente la recuperación funcional motora. Aún faltan por explorarse otras formas de implante de este material que contribuyan a incrementar su eficacia.

En este trabajo se propone un andamio fibrilar de poliácido láctico (PLA), que cuenta con una alta relación superficie a volumen y espacio poroso, el cual se recubre con el pPPy-I integrando propiedades estructurales a las propiedades fisicoquímicas - semi conductoras del pPPy-I, para proporcionar un sustrato de anclaje para las células de soporte y neuronas, moderando los efectos del daño secundario para promover la recuperación estructural y funcional.

Después de caracterizar las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de los andamios y estudiar su comportamiento en cultivo, estos fueron implementados como tratamiento de la lesión por sección completa de ME en ratas.

A partir de la evaluación neurofuncional se mostró una recuperación significativamente superior en la locomoción de los animales implantados con los andamios recubiertos con pPPy-I respecto a los animales sin tratamiento después de 8 semanas de estudio. Para tratar de explicar esta recuperación, se realizaron estudios de resonancia magnética, incluyendo técnicas avanzadas tales como Imagenología por Tensor de Difusión (DTI) y espectroscopía (MRS). De esta forma se observó que para la semana 4 había tejido sobre los andamios, por lo que además se realizaron pruebas de conducción eléctrica a través de la lesión, para determinar si este nuevo tejido era funcional.

Finalmente, se estudiaron los tejidos por distintas tinciones histológicas y por inmunofluorescencia y se comprobó que entre las fibras de los andamios se encontraban células y proteínas asociadas a las neuronas. Además, se observó una disminución de los efectos del daño secundario tales como quistes en el grupo del andamio recubierto. Estos resultados sugieren que los andamios fibrilares de PLA recubiertos con pPPy-I presentan una estrategia potencial para el tratamiento de la sección completa de ME.

## Índice

Resumen.....	3
Índice .....	4
Índice de figuras .....	6
Índice de tablas .....	8
Lista de abreviaturas .....	9
Publicaciones.....	11
Desarrollo del documento.....	12
Capítulo 1. Marco teórico .....	13
1.1. Neuroanatomía estructural y funcional .....	13
1.2. Lesión de médula espinal .....	16
1.2.1. Modelos de lesión medular.....	17
1.2.2. Desarrollo del daño secundario .....	19
1.3. Antecedentes .....	20
1.3.1. Andamios como estrategia de reparación tisular .....	21
1.3.2. Polímero de pirrol sintetizado por plasma.....	22
1.4. Planteamiento y delimitación del problema.....	24
1.5. Hipótesis general.....	26
1.6. Objetivo general.....	26
1.6.1. Objetivos específicos.....	26
1.7. Procedimiento general.....	26
1.7.1. Fabricación y caracterización de los andamios fibrilares .....	26
1.7.2. Estudios <i>in vivo</i> .....	27
1.7.3. Modelo de lesión de médula espinal por sección completa.....	28
1.7.4. Estudio del desempeño del implante.....	28
1.8. Consideraciones bioéticas.....	29
1.8.1. Justificación académica para el uso, la especie y el número de animales.....	30
1.9. Análisis estadístico .....	30
Capítulo 2. Fabricación y caracterización de andamios recubiertos con polímero de pirrol.....	31
2.1. Caracterización fisicoquímica.....	32
2.1.1. Metodología .....	32
2.1.2. Composición química de los andamios .....	33

2.2. Caracterización morfológica.....	36
2.2.1. Metodología .....	36
2.2.2. Estructura de los andamios y morfología de las fibras .....	36
2.3. Caracterización biológica .....	38
2.3.1. Metodología .....	38
2.3.2. Respuesta de las células y el medio biológico a los andamios.....	39
Capítulo 3. Modelo de lesión de médula espinal por sección completa e implante de andamios recubiertos .....	43
3.1. Metodología .....	43
3.1.1. Preparación de los implantes y de los animales .....	43
3.1.2. Procedimiento quirúrgico .....	44
3.1.3. Cuidados postoperatorios .....	45
3.2. Resultados del modelo de sección completa.....	46
Capítulo 4. Evaluación de la respuesta funcional.....	48
4.1. Evaluación de la locomoción.....	48
4.1.1. Metodología .....	49
4.1.2. Recuperación motora de animales con LMESC.....	50
4.2. Electrofisiología.....	52
4.2.1. Potenciales evocados motores (PEMs) .....	53
4.2.2. Potenciales evocados somatosensoriales (PESs) .....	53
4.2.3. Anestesia .....	53
4.2.4. Metodología .....	54
4.2.5. Análisis de potenciales evocados en animales experimentales.....	58
Capítulo 5. Estudio de la estructura tisular por imagenología de resonancia magnética .....	61
5.1. Metodología .....	64
5.1.1. Adquisición .....	65
5.1.2. Procesamiento .....	66
5.2. Efecto del modelo de lesión e implantes en imágenes de resonancia magnética .....	68
5.2.1. Índices DTI .....	71
5.3. Espectroscopía .....	75
Capítulo 6. Histología e inmunofluorescencia .....	79
6.1. Metodología .....	81

6.1.1.	Cuantificación del tejido degenerado y quistes en las muestras completas .....	82
6.1.2.	Cuantificación de la marca de colágeno.....	82
6.1.3.	Cuantificación de marca PAS y violeta de cresilo.....	82
6.2.	Estudio del epicentro de la lesión por histología .....	84
6.3.	Inmunofluorescencia.....	87
	Discusión .....	92
	Conclusiones generales.....	96
	Resumen de aportaciones.....	97
	Limitaciones y perspectivas.....	98
	Bibliografía .....	100
	Anexos.....	119
	Escala BBB para la evaluación de la locomoción en ratas.....	119
	Parámetros adicionales de las secuencias de RM.....	121
	Preparación de soluciones para perfusión e inmunofluorescencia .....	123
	Materiales y reactivos .....	123
	Metodología .....	123
	Perfusión trans cardiaca.....	125
	Materiales .....	125
	Metodología .....	125
	Inmunofluorescencia.....	127
	Materiales y reactivos .....	127
	Metodología .....	127
	Publicaciones.....	128

## Índice de figuras

Figura 1.	Corte histológico longitudinal de ME con tinción de tricrómico de Masson. ....	14
Figura 2.	Localización de los tractos ascendentes y descendentes de la materia blanca.....	14
Figura 3.	Neuronas y células gliales marcadas con violeta de cresilo.....	15
Figura 4.	Inmunofluorescencia de la médula espinal.....	15
Figura 5.	Histología de una lesión de médula espinal por sección completa .....	20
Figura 6.	Secuencia de trabajo con los animales de estudio. ....	28
Figura 7.	Instrumentación para la fabricación de andamios fibrilares. ....	31
Figura 8.	Instrumentación para recubrimiento de andamios con pPPy-I. ....	32

Figura 9. Curvas DSC: Flujo de calor respecto a la temperatura.....	34
Figura 10. Ángulo de contacto del agua sobre los andamios.....	35
Figura 11. Procesamiento y segmentación de poros bidimensional en imágenes de MEB.....	36
Figura 12. Distribución de diámetros de las fibras.....	37
Figura 13. Porosidad aparente de los andamios.....	37
Figura 14. Distribución de áreas de poro de los andamios fabricados y en cultivo.....	38
Figura 15. Análisis morfológico de las células NG108-15 cultivadas sobre los andamios. ....	40
Figura 16. Viabilidad celular por la prueba MTT.....	41
Figura 17. Efecto del diámetro de las fibras en la viabilidad celular.....	42
Figura 18. Implantes fibrilares de PLA, PLA+pPPy-I y apósito de PLA+pPPy-I.....	44
Figura 19. Procedimiento quirúrgico.....	45
Figura 20. Acondicionamiento del hábitat para animales parapléjicos.....	46
Figura 21. Espacio acondicionado para movimiento voluntario libre.....	46
Figura 22. Número de animales sobrevivientes.....	47
Figura 23. Evolución del peso corporal en los animales de estudio. ....	47
Figura 24. Espacio para la evaluación de la locomoción en campo abierto. ....	49
Figura 25. Análisis de locomoción en pasarela. ....	50
Figura 26. Capturas de la locomoción a la primera semana después de la lesión.....	50
Figura 27. Capturas de la locomoción de un animal implantado con PLA+pPPy-I cuatro semanas después de la lesión.....	51
Figura 28. Capturas de la locomoción a la semana 8 después de la lesión del animal implantado con PLA+pPPy-I (mismo caso).....	51
Figura 29. Puntuación en la escala BBB de animales de estudio durante 8 semanas. ....	52
Figura 30. Instrumentación de registro de potenciales evocados.....	55
Figura 31. Instrumentación para la adquisición de potenciales evocados. ....	56
Figura 32. Procesamiento de los potenciales evocados. ....	57
Figura 33. PEMs en vías intactas.....	58
Figura 34. PEMs registrados tras 8 semanas de estudio en Control y PLA+pPPy-I.....	58
Figura 35. Comparación PEMs entre grupos de estudio.....	59
Figura 36. Potenciales evocados somatosensoriales de las patas traseras. ....	60
Figura 37. Esquema de la difusión en los tractos neuronales.....	62
Figura 38. Espectro de RM de la médula espinal de una rata intacta.....	64
Figura 39. Preparación de los animales para los estudios de RM.....	64
Figura 40. Región de adquisición de las imágenes por tensor de difusión.....	65
Figura 41. Adquisición del espectro de RM.....	66
Figura 42. Procesamiento de imágenes anatómicas.....	67
Figura 43. Segmentación de la médula por la orientación de los tractos longitudinales del DTI ....	67
Figura 44. Imágenes representativas de RM a la semana 1.....	68
Figura 45. Imágenes representativas de RM a la semana 4.....	69
Figura 46. Imágenes representativas de RM a la semana 8.....	70
Figura 47. Volumen de los tractos en animales intactos y de los control, PLA y PLA+pPPy-I a la semana 1, 4 y 8. ....	71

Figura 48. Representación de la difusión del agua en los tejidos por tensores.....	72
Figura 49. Índices DTI en la semana 1.....	73
Figura 50. Índices DTI en la semana 4.....	73
Figura 51. Índices DTI en la semana 8.....	74
Figura 52. Espectroscopía del sitio de la lesión e implante. ....	76
Figura 53. Evolución de la creatina en ratas con LMESC y andamios fibrilares. ....	77
Figura 54. Evolución de NAA/Cr y NAA/Cho. ....	78
Figura 55. Evolución de Cho.....	78
Figura 56. Neuronas marcadas con violeta de cresilo. ....	79
Figura 57. Médula espinal sin lesión con tinción de PAS. ....	80
Figura 58. Epicentro de la lesión de un animal control teñido con tricrómica de Masson.....	80
Figura 59. Médula espinal marcada por inmunofluorescencia.....	81
Figura 60. Procedimiento para la cuantificación de quistes y tejido degenerado.....	82
Figura 61. Procedimiento para la identificación y cuantificación de la marca de colágeno tipo I....	82
Figura 62. Procedimiento para la identificación y cuantificación de tinciones histológicas.....	83
Figura 63. Epicentro de la lesión e implante por varias tinciones histológicas y cuantificación.. ....	84
Figura 64. Imágenes representativas de un animal control, PLA y PLA+pPPy-I por distintas técnicas imagenológicas.....	86
Figura 65 . Inmunofluorescencia de médula intacta.....	88
Figura 66. Inmunofluorescencia de médula implantada con PLA.....	88
Figura 67. Separación por canales de imágenes de inmunofluorescencia .....	89
Figura 68. Inmunofluorescencia de médula implantada con PLA+pPPy-I. ....	90
Figura 69. Esquema del procesamiento de imágenes de inmunofluorescencia.....	90
Figura 70. Evidencia de neuronas proyecciones citoplasmáticas neuronales en el implante. ....	91
Figura 71. Perfusión trans cardiaca y extracción de muestras para análisis histológico. ....	126

## Índice de tablas

Tabla 1. Línea de tiempo de la investigación del pPPy-I y la LME.....	23
Tabla 2. Intensidad de picos característicos y grado de cristalinidad de las muestras rPLA (PLA en configuración aleatoria), aPLA (PLA en configuración orientada), y los andamios recubiertos con el polímero por plasma. Adaptada de <sup>83</sup> .....	34
Tabla 3. Propiedades térmicas de los materiales que constituyen los andamios. Adaptada de <sup>83</sup> ... 35	35
Tabla 4. Interpretación del contraste en IRM .....	61
Tabla 5. Escala de Basso, Beattie, Bresnahan: 21 puntos con definiciones operativas de categorías y atributos para evaluar la locomoción de las ratas <sup>18</sup> .....	119

## Lista de abreviaturas

<b>(ap)PLA+pPPy-I</b>	Apósito de PLA+pPPy-I
<b>Aa</b>	Área bajo la curva de DRX correspondiente al componente amorfo
<b>Ac</b>	Área bajo el pico de cristalinidad de la curva de DRX
<b>AD</b>	Difusividad axial
<b>aPLA</b>	PLA en configuración alineada
<b>A<sub>T</sub></b>	Área total bajo la curva de DRX
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BBB</b>	Escala de evaluación de la locomoción en ratas con LME
<b>BMSCs</b>	Células estromales de médula ósea
<b>Cho</b>	Colina
<b>CI3M</b>	Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica
<b>CMAP</b>	Potencial de acción compuesto
<b>Cr</b>	Creatina
<b>Cr2</b>	Fosfocreatina
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>DTI</b>	Imagenología por Tensor de Difusión (DTI) y (MRS)
<b>DTT</b>	Tractografía del tensor de difusión
<b>EC</b>	Epicentro
<b>ESM</b>	Error estándar de la media
<b>FA</b>	Fracción de anisotropía
<b>FDP</b>	Función de densidad de probabilidad
<b>FOV</b>	Campo de visión
<b>Glx</b>	Glutamato-glutamina-GABA
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>I</b>	Yodo
<b>IH</b>	Infinite Horizon Impactor
<b>IR-ATR</b>	Espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada
<b>IRM</b>	Imagen por resonancia magnética
<b>Lac</b>	Lactato
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LME</b>	Lesión de médula espinal
<b>LMEC</b>	Lesión de médula espinal por contusión
<b>LMESC</b>	Lesión de médula espinal por sección completa
<b>MAP2</b>	Proteína asociada a microtúbulos 2
<b>MD</b>	Difusividad media
<b>ME</b>	Médula espinal
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido

<b>ml</b>	Myo-inositol
<b>MRS</b>	Espectroscopía por resonancia magnética
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NAA</b>	N-acetil aspartato
<b>NH</b>	Grupo amino
<b>NSA</b>	Número de señales promediadas
<b>PA</b>	Porosidad aparente
<b>PANI</b>	Polianilina
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>PB</b>	Buffer de fosfatos
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PD</b>	Patas delanteras
<b>PEMs</b>	Potenciales evocados motores
<b>PESs</b>	Potenciales evocados somatosensoriales
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PLA</b>	Poliácido láctico
<b>PLA+pPPy-I</b>	PLA recubierto con pPPy-I
<b>PNS</b>	Estimulación de nervios periféricos (peripheral nerve stimulation)
<b>PP</b>	Patas posteriores
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>pPPy-I</b>	Polímero de pirrol dopado con yodo sintetizado por plasma
<b>PPy</b>	Polipirrol
<b>PRESS</b>	Secuencia <i>point-resolved</i>
<b>Py</b>	Pirrol
<b>RD</b>	Difusividad radial
<b>RF</b>	Radiofrecuencia
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>rPLA</b>	PLA en configuración aleatoria
<b>SAR</b>	Tasa de absorción específica (specific absorption rate)
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNR</b>	Relación señal a ruido
<b>T9</b>	Vértebra torácica 9
<b>TBS</b>	Tris buffer salino
<b>TBSTn</b>	TBS con Tritón al 0.5%
<b>Tcc</b>	Temperatura de cristalización en frío
<b>TE</b>	Tiempo de eco
<b>Tg</b>	Temperatura de transición vítrea
<b>TGA</b>	Termogravimetría
<b>Tm</b>	Temperatura de fusión
<b>Tm<sub>1</sub></b>	Temperatura de fusión menor
<b>TR</b>	Tiempo de repetición

## Publicaciones

En el transcurso de este proyecto, surgieron las siguientes publicaciones:

1. Osorio-Londoño, D. M., Sánchez-Morales, G. S., García-García, G., Morales-Guadarrama, A., & Olayo-González, R. (2021). **Pyrrole Plasma Polymer-Coated Fibrillar Scaffold Implant: Pilot Study in Rat Spinal Cord Transection with MRI**. En *43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)* (pp. 1218-1221). IEEE.
2. Osorio-Londoño, D. M., Godínez-Fernández, J. R., Acosta-García, M. C., Morales-Corona, J., Olayo-González, R., & Morales-Guadarrama, A. (2021). **Pyrrole plasma polymer-coated electrospun scaffolds for neural tissue engineering**. *Polymers*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/polym13223876>.

Los documentos en extenso se muestran en los anexos.

Adicionalmente, se presentaron los siguientes trabajos de congreso:

1. **Characterization of Pyrrole Plasma Polymer-Coated Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Repair**. MACROMEX 2021 (en línea)
2. **Propiedades de andamios recubiertos de pPPy y pPPy-I y su interacción con sistemas neuronales**. II Congreso de Neuro-Biomateriales 2021 (en línea)
3. **Acute response evaluation of a PLA-pPPy/I scaffold implant by MRI in a rat spinal cord transection model**. Polymer-Connect 2022 (Italia, Roma)

## Desarrollo del documento

En el capítulo 1 se presenta la base teórica del trabajo:

- Neuroanatomía estructural y funcional (normal).
- Lesión de médula espinal: modelos patológicos, fases del daño secundario.
- Antecedentes directos: andamios y pPPy-I en LME.
- Planteamiento del problema, hipótesis, objetivos.
- Procedimiento general desarrollado.

En el capítulo 2 se presenta el desarrollo y caracterización de los implantes: electrohilado, la técnica de síntesis por plasma, caracterización fisicoquímica y morfología (diámetro de las fibras y tamaño del implante/apósito).

En el capítulo 3 se describe el desarrollo del modelo de lesión por sección completa en ratas.

El capítulo 4 muestra la evaluación de la respuesta funcional a través del análisis de locomoción y conductividad bioeléctrica (potenciales evocados motores y somatosensoriales).

El capítulo 5 consiste en la evaluación del efecto de los implantes por resonancia magnética (RM), mediante secuencias anatómicas ponderadas en T1W-3D y T2W; análisis del Tensor de Difusión (DTI), tractografía (DTT), fracción de anisotropía (FA), difusividad media (MD), difusividad axial (AD) y radial (RD); análisis de la concentración de metabolitos fisiopatológicos en el sitio de lesión e implante mediante el espectro por RM.

En el capítulo 6 se aborda la histología e inmunofluorescencia de las muestras obtenidas tras 8 semanas de estudio, incluyendo el análisis de la microestructura de la zona de lesión por tinciones inespecíficas de hematoxilina-eosina (HE), tricrómica de Masson (marca de colágena), proteoglicanos y lámina basal (PAS), violeta de cresilo (marca de neuronas y glía), y tinción específica de neuronas (proteína asociada a microtúbulos, MAP2).

Los resultados son analizados en la Discusión y finalmente se exponen las Conclusiones generales, Limitaciones y trabajo a futuro.

## Capítulo 1. Marco teórico

Las lesiones de médula espinal (LME) son padecimientos devastadores ya que afectan severamente al individuo que la padece así como a sus familias, en los diversos ámbitos de su vida, no solamente en su calidad de vida sino en su economía y sus relaciones sociales, además de asociarse con una muerte prematura <sup>1</sup>. Es un problema de salud pública, ya que la mayoría de los pacientes son excluidos y se vuelven dependientes, considerando además que la mayoría de ellos están en etapa productiva <sup>2</sup>.

La OMS reporta que la incidencia mundial de las LME tanto traumáticas como no traumáticas se encuentra entre 40 y 80 casos por millón de habitantes, por lo que se estima que, cada año, entre 250.000 y 500.000 personas sufren una LME <sup>3</sup>, siendo en su mayoría hombres con una edad promedio de 33 años <sup>4,5</sup>. En México, así como en muchos países de ingreso medio o bajo, no existen registros actualizados dedicados a documentar la incidencia y prevalencia de las lesiones medulares <sup>6</sup>, el último estudio realizado reportó una incidencia anual de LME de 18.1 por millón de habitantes, con una ocurrencia más frecuente en hombres en edad productiva, entre 16 y 35 años <sup>7</sup>. A nivel mundial, esta incidencia es máxima en la edad adulta temprana, aunque actualmente, dado el aumento en la expectativa de vida, el perfil está cambiando y la tendencia incluye mujeres y ancianos <sup>5,6,8</sup>.

Las causas principales de las LME son los accidentes de tránsito, las caídas y la violencia (impacto de arma de fuego y arma blanca), aunque las LME no traumáticas parecen estar en aumento, tales como aquellas causadas por cáncer u otras enfermedades como la osteoporosis <sup>1,4</sup>. Cada una de las LME implica diversos mecanismos fisiopatológicos que determinan el tipo de tratamiento implementado para tratar de contribuir a la recuperación del paciente. Por lo tanto, conocer la fisiología natural de la médula espinal (ME), así como los mecanismos fisiopatológicos relacionados con cada tipo de lesión es clave en el proceso de diseño de tratamientos adecuados.

### 1.1. Neuroanatomía estructural y funcional

La ME es parte del sistema nervioso central (SNC), extendiéndose caudalmente desde el cerebro, protegida por la columna vertebral. Está recubierta por las tres membranas protectoras del SNC: la duramadre, la aracnoides y la más interna, la piamadre. La duramadre es un tejido fibroso resistente, mientras que la piamadre es suave, está altamente vascularizada y en íntimo contacto con la ME. Entre la piamadre y la aracnoides fluye el líquido cefalorraquídeo (LCR), en el espacio denominado subaracnoideo <sup>9,10</sup>.

A diferencia del cerebro, en la ME la materia gris está rodeada por la materia blanca en su circunferencia <sup>11</sup>, como se muestra en la Figura 1. A cada lado de la ME, las fisuras laterales anteriores y posteriores representan los puntos donde las raíces ventrales y dorsales emergen de la ME para formar los nervios espinales <sup>9,12</sup>.

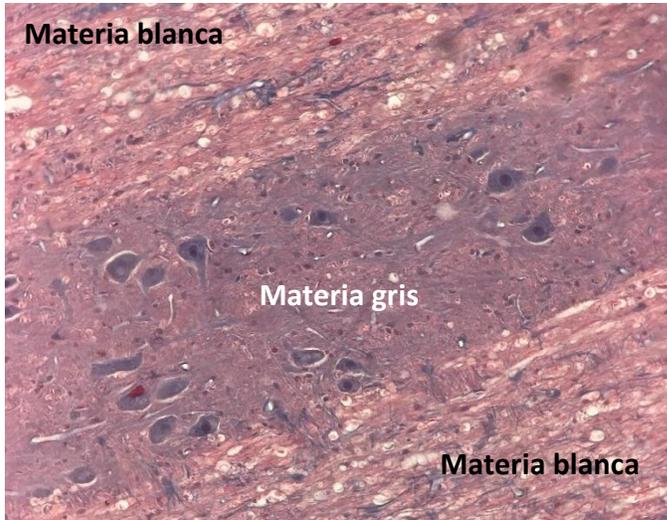


Figura 1. Corte histológico longitudinal de ME con tinción de tricrómico de Masson.

La materia blanca constituye las fibras o axones que conectan secciones de la materia gris y, en su mayoría, se compone de fibras mielinizadas. La materia gris, que se compone principalmente de neuronas, interneuronas y células gliales, es donde llevan a cabo las sinapsis. Además, la materia blanca se encuentra organizada en tractos o conjuntos de fibras, las cuales se clasifican de acuerdo con las regiones que conectan <sup>9,12</sup> (Figura 2).

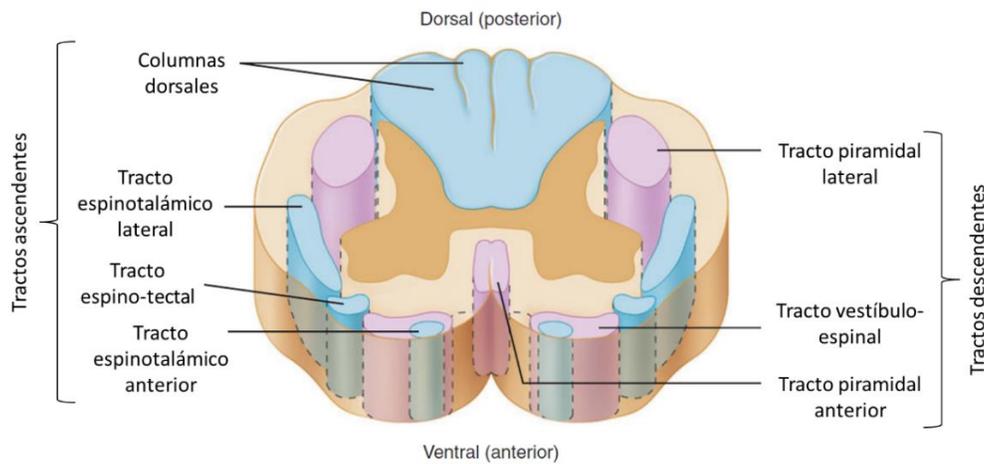


Figura 2. Localización de los tractos ascendentes y descendentes de la materia blanca. Modificada de <sup>9</sup>.

Las fibras aferentes, las cuales transmiten información desde la periferia hacia el SNC, terminan en las astas dorsales, mientras que las fibras eferentes se originan en las astas ventrales y se extienden hacia la periferia <sup>9,12</sup>.

Los tractos de la materia blanca comunican los diferentes niveles de la ME, así como éstos con el cerebro, siendo estos bilaterales, es decir, cada uno de los tractos se encuentra a cada lado de la

ME (Figura 2). Los tractos de la materia blanca se podrían clasificar en dos, según su función: los ascendentes y descendentes. Los tractos ascendentes transmiten información hacia el cerebro y los tractos descendentes transmiten información desde el cerebro <sup>9,13</sup>.

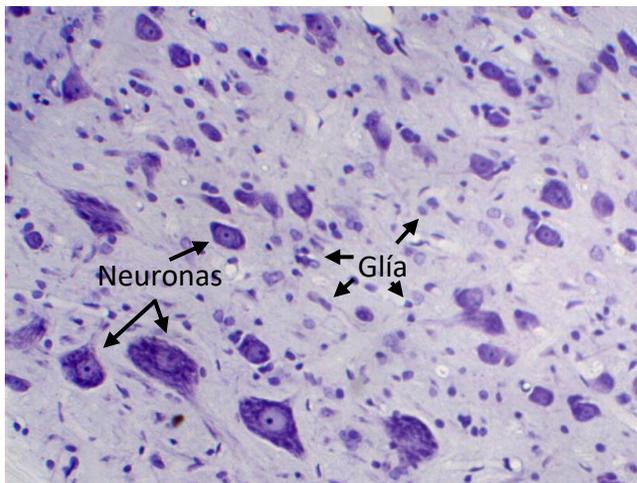
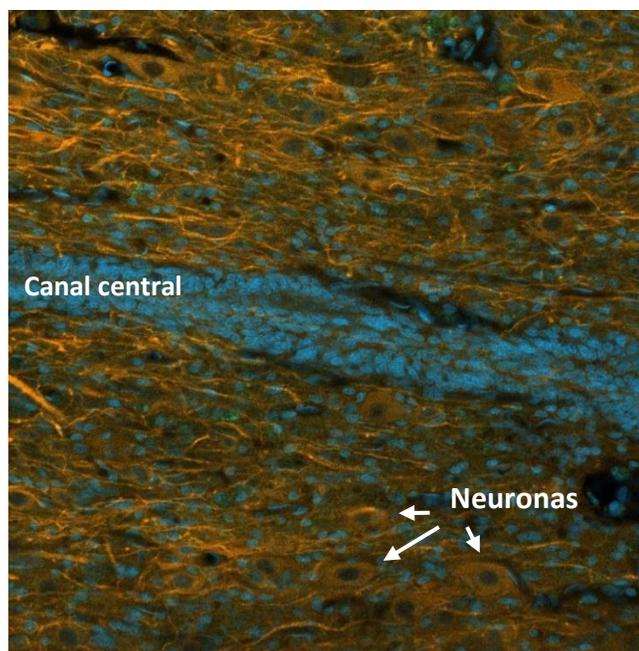


Figura 3. Neuronas y células gliales marcadas con violeta de cresilo.

Figura 4. Inmunofluorescencia de la médula espinal. La marca color naranja es proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), que se encuentra específicamente en el citoplasma de las neuronas. La marca azul (DAPI) son núcleos de células gliales y neuronas. El canal central está cubierto por células ependimarias.



Aunque hablar del sistema nervioso implica naturalmente hablar sobre neuronas, el 75-90% del sistema nervioso se compone de células no excitables, las células gliales o la neuroglia (Figura 3 y Figura 4), que es un conjunto de células de soporte estructural y funcional a las neuronas: los astrocitos, la microglía, células ependimarias, células de Schwann y oligodendrocitos <sup>9,14</sup>.

Los astrocitos conforman la mayor cantidad de células gliales del SNC formando un vínculo estructural y funcional entre neuronas y células gliales, el LCR y los vasos sanguíneos. Los astrocitos

dirigen el desarrollo de capilares especiales que controlan el transporte y el paso de ciertas moléculas entre la sangre y el SNC, formando una estructura compleja denominada barrera hematoencefálica. Los astrocitos, además, guían el desarrollo neuronal, en especial de las neuritas, para que estas se dirijan a su destino correcto y regulan el desarrollo y mantenimiento de las sinapsis. Posiblemente, también participan en la regeneración de axones dañados<sup>9</sup>. Los astrocitos responden a diversos efectos perjudiciales al SNC, a través de la proliferación de los llamados astrocitos reactivos. Mediante este proceso se forma la denominada cicatriz glial, la cual, aunque es un proceso de reparación del tejido afectado, se considera un mecanismo que impide la elongación y regeneración de los axones en el SNC<sup>14</sup>. En conjunto con la microglía, los astrocitos protegen el sistema de sustancias tóxicas, especialmente del estrés oxidante<sup>1</sup> y de los residuos celulares<sup>9</sup>.

Los oligodendrocitos son pequeños cuerpos celulares, que se agrupan en filas alrededor de axones mielinizados. Así como las células de Schwann en el sistema nervioso periférico, los oligodendrocitos forman la capa de mielina de las fibras nerviosas en el SNC. Esta capa de mielina provee un aislamiento e incrementa la velocidad de conducción de las fibras nerviosas. A diferencia de las células de Schwann, los oligodendrocitos tienen varios procesos celulares y pueden mielinizar varios segmentos o varias fibras nerviosas<sup>13</sup>.

La microglía protege al sistema nervioso de materia extraña, como bacterias o residuos de células muertas, así como de estrés oxidante, utilizando mecanismos como la fagocitosis o la liberación de citocinas<sup>9</sup>. Se encuentran inactivas (M0) en el SNC normal, y proliferan ante daños al SNC (M1, M2)<sup>13</sup>.

Las células endoteliales rodean las cavidades del cerebro y el canal central de la ME. Ellas facilitan el flujo de LCR mediante sus cilios<sup>13</sup>. El canal central se encuentra en el centro de la ME y se considera un nicho neurogénico, al poseer células madre neurales latentes, que pueden diferenciarse en determinadas condiciones a neuronas y células gliales<sup>15</sup>.

Esta organización estructural y funcional se ve afectada de diversas formas ante una lesión, dependiendo de su tipo.

## 1.2. Lesión de médula espinal

La lesión más común es aquella que resulta de un impacto repentino sobre la columna, en la cual se fracturan o dislocan vértebras, cuyos fragmentos pueden lesionar el tejido medular. Los mecanismos de lesión más comunes son: el impacto más la compresión persistente o transitoria, la distensión y laceración. Independientemente del tipo de lesión, este tipo de fuerzas afectan directamente tanto tractos ascendentes y descendentes como vasos sanguíneos y membranas celulares, constituyéndose el daño primario, el cual determina la severidad de la lesión medular<sup>16</sup>.

---

<sup>1</sup> El estrés oxidante es un desbalance entre la manifestación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la habilidad del sistema biológico para neutralizar rápidamente los intermediarios reactivos o reparar el daño resultante.

Para tratar de replicar los mecanismos de lesión y poder estudiarlos detalladamente de forma controlada, así como para la investigación de nuevos tratamientos, se utilizan los modelos animales de lesión medular, en los cuales se utilizan dispositivos diseñados para imitar las fuerzas que se presentan en el daño primario <sup>17</sup>. Las más utilizadas, por su reproducibilidad, se mencionan a continuación.

#### 1.2.1. Modelos de lesión medular

Los diversos modelos de LME se han implementado en animales con el objetivo de estudiar los mecanismos de la lesión, así como los efectos de las diversas estrategias de tratamiento. Actualmente, los animales más comúnmente empleados son la rata y el ratón, por su disponibilidad, facilidad de mantenimiento y bajo costo que animales más grandes como los primates. Sin embargo, la rata se considera el modelo de roedor que mejor se aproxima a los fenómenos que caracterizan la fisiopatología, electrofisiología, función y morfología de la lesión medular en el humano; donde la lesión evoluciona en forma de cavidades en el epicentro de la lesión, al igual que en la rata <sup>16</sup>.

La LME además tiene consecuencias funcionales, entre las que destacan la discapacidad motora. En particular, las lesiones a nivel torácico en la rata afectan el movimiento del tren posterior del animal. La evolución de la movilidad en las LME se evalúa comúnmente utilizando la escala BBB <sup>18</sup>. Esta escala es una herramienta que incluye 22 puntos, donde 0 corresponde a la ausencia total de movimiento en las extremidades posteriores, y 21 a la locomoción normal, es decir, marcha coordinada con pasos plantares consistentes, despliegue de dedos, posicionamiento paralelo de las patas, estabilidad del tronco y cola levantada consistentemente <sup>18</sup>.

##### 1.2.1.1. Compresión

Estos modelos simulan aquellas lesiones donde fragmentos de hueso se rompen y comprimen el tejido medular, ya sea por una flexión o compresión axial o lesiones no traumáticas, como la fuerza compresiva de un tumor hacia la ME <sup>19</sup>. Además, se utilizan para investigar los efectos de la duración de la compresión, dado que el momento de la descompresión impacta sobre la magnitud de la lesión en humanos <sup>20</sup>.

Para llevarlos cabo se han empleado los fórceps calibrados, los clips de aneurisma/vasculares o el globo <sup>20</sup>. Estos modelos tienen en común que no se pueden registrar los parámetros de la fuerza aplicada a la ME mientras se lleva a cabo la técnica, pero en general son de bajo costo, y en algunos casos altamente consistentes y reproducibles <sup>21</sup>. Para llevarlos a cabo, se requiere laminectomía, sin embargo, para el modelo del globo únicamente se requiere insertar un catéter a través del hueso, por lo que la técnica es menos invasiva, aunque es mucho menos reproducible respecto a las demás y se reportan inconsistencias respecto a la lesión inducida <sup>21</sup>.

Los fórceps calibrados aplican una fuerza a cada lado de la ME, controlando la severidad en función de la distancia mínima de apertura, es decir, la relación entre la severidad de la lesión es inversa respecto a la distancia de apertura de los fórceps, y es directa respecto a la duración de la compresión. Sin embargo, no se registra la fuerza aplicada durante el proceso, y la velocidad de cierre de los fórceps no es un parámetro reportado <sup>19,21</sup>.

La compresión por clip vascular es un modelo muy utilizado ya que simula la fuerza aplicada por un impacto inicial de “alta” velocidad seguido de una compresión de mayor duración (segundos a minutos) que en los modelos de contusión, por lo que es considerado de contusión-compresión <sup>16</sup>. Es un método relativamente simple y de bajo costo, ya que sólo se requiere el clip vascular modificado para aplicar una fuerza determinada (de 35-50 g para una lesión moderada a severa). Además, en contraste a los modelos contusivos, la lesión se aplica tanto ventral como dorsalmente. Sin embargo, este modelo requiere de una laminectomía a un área suficiente que permita la aplicación del clip y existe el riesgo de lesionar los nervios espinales, por lo que se deben retirar de la trayectoria del clip lo mejor posible. Además, se debe tener en cuenta que en este modelo no se registra la fuerza aplicada durante el proceso ni la velocidad de cierre del clip, con el riesgo de que el mecanismo puede perder fuerza a medida que se va empleando en cada sujeto <sup>17,22,23</sup>.

#### 1.2.1.2. Contusión

Este tipo de modelos simulan lesiones traumáticas como caídas o impactos sobre la columna que resultan en fracturas de las vértebras seguidas de la compresión de la ME. Para lograr modelos reproducibles de este tipo, se utilizan dispositivos que permiten la caída de un objeto de dimensiones específicas sobre la ME, lo que indica que la laminectomía es necesaria. Actualmente, existen dispositivos comerciales que se han utilizado ampliamente dada la similitud entre la lesión inducida y la lesión traumática en humanos. Los más comunes son el NYU Impactor, el Infinite Horizon (IH) Impactor y el OSU Electromagnetic Spinal Cord Injury Device (ESCID) <sup>20</sup>.

El modelo contusivo establece una lesión de un impacto rápido con una compresión transitoria, lo cual simula parcialmente las lesiones más comunes en humanos. El IH Impactor permite agregar un periodo de compresión adicional al impacto de hasta 60 s, sin embargo la velocidad del impacto no supera los 0.13m/s, mientras que el NYU Impactor puede impactar la ME con una velocidad desde 0.33m/s hasta 0.9 m/s, dependiendo de la altura definida por el diseño experimental, pero sin la posibilidad de controlar la duración del impacto ni los múltiples impactos asociados al “rebote del peso” sobre la ME, dada su biomecánica <sup>16,17,24,25</sup>.

Dado que en la clínica se reportan velocidades de impacto que exceden 1m/s, además de que intuitivamente se puede pensar que la velocidad tiene una relación directa con la severidad de la lesión por las propiedades mecánicas de la ME, se han planteado métodos que permitan impactos a mayores velocidades. Dos propuestas son el LISA y el Impact One de la marca Leica, donde éste último es más comúnmente aplicado en modelos de lesión cortical <sup>22,25,26</sup>. Estos dispositivos alcanzan velocidades de hasta 2 y 6 m/s respectivamente, sin embargo, los resultados muestran diferencias importantes respecto a la velocidad de impacto y la severidad de la lesión si se alcanza cierto umbral de profundidad del impacto o magnitud de tejido desplazado superior a los 900 µm en el modelo de rata <sup>27-29</sup>.

Adicionalmente, algunos dispositivos ofrecen la oportunidad de mantener un tiempo de compresión después del impacto tal como los ya mencionados IH Impactor y LISA <sup>24,25</sup>, o los clips vasculares, de manera que se genera un modelo de contusión-compresión. Los modelos de contusión-compresión se utilizan en investigación traslacional ya que presentan similitudes a la lesión traumática de ME, por ejemplo, la formación de cicatriz glial en estadios crónicos. Es por ello que se utilizan para

investigar terapias neuroprotectoras, apoptosis, el daño secundario y tratamientos en etapas crónicas de la lesión <sup>20</sup>.

Sin embargo, en los modelos tanto contusivos como compresivos o la suma de ellos normalmente quedan intactos ciertos tractos, por lo que de ser utilizados en estudios sobre regeneración se pueden obtener resultados imprecisos <sup>20</sup>.

#### 1.2.1.3. Sección/laceración

Este modelo, aunque no es común a nivel clínico, es muy útil en estudios de regeneración celular y axonal, en terapias de trasplante de células y en análisis y recuperación de tractos y circuitos neuronales en los distintos niveles de la ME. Es un modelo estable, reproducible y contundente, ya que resulta en la interrupción de la continuidad de información neuronal hacia el cerebro, dado que se elimina la continuidad de los tractos de la materia blanca y se irrumpe totalmente la estructura de la materia gris en una sección de la ME <sup>16</sup>. Incluso, el modelo de laceración de un segmento de ME se ha aplicado en estudios donde se explora el tratamiento del modelo crónico, donde se retira el segmento correspondiente a la cicatriz glial, consecuencia del daño secundario <sup>30,31</sup>.

Para llevarlo a cabo se utilizan tijeras de microcirugía o bisturí para hacer un corte transversal de la ME, por lo que la laminectomía es indispensable. A diferencia de la lesión de médula espinal por contusión (LMEC), donde tractos ventrales pueden quedar intactos, la sección completa elimina la conexión entre los segmentos de la ME. Sin embargo, los mecanismos de la lesión secundaria, característica de las lesiones comúnmente reportadas en la clínica, son distintos a la que se observa en sección completa o laceración, por lo que modelos contusivos/compresivos son preferibles cuando se desea estudiar el desarrollo de la lesión secundaria <sup>20</sup>.

#### 1.2.2. Desarrollo del daño secundario

El daño secundario es un conjunto de mecanismos que inician dentro de los siguientes minutos posteriores a la lesión primaria a la ME, ya sea el impacto, compresión o perforación del tejido. Se divide de manera temporal en las fases aguda (<48 h), subaguda (48 h – 6 meses) y crónica (>6 meses) <sup>32,33</sup>.

La fase aguda consiste en un conjunto de cambios fisicoquímicos, muerte celular, isquemia por destrucción de vasos sanguíneos, ingreso de células y citocinas inflamatorias en el sitio de la lesión. La fase subaguda continúa con inflamación, excitotoxicidad<sup>2</sup>, apoptosis, desmielinización de axones sobrevivientes y degeneración axonal y el desarrollo de una cicatriz glial. Las células inflamatorias intentan eliminar los desechos de mielina, pero producen compuestos citotóxicos que incluyen radicales libres ( $O^{2-}$ , peróxido de hidrógeno y peroxinitrito), incrementando el daño tisular y acentuando las condiciones proinflamatorias <sup>33</sup>. La lesión secundaria evoluciona en la fase crónica con la formación de una cavidad quística, degeneración axonal progresiva, maduración de la cicatriz glial y reorganización de circuitos neuronales <sup>16,34</sup>.

---

<sup>2</sup> La excitotoxicidad es la sobreactivación de receptores al glutamato, un neurotransmisor excitatorio. De esta manera, la célula sufre daños internos por el exceso de entrada de iones de calcio.

La cicatriz glial es un fenómeno multifactorial conformado por un conjunto heterogéneo de células que incluye astrocitos reactivos, microglía, células endoteliales y fibroblastos, entre otras (Figura 5).

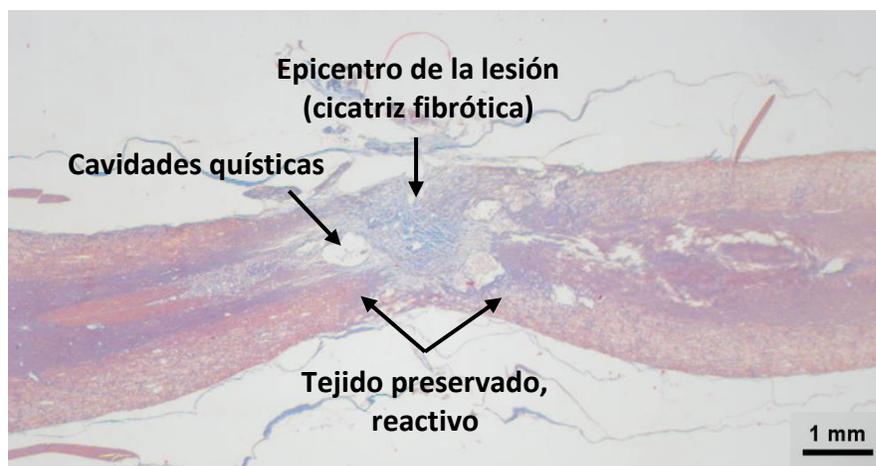


Figura 5. Histología de una lesión de médula espinal por sección completa. En este corte longitudinal de ME de rata obtenido 8 semanas después de una lesión por sección completa, se observa el epicentro de la lesión constituido por tejido conectivo, desprovisto de tejido neuronal, llamado cicatriz fibrótica. A los lados, se encuentra tejido preservado pero reactivo, que contiene glía reactiva y lleva a cabo procesos de reorganización de circuitos neuronales <sup>35</sup>.

Esta cicatriz limita la propagación de la inflamación hacia tejido sano, sin embargo, a largo plazo, en conjunto con la presencia de componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos de sulfato de condroitina, laminina, fibronectina, etc.), impide la diferenciación celular y la regeneración o propagación axonal durante las fases subaguda y crónica. Incluso, se ha detectado en humanos 42 años después de la lesión <sup>16</sup>.

La muerte celular y degeneración tisular producen la formación de cavidades quísticas que contienen líquido extracelular, macrófagos y tejido conectivo. Estas cavidades constituyen una barrera para la regeneración de axones, así como un sustrato que dificulta la migración celular <sup>33</sup>. Adicionalmente, la continua inflamación junto con la permanencia de mielina dañada participan en el mantenimiento de un ambiente inhibitorio para la neuro regeneración <sup>16</sup>. Todos estos componentes constituyen el fundamento de las terapias neuroprotectoras <sup>33</sup>.

### 1.3. Antecedentes

Las terapias que pretenden contribuir a la recuperación motriz y sensorial de sujetos con LME son diversas, desde las ya aplicadas a nivel clínico hasta experimentales, sin ofrecer aún una recuperación completa del tejido nervioso afectado <sup>36</sup>. Sin embargo, grandes esfuerzos se han concentrado en la recuperación motriz de modelos animales que quedan paráliticos tras una LME, tanto en modelos de laceración como en contusión, utilizando materiales bioactivos que promueven

interacciones celulares y aportan un cambio en el microambiente del sitio de lesión, reflejándose en la recuperación motora del tren posterior <sup>37</sup>.

### 1.3.1. Andamios como estrategia de reparación tisular

Desde el campo de la ingeniería de tejidos se han propuesto estrategias para restaurar la estructura y funcionalidad de los tejidos mediante sustratos biomiméticos diseñados como soporte de reparación y regeneración tisular <sup>38,39</sup>, denominados andamios. Idealmente, estos sustratos se plantean con la estructura óptima dirigida hacia una restauración funcional, sin rechazo del sistema inmune, buscando la formación de neot Tejido que pueda integrarse al huésped <sup>40,41</sup>. Adicionalmente, se busca que los materiales modulen la inflamación y los efectos del daño secundario mediante liberación de factores neurotróficos <sup>42,43</sup>, células y fármacos <sup>43,44</sup>, entre otros, mientras proveen un sustrato que permita la reconexión del tejido medular preservado <sup>45</sup>.

Entre los trabajos destacados con aplicación de andamios en LME se encuentra el de Hurtado y cols. (2011), quienes implantaron conductos de poliácido láctico (PLA), un polímero biodegradable, en forma de película o de fibras alineadas o aleatorias, como tratamiento de una laceración de 3mm de la ME en ratas. Estos conductos, que se colocaron entre los dos segmentos de la ME, contenían una solución de fibrinógeno en DMEM con CaCl<sub>2</sub>, aprotinina y gentamicina. Tras 4 semanas de estudio, se encontraron vasos sanguíneos en los conductos, así como fibras axonales en dirección rostro-caudal en los conductos de fibras alineadas, significativamente más largas que en conductos formados por película o fibras aleatorias. No obstante, los animales mostraron una limitada recuperación motora, logrando la movilidad de una o dos articulaciones (entre 2 y 3 puntos en la escala BBB), sin diferencias entre los grupos de estudio <sup>46</sup>.

La organización topográfica de los andamios es un factor que influye en la morfología del espacio poroso, entre otros efectos. Este factor interviene en la capacidad del andamio para promover la migración celular y factores tróficos. Cnops y cols. (2020) investigaron el efecto del empaquetamiento fibrilar de andamios electrohilados como tratamiento de la lesión por sección completa (LMESC). Aunque la hipótesis sugería que poros más amplios producirían un mejor efecto en la recuperación del tejido, observaron que una estructura más empaquetada favorecía el crecimiento axonal y reducía los efectos del daño secundario. Sin embargo, detectaron menor infiltración de vasos sanguíneos <sup>47</sup>. Estos resultados destacan la importancia de una estructura que provea un equilibrio entre el espacio poroso y la superficie de anclaje celular.

Existen diversos métodos de fabricación de andamios para ingeniería tisular <sup>48</sup>. Entre ellos, el electrohilado es una técnica que produce matrices constituidas por fibras nano y micrométricas con una alta relación superficie a volumen, que se pueden depositar en distintas configuraciones según la topografía deseada <sup>49</sup>. La porosidad de las matrices está dada por el depósito de las fibras en el colector, de manera que se pueden ajustar los parámetros del proceso de electrohilado para formar matrices con poros de tamaños y formas que produzcan una interacción con el tejido <sup>50</sup>. El tamaño de las células, la forma en la que estas se organizan son características que pueden influir en el diseño de la estructura del andamio.

En el campo de los materiales para ingeniería tisular es ideal que estos sean biocompatibles y preferiblemente que se puedan integrar adecuadamente al tejido <sup>48</sup>. Los polímeros naturales son materiales biodegradables ampliamente utilizados en ingeniería tisular aunque estos suelen complementarse con otros materiales para incrementar sus propiedades fisicoquímicas o mecánicas y mejorar sus efectos terapéuticos <sup>51</sup>.

Los polímeros conductores como el polipirrol (PPy) y la polianilina (PANI), son candidatos atractivos en la ingeniería de tejidos neurales por sus propiedades eléctricas, ya que las neuronas, como células excitables, responden a estímulos eléctricos. Sin embargo esos materiales no son biodegradables, sus propiedades mecánicas no se consideran acordes al tejido nervioso, y su potencial citotoxicidad e inmunogenicidad, asociadas con los agentes oxidantes utilizados en su proceso de síntesis son algunas limitaciones en su aplicación en ingeniería tisular <sup>52-55</sup>.

Una alternativa es la combinación de los polímeros conductores con materiales adecuados para su interacción con los tejidos. Algunos ejemplos son los polímeros naturales <sup>52,56</sup>, hidrogeles <sup>55,57</sup> y polímeros biodegradables <sup>58,59</sup>, entre otros. De esta manera, se pretende mejorar la interacción de estos materiales con el medio biológico mientras se aprovechan sus propiedades eléctricas.

Estudios con andamios de fibras de PLA+PPy orientadas demuestran el aumento de la conductividad eléctrica de los andamios, debidas a la presencia de las nanopartículas de PPy <sup>60</sup>. Este composito fue estudiado como tratamiento de la LMESC <sup>60,61</sup>, incorporando células estromales de médula ósea (BMSCs) <sup>61</sup>. Los estudios muestran reducción de cavidades quísticas y apoptosis, así como evidencia de regeneración axonal, mielinización de fibras y conducción de potenciales evocados motores (PEMs) a través del implante, sin embargo, la recuperación motora alcanzó alrededor de 6/21 puntos en la escala BBB en los animales implantados con el composito PLA+PPy+BMSCs. Esta recuperación funcional pudo haber sido limitada por las condiciones de síntesis del PPy, al ser una síntesis química, implica el uso de compuestos oxidantes como el FeCl<sub>3</sub>. El material podría tener trazas de estos compuestos oxidantes, afectando la respuesta tisular y la interacción con el tejido preservado, y limitando su funcionalidad.

### 1.3.2. Polímero de pirrol sintetizado por plasma

El pPPy-I es un material biocompatible <sup>62-69</sup>, que por su método de síntesis presenta propiedades eléctricas particulares en el medio biológico <sup>70,71</sup>, sin trazas de otros compuestos oxidantes que puedan producir respuestas adversas <sup>72</sup>. Según lo reportado por Cruz y cols., la conductividad eléctrica del pPPy varía entre 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-12</sup> S/cm. Cuando la humedad relativa (HR) de las muestras aumenta al 90%, la conductividad aumenta en tres órdenes de magnitud. El pPPy-I exhibió una conductividad de alrededor de 10<sup>-10</sup> S/cm en 30 % HR y aumentó a 10<sup>-6</sup> S/cm en 90 % de HR. En 92% HR la conductividad aumentó a 10<sup>-3</sup> S/cm y, por lo tanto, pPPy-I puede considerarse como un semiconductor <sup>71</sup>.

Este material ha demostrado efectos terapéuticos en la recuperación de LME en rata y en mono <sup>72-80</sup>, mediante la neuroprotección del tejido ante los efectos del daño secundario, lo cual favoreció la recuperación de la locomoción de patas posteriores. Estos efectos se atribuyen a la riqueza química

del pPPy-I, donde se destaca la presencia de aminas primarias y secundarias, nitrilos y secciones alifáticas que constituyen un material complejo con afinidad a integrinas que unen a la matriz extracelular <sup>71,81</sup>, lo cual podría explicar la capacidad de interacción celular del polímero.

La aplicación del pPPy-I como terapia en la LME traumática se ha reflejado en la recuperación motora, producida posiblemente por mecanismos de neuro-protección o regeneración axonal, por lo que se requiere mayor análisis para demostrar la presencia de dichos mecanismos. Además, el análisis del tejido por imagen de resonancia magnética (IRM) así como de la histología, muestra la capacidad del polímero para limitar la formación de cavidades quísticas asociadas al daño secundario de la LME, facilitar la presencia de neuronas y mielina, así como procesos de regeneración axonal en el epicentro de la lesión, en modelos por LMESC y LMEC <sup>73,74,79,80</sup>.

Además, se ha demostrado la funcionalidad de vías aferentes en animales implantados con pPPy y pPPy-I mediante estudios de potenciales evocados somatosensoriales (PESs). Cruz y colaboradores (2012) mostraron una recuperación significativa de latencia de los PESs en los grupos tratamiento con el implante de polímeros plasma, mientras que en los otros grupos la latencia aumentó para la semana 8 de estudio (componente N1: 218% en pPPy, 202% en pPPy-I, 347% en controles, 262% en pPPy/PEG; componente P1: 126% en pPPy, P1: 137% en pPPy-I, 220% en controles, 185% en pPPy/PEG). Además, al realizar la histología del tejido adyacente a la LME y a los implantes, se encontró que los implantes de pPPy y pPPy-I promovieron la neuroprotección dado que el área de tejido preservado fue significativamente superior comparados con los otros grupos. Este resultado permitió comprobar que los implantes promovían la recuperación motora y la conductividad de señales eléctricas a través de la presencia de tejido funcional <sup>76</sup>.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se presenta la línea de tiempo resumiendo el progreso de la investigación del pPPy-I como estrategia terapéutica de la LME.

Tabla 1. Línea de tiempo de la investigación del pPPy-I y la LME.

<b>Año</b>	<b>Autores</b>	<b>Resumen de los avances</b>	<b>Referencia</b>
1999	Cruz, G. J., Morales, J. y Olayo, R.	Síntesis y caracterización de polímeros de pirrol por plasma: análisis de su morfología, grupos funcionales, conductividad eléctrica y su relación con la humedad relativa.	<sup>71</sup>
2008	Olayo, R. y cols.	Implante de polímeros derivados del pirrol sintetizados por plasma en LMESC durante 30 días evaluados por histología.	<sup>73</sup>
2012	Cruz, G. y cols.	Implante de polímeros derivados del pirrol sintetizados por plasma en LMESC durante 8 semanas evaluados por PESs, BBB e histología.	<sup>76</sup>
2014	Zúñiga, E. y cols.	Evaluación morfológica y electrofisiológica de cultivos neuronales sobre superficies modificadas con pPPy.	<sup>64</sup>
2014	Zúñiga, E.	Evaluación morfológica y electrofisiológica de motoneuronas cultivadas sobre matrices electrohiladas de PLA recubiertas con pPPy.	<sup>82</sup>

2015	Álvarez, L. y cols.	Implante de polímeros derivados del pirrol sintetizados químicamente y por plasma en LMESC, evaluados por histología y BBB.	72
2015	Álvarez, L. y cols.	Evaluación del implante de pPPy-I en LMESC agregando rehabilitación por caminadora mediante BBB e histología.	78
2017	Mondragón, R. y cols.	Implante del polímero en fase subaguda de LMESC evaluado por IRM de 3T <i>in vivo</i> e histología, además de BBB.	74
2018	Fabela, O. y cols.	Se agrega albúmina y agua al pPPy-I para incrementar la concentración del polímero en el sitio de la LMESC, mostrando mejor respuesta funcional motora.	75
2019	Serratos, I. y cols.	Se demuestra <i>in silico</i> la interacción entre integrinas y grupos funcionales del pPPy y su origen molecular.	81
2020	Sánchez, S. y cols.	Detección de proteínas asociadas con plasticidad neuronal, regeneración neuronal y mielinización por inmunohistoquímica en tejidos con LMESC e implante de pPPy-I en conjunto con rehabilitación física (nado y ambiente enriquecido), además de recuperación funcional motora tras 8 semanas de tratamiento.	80
2021	Osorio, D. y cols.	Fabricación y caracterización de andamios electrohilados de PLA recubiertos con pPPy y pPPy-I: fisicoquímica, morfología y respuesta del medio biológico.	83
2022	Morales, A. y cols.	Implante de pPPy-I en LMESC en mono Rhesus evaluado por IRM-DTI.	79
2023	Coyoy, A. y cols.	Expresión de genes asociados con procesos de desarrollo, biogénesis, sinapsis, tráfico de vesículas sinápticas, proliferación, desarrollo celular, diferenciación celular, neurogénesis, desarrollo neuronal en animales con LMESC e implantes de pPPy-I + rehabilitación después de 4 semanas de tratamiento.	84

Aunque se ha planteado el uso de este polímero en conjunto con sustratos fibrilares como andamio para regeneración de otros tejidos <sup>62,65</sup>, su aplicación en la LME aún falta por estudiarse.

#### 1.4. Planteamiento y delimitación del problema

La LME es un padecimiento que en los casos más graves, además de afectar la sensibilidad y motricidad de los pacientes, afecta el sistema autónomo, el control de esfínteres, la respiración y el sistema cardiovascular <sup>1</sup>. Actualmente, no existen terapias que permitan una recuperación funcional completa del tejido medular ante una LME, sobre todo en las más severas <sup>85-88</sup>.

El SNC en el adulto tiene poca o nula capacidad de regeneración, ya que su respuesta ante una lesión produce un entorno que inhibe la capacidad regenerativa del tejido <sup>7,89</sup>. La inflamación persistente y la cicatriz glial crónica producen compuestos que conducen a la disminución de estímulos

asociados a la regeneración nerviosa <sup>4,90</sup>. Por lo tanto, expertos en el campo tienen la hipótesis de que, si se modula la formación de la cicatriz glial en conjunto con la modificación del microambiente del epicentro de la lesión, se promueve la reparación del tejido mediante la extensión de los axones y la sobrevivencia y migración de células gliales <sup>91</sup>. Sin embargo, esto no es trivial, ya que diversos estudios han tratado de modificar el ambiente tisular tras una lesión medular, obteniendo resultados alentadores, pero sin lograr hasta el momento una recuperación completa de la función motora, sensitiva y autonómica de los sujetos de estudio <sup>37,74,75,78,92</sup>, por lo que este tema sigue siendo un problema de investigación actual.

Adicionalmente, la respuesta de los sujetos ante la LME depende del tipo de lesión, y sus efectos dependen de la magnitud del tejido afectado. Aunque el modelo contusivo ha sido ampliamente estudiado ya que emula en gran medida el comportamiento de la LME en humanos, la tendencia de tratamiento en fase aguda a subaguda de estos modelos experimentales se basa en la microinyección de compuestos terapéuticos en la zona afectada de la ME, con el fin de minimizar daños adicionales al tejido por la aplicación del tratamiento <sup>74,75,78,80</sup>.

Sin embargo, según estudios realizados a nivel mundial, el 48.8% de los pacientes con LME requieren cirugía <sup>6</sup>. Teniendo en cuenta además que el tratamiento más eficaz que se ha utilizado hasta el momento para limitar el daño provocado por la LME es la descompresión quirúrgica en las primeras 24 h <sup>16</sup>, existe una ventana de oportunidad para implementar tratamientos que, a pesar de ser invasivos en etapas agudas, sean estratégicos en su mecanismo de acción <sup>93,94</sup>.

La ciencia de los biomateriales ha planteado propuestas para promover la recuperación del tejido medular lesionado, con resultados interesantes, en especial en modelos de lesión con pérdida de parte del tejido. Una de las propuestas consiste en el implante de andamios cuyo objetivo, además de la recuperación de la movilidad y sensibilidad del sujeto, es también la regeneración del tejido medular <sup>86,91,95,96</sup>. Este tipo de tratamiento es controversial ya que el implante de un material puede incrementar la presión en la ME y por lo tanto la aplicación de andamios terapéuticos se ha propuesto en conjunto con descompresión y desbridamiento del sitio afectado <sup>93,97</sup>.

La aplicación de un andamio que brinde dichos beneficios podría ser una estrategia de tratamiento para pacientes en estadios subagudos o crónicos, donde los efectos del daño secundario implican la pérdida de tejido funcional. Estos casos representan un área que requiere mayor investigación, ya que la lesión a nivel crónico sigue considerándose un problema con grandes desafíos para la comunidad científica y médica.

Teniendo estos elementos en cuenta, en este trabajo se plantea modelar mediante una LMESC en ratas la pérdida total de una sección de ME y promover la recuperación funcional aplicando un implante constituido por fibras y poros que ofrezcan un soporte para la adhesión, migración y elongación neurítica. Adicionalmente, dados los efectos neuroprotectores del pPPy-I demostrados en estudios previos, aún falta por explorar la combinación de este material con la aplicación de un andamio que le confiera propiedades topográficas al pPPy-I, con el fin de mejorar su desempeño terapéutico, considerando la complejidad estructural de la ME <sup>95</sup>.

### 1.5. Hipótesis general

Los implantes fibrilares electrohilados de PLA recubiertos con polímero de pirrol dopado con yodo sintetizado por plasma, implantados en un modelo de LMESC facilitarán la recuperación funcional como plataforma de migración y adhesión celular.

### 1.6. Objetivo general

Estudiar el efecto de andamios fabricados por electrohilado de PLA recubiertos con pPPy-I como tratamiento de una LMESC en un modelo animal de rata a través de técnicas de evaluación funcionales y estructurales.

#### 1.6.1. Objetivos específicos

1. Fabricar andamios de PLA por la técnica de electrohilado y modificar la superficie de las fibras con pPPy-I manteniendo su estructura porosa y con el diseño adecuado para el tratamiento de la LMESC en ratas.
2. Caracterizar fisicoquímicamente los implantes fabricados y determinar sus propiedades relevantes respecto a la interacción con el tejido biológico.
3. Establecer un modelo de LMESC en ratas para modelar la pérdida total de la continuidad tisular de la ME y aplicar los andamios fabricados como tratamiento.
4. Estudiar el desempeño de los implantes en la fase aguda de la LME mediante la evaluación del efecto funcional y estructural del tejido utilizando tecnología diagnóstica *in vivo* para dar un seguimiento a la recuperación de los animales en conjunto con análisis histológicos que permitan describir los mecanismos de recuperación.

### 1.7. Procedimiento general

El desarrollo metodológico se realizó en los laboratorios de la división de Ciencias Básicas e Ingeniería (CBI) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), en las áreas de polímeros y el Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI3M). Al final del estudio, se contó con la colaboración de la Dra. Yessica Heras para los estudios histológicos en las instalaciones del Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFC-UNAM).

A continuación, se describe brevemente la secuencia de procedimientos. A cada uno se dedica un capítulo detallado más adelante.

#### 1.7.1. Fabricación y caracterización de los andamios fibrilares

Los andamios fibrilares se fabricaron en el laboratorio de polímeros de la UAM-I, mediante la técnica de electrohilado. Se fabricaron andamios de PLA en configuración aleatoria y alineada y se recubrieron con pPPy y pPPy-I, con base en el procedimiento desarrollado previamente<sup>98,99</sup>.

Los implantes fibrilares fabricados se caracterizaron en los laboratorios de CBI de la UAM-I, por microscopía electrónica de barrido (MEB), ángulo de contacto, espectroscopía infrarroja con

reflectancia total atenuada (IR-ATR), termogravimetría (TGA), difracción de rayos X (DRX) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el fin de identificar las propiedades fisicoquímicas que interactúan con el tejido nervioso *in vivo*. Además, se estudiaron cultivos de células de origen neuronal sobre los andamios mediante MEB y se estudió la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por actividad metabólica.

### 1.7.2. Estudios *in vivo*

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar (peso mayor a 230g). Los animales se alojaron en grupos de 4-5 individuos en jaulas de 40x50 cm (caja de acrílico con tapa de acero inoxidable típica para mantenimiento de ratas), con cama sanitaria (la cual se cambia con frecuencia para mantener los animales secos), con agua y alimento *ad libitum*, dentro de un espacio exclusivo para su alojamiento, a una temperatura de 22°C, con ciclos invertidos <sup>100-103</sup> de 12 h oscuridad/12 h luz (encendido de luces a las 8 pm). Se mantuvo oscuridad durante el día, con el fin de coincidir su etapa activa con los tiempos de evaluación en el laboratorio. El manejo de los animales se realizó en apego a la NOM-062-ZOO-1999, revisión 2001 utilizada en el bioterio de la UAM.

De acuerdo con lo establecido en las normas oficiales <sup>104</sup> e institucionales <sup>103</sup>, donde se indica que la dieta de las ratas debe componerse de proteína cruda (12-24%), grasa cruda (4-11%), fibra cruda (3-6%), y 6-8% cenizas, las ratas continuaron recibiendo el alimento completo y balanceado para roedores en general en fase de mantenimiento marca ABENE (BDL-7100) o LabDiet 5001, mismo que se les proporcionaba en el Bioterio.

Los animales tuvieron atención diaria y verificación del estado general de salud por el equipo responsable, supervisado por una médica veterinaria. Además, se contó con el apoyo de la responsable del Bioterio de la UAM-I, para todo lo relacionado con los animales, manejo, alimentación y bienestar animal.

Se utilizó un total de 62 ratas. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos de estudio: intactos sin lesión (n=7), lesión sin tratamiento (control, n=15), lesión con implante de andamio sin recubrir (PLA, n=18), lesión con implante de andamio recubierto (PLA+pPPy-I, n=22). El estudio se realizó durante 8 semanas, período de recuperación típico en ratas

<sup>34</sup>.

Los animales fueron anestesiados en un espacio específico para su preparación, lejos del área de alojamiento. El protocolo de anestesia consiste en la sedación (Xilazina, 10mg/Kg vía IM), y anestésico (Zoletil 100, compuesto por Tiletamina y Zolazepam, 10mg/Kg vía IM) <sup>105,106</sup>, el cual es aplicado a cada animal por uno de los miembros del equipo, capacitado para su ejecución correcta <sup>107-109</sup>. Una vez asegurada la completa anestesia del animal y que éste no responda a ningún estímulo doloroso, se vacía la vejiga <sup>110</sup> y se le aplica lubricante ocular.

Llevar a cabo una anestesia profunda es el primer procedimiento importante para preparar los animales para los procedimientos quirúrgicos, estudios de IRM y electrofisiología.

### 1.7.3. Modelo de lesión de médula espinal por sección completa

En este trabajo se estableció una LMESC, a nivel de la vértebra torácica 9 (T9), la cual se detalla en el capítulo 3 de este documento. De esta manera se busca conservar la funcionalidad de la parte superior del tronco, extremidades anteriores y músculos abdominales, mientras se elimina el control de las patas posteriores, obteniendo un modelo de paraplejia. De esta manera, los resultados de la evaluación se pueden asociar a los efectos del tratamiento, eliminando la posibilidad de recuperación por plasticidad<sup>20</sup>.

Los animales se asignan aleatoriamente a uno de los 3 grupos de estudio: lesión sin implante, lesión con implante sin recubrir (PLA) y lesión con implante recubierto (PLA+pPPy-I).

Los criterios de exclusión consideran animales con recuperación motora dentro de los primeros 5 días después de la LMESC, evidencia de tractos remanentes por IRM y atrofia muscular debida a mordidas por parte del propio animal o sus compañeras de hábitat.

### 1.7.4. Estudio del desempeño del implante

La evolución de cada animal se estudió durante 8 semanas. Durante este periodo se estudió el desempeño de los animales experimentales por técnicas de evaluación funcional y estructural. Los procedimientos serán detallados más adelante. En el siguiente esquema (Figura 6), se muestran el orden de los procedimientos planteados para la estudiar la evolución del implante.

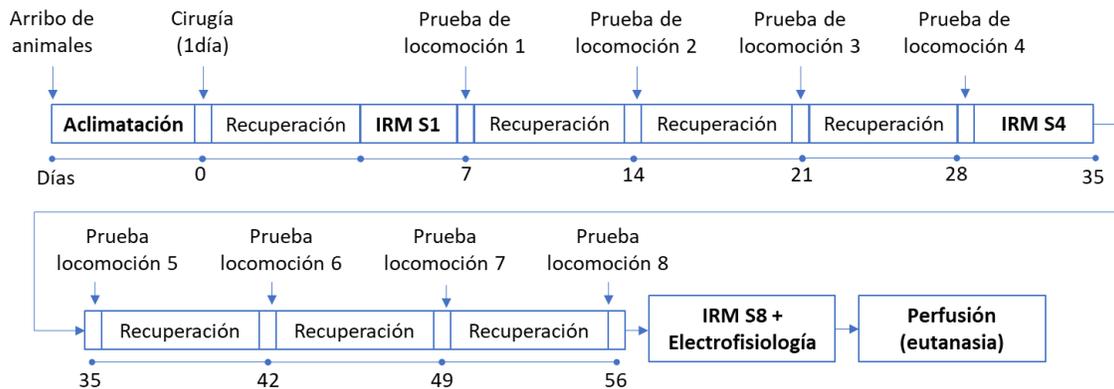


Figura 6. Secuencia de trabajo con los animales de estudio.

Al arribar los animales al laboratorio desde el bioterio, se alojan en el espacio exclusivo para ellos en condiciones óptimas para su aclimatación de manera que puedan recuperarse del traslado y cambio de alojamiento. De esta forma se busca asegurar que los animales se encuentren en condiciones óptimas para la cirugía, con un peso y estado de salud general adecuados.

Las cirugías se realizaron en el quirófano experimental del CI3M, el cual se prepara y sana previamente con radiación UV. Se dedicó un día a las cirugías, operando con un equipo conformado por al menos dos cirujanos y dos asistentes, encargados de preparar los animales para la cirugía y monitorear su recuperación.

Después de la cirugía, se les deja recuperar entre 1 y 5 días, antes de ingresar al primer estudio de IRM. La ejecución correcta del modelo de lesión mediante el monitoreo de la función locomotora y de las excretas <sup>111</sup>, así como por IRM <sup>74,77</sup> durante los primeros días (1ª semana de estudio).

Semanalmente, se monitoreó el desempeño del implante mediante el análisis del comportamiento locomotor. Este procedimiento se detalla en el capítulo 4 del presente documento. Tras 4 y 8 semanas de recuperación se realizan estudios IRM nuevamente, con el fin de realizar un seguimiento *in vivo* de la ME, el sitio de la lesión e implante y la anatomía general de los animales de experimentación. Finalizado el estudio de RM, los animales se dejan en recuperación junto a una fuente de calor hasta que despiertan completamente.

Después de 8 semanas de estudio se realizan pruebas electrofisiológicas de potenciales evocados motores y somatosensoriales. Estas pruebas permiten detectar la conductividad eléctrica de señales bioquímicas producidas por un estímulo eléctrico, para evaluar la funcionalidad de las vías neurológicas <sup>112</sup>. Tras una LMESC se elimina la propagación de impulsos eléctricos entre el cerebro y los nervios periféricos <sup>92</sup>. El registro de potenciales evocados motores (PEMs) indicaría la presencia de vías eferentes desde la corteza motora hacia los miembros posteriores; el registro de potenciales evocados somatosensoriales (PESs) indicaría la presencia de vías aferentes desde la periferia hacia la corteza sensorial <sup>113-115</sup>.

Los PEMs se registran en las patas posteriores de los animales, mientras se estimula la corteza motora; los PESs se registran en la corteza mientras se estimulan las patas posteriores, tal como se ha reportado en la literatura <sup>92,116,117</sup>, utilizando electrodos de aguja para que la intervención sea mínimamente invasiva. De esta manera se evalúa si existe la propagación del estímulo eléctrico a través de la ME, lo cual indicaría la presencia de tejido neuronal funcional en la región previamente lesionada.

Esta sección del estudio se efectuó gracias a los equipos y software de los laboratorios de docencia de Ingeniería Biomédica de la UAM-I.

Para finalizar el estudio, se realiza una perfusión transcardiaca para fijar y extraer los tejidos para su análisis por inmunofluorescencia y técnicas básicas de histología <sup>74,80,118</sup>.

## 1.8. Consideraciones bioéticas

Los experimentos en animales de laboratorio se llevaron a cabo en los laboratorios del CI3M en la UAM-I, de acuerdo con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio <sup>104</sup>, por la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio <sup>119</sup>, con las directrices ARRIVE 2.0 del Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de los Animales en la Investigación (NC 3Rs) y por el Consejo Internacional para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (ICLAS) <sup>120</sup>.

Por razones humanitarias, la eutanasia se aplica cuando los animales tengan un deterioro excesivo del estado de salud, rasgos claros de sufrimiento <sup>121</sup> o enfermedad, aunado a una pérdida del peso corporal mayor al 20% del peso previo a la cirugía <sup>110,122</sup>. Para la eutanasia, los animales son anestesiados (Xilazina, 100mg/Kg y Zoletil, 100mg/Kg) y una vez que se asegura que no respondan

a estímulos dolorosos ni oculares, se ejecuta la decapitación para garantizar la muerte rápida y segura, utilizando una guillotina (Baintree Scientific, Inc.). Los desechos biológicos se llevan al área asignada en el Bioterio de la UAM-I para su correcta disposición.

El protocolo de uso y manejo de animales fue aprobado por la Comisión de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa (dictamen CECBS22-05).

#### 1.8.1. Justificación académica para el uso, la especie y el número de animales

La LME constituye un padecimiento complejo, en el que se involucran diversos mecanismos, células y sistemas biológicos. Por ello, el uso de experimentos *in vitro* limita las variables presentes en el estudio. En más del 70% de los modelos experimentales de LME se utilizan ratas. Además de ser de bajo costo, ofrecer relativa facilidad de cuidado, tener anatomía y fisiología muy conocidas y resistencia a las infecciones por intervención quirúrgica, entre otras <sup>123</sup>, la fisiopatología de la LME es similar a la de los humanos. Las ratas desarrollan cavidades quísticas en el sitio de la lesión, tal como en el humano <sup>16</sup>, por lo que representan un modelo relevante y reproducible para estudiar los fenómenos que se desarrollan con la LME, así como posibles mecanismos de tratamiento.

Este estudio se limita a hembras, con el fin de evitar posibles complicaciones asociadas a la falta de sensibilidad y arrastre del tren posterior, que podrían afectar los testículos si se llevara a cabo el estudio en machos <sup>124</sup>. En este caso, el modelo de lesión implica la parálisis del tren trasero del animal y por lo tanto las ratas pierden la capacidad de soportar el peso corporal con sus patas traseras y pierden la sensibilidad ante posibles mordidas autoinfligidas o por parte de sus compañeras de hábitat.

#### 1.9. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron en GraphPad Prism 9.0.2 y en RStudio <sup>125</sup>. En las gráficas los datos se representan con la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). Las diferencias estadísticamente significativas se destacan con \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Mediante la prueba de normalidad de los datos Shapiro-Wilk se justifica el uso de la ANOVA, seguida de la prueba de Tukey para la comparación entre grupos. En caso contrario, si los datos no siguen una distribución normal, se aplica la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn entre grupos.

## Capítulo 2. Fabricación y caracterización de andamios recubiertos con polímero de pirrol

Para fabricar los andamios fibrilares se utilizó la técnica de electrohilado, una técnica por la cual se obtienen fibras nano y micrométricas que conforman un sustrato 3D, conocido como andamio. Los andamios permiten el anclaje y la infiltración celular sobre la superficie de las fibras y a través de los poros formados entre las ellas, ya que proveen una alta relación superficie/volumen. Además, los andamios pueden promover procesos como la proliferación, diferenciación celular, formación de matriz extracelular y generación de neot Tejido <sup>126</sup>.

La metodología implementada en este trabajo para la fabricación de los andamios se basa en el trabajo de maestría previo, que se puede consultar en el siguiente enlace: [Desarrollo de un composito para reparación y regeneración de nervio periférico \(uam.mx\)](http://Desarrollo%20de%20un%20composito%20para%20reparaci3n%20y%20regeneraci3n%20de%20nervio%20perif3rico%20(uam.mx))

La instrumentación para fabricación de electrohilados es relativamente simple, como se muestra en la Figura 7. La solución polimérica (PLA 15% w/v, en cloroformo/DMF) se bombea a través de una fina boquilla conectada a una fuente de alta tensión. Las fibras emergen debido a las fuerzas de repulsión de cargas en la boquilla. En el colector, conectado a tierra, se van depositando las fibras y formando los poros entre ellas.

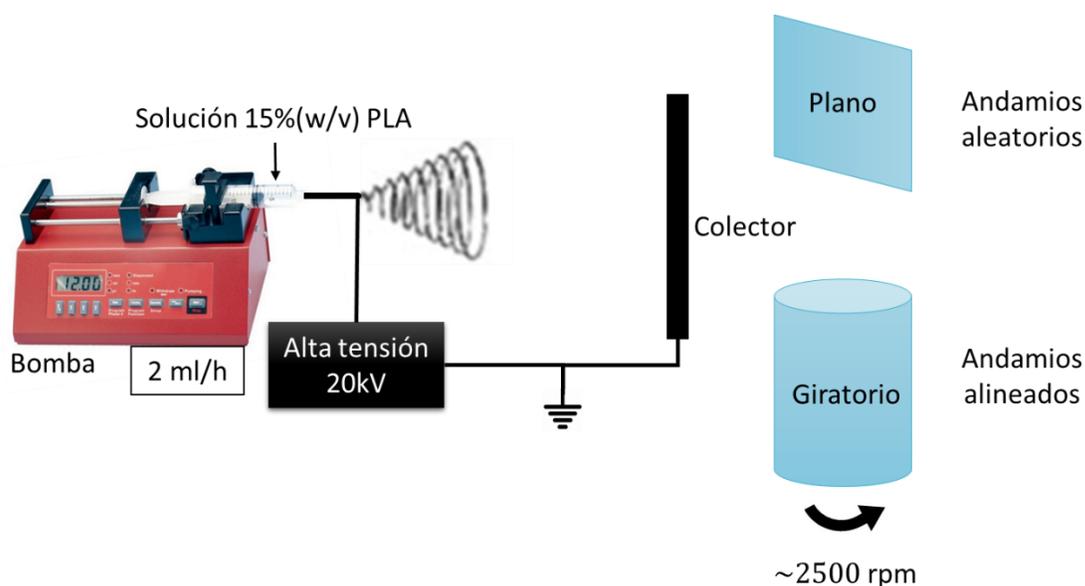


Figura 7. Instrumentación para la fabricación de andamios fibrilares. Una solución de PLA (15% w/v) se bombea a través de la aguja conectada a una fuente de alto voltaje, lo que produce la formación de fibras que se depositan en un colector conectado a tierra <sup>49</sup>. El colector plano se utiliza para fabricar los andamios aleatorios y el giratorio (Diámetro = 76 mm, L = 235 mm) a 2500 rpm para andamios de fibras alineadas.

Tal como se reporta en dicho trabajo previo, se preparó una solución polimérica a partir de los *pellets* de PLA, un día antes de electrohilarse. El PLA se colocó en cloroformo y se dejó toda la noche

a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio cerrado. Inmediatamente antes de electrohilar, se agregó DMF a la solución y se mezcló con vórtex por 1 min <sup>83,98</sup>.

El PLA es un polímero sintético biodegradable, ampliamente empleado en aplicaciones biomédicas <sup>127</sup>. Sin embargo, su interacción con el medio biológico está limitada ya que presenta hidrofobicidad y superficie de baja adhesión celular <sup>128,129</sup>, y por lo tanto el PLA se complementa para aumentar su biocompatibilidad.

En este trabajo, los andamios de PLA se recubrieron con el pPPy o pPPy-I, en un reactor de vidrio tal como se ha reportado previamente <sup>71,98</sup> (Figura 8). Los andamios se fijaron entre los electrodos, colocados a 10cm entre sí, conectados a una fuente de radiofrecuencia a 30W y la síntesis se lleva por 30min a una presión de  $1\pm 0.1$  Torr. Para sintetizar pPPy-I, el pirrol (Py) y el yodo (I) entran a la cámara a través de válvulas que se abren con el esquema de 6 min Py solo, 4 min Py+I, mientras que para sintetizar pPPy, únicamente se abre la válvula de Py <sup>83</sup>.

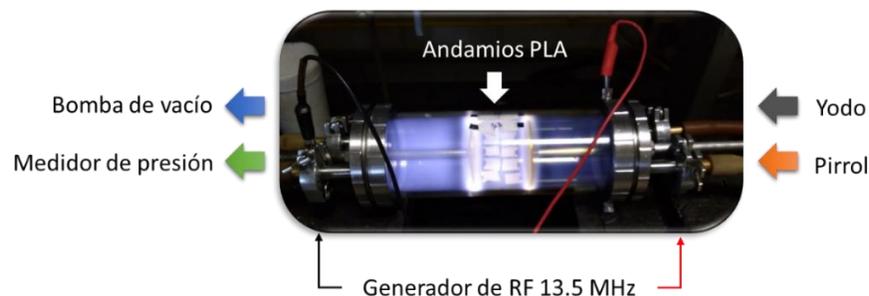


Figura 8. Instrumentación para recubrimiento de andamios con pPPy-I. Los andamios se colocan dentro del reactor, entre dos electrodos de acero inoxidable conectados al generador de RF. El reactor de vidrio se sella completamente con tapas de acero inoxidable acopladas con empaques plásticos. La presión se lleva a menos de 1 Torr con una bomba de vacío y se monitorea con un medidor Pirani. El Py y el yodo pasan a la cámara del reactor controlados por válvulas manuales.

El recubrimiento resultante es un polímero entrecruzado y ramificado, que no contiene otros compuestos químicos remanentes de la síntesis, que presenta propiedades semiconductoras particulares y grupos funcionales que interactúan con integrinas de la membrana celular y la matriz extracelular. Sus propiedades fisicoquímicas, morfológicas y biológicas fueron caracterizadas como se describe a continuación.

## 2.1. Caracterización fisicoquímica

Las propiedades fisicoquímicas se estudiaron en el laboratorio de polímeros de la UAM-I, por IR-ATR, TGA, DSC y DRX. La hidrocompatibilidad se estudió midiendo el ángulo de contacto con el agua.

### 2.1.1. Metodología

El estudio de IR-ATR se realizó en el Spectrum GX System, acoplado al accesorio de reflectancia total atenuada Perkin Elmer-DuraSamplIR II. Se hicieron 16 adquisiciones en un rango de  $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ .

El análisis TG se realizó en un equipo PerkinElmer Pyris 1 TGA System, en atmósfera de nitrógeno a razón de flujo de 20mL/min, aplicando una rampa de calentamiento de 30°C a 600°C, a 10°C/min.

La cristalinidad de los andamios se estudió por DRX en un equipo BRUKER D8 ADVANCE ECO. El grado de cristalinidad se calculó por la relación del área bajo los picos respecto al área total ( $A_T$ ) bajo el patrón de DRX<sup>130,131</sup>, es decir, la suma del área bajo el pico de cristalinidad ( $A_c$ ), y la difracción del componente amorfo ( $A_a$ ) del patrón ( $A_T = A_c + A_a$ ).

El análisis de los materiales por DSC se realizó en un equipo TA Instruments DSC-2920. Se analizaron entre 6-8 mg de cada muestra, desde 30°C a 230°C a una tasa de 10°C/min, en un programa de calentamiento-enfriamiento-calentamiento. Con el primer calentamiento se borró la historia térmica del material, de manera que las propiedades térmicas se obtienen del segundo calentamiento<sup>132</sup>.

### 2.1.2. Composición química de los andamios

Tal como se ha reportado previamente<sup>83,98</sup>, el PLA muestra los enlaces característicos en las bandas 3000-2500  $\text{cm}^{-1}$ , 1740-1760  $\text{cm}^{-1}$ , 1180  $\text{cm}^{-1}$ , y 1250-1050  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a los ésteres ( $-\text{COOH}$ , el carbonilo  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}-\text{O}$  y  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ). Una vez que se recubren las fibras de PLA con el polímero por plasma, el espectro de IR de dicho composito muestra la vibración de las aminas primarias y secundarias ( $\text{NH}_2$  y  $\text{NH}$ ) en 3300-3400 $\text{cm}^{-1}$ ; en 2960-2850 $\text{cm}^{-1}$ , los carbonos alifáticos, en 2260-2200 $\text{cm}^{-1}$  los enlaces triples ( $\text{C} \equiv \text{N}$  y  $\text{C} \equiv \text{C}$ ); en 1660-1480 $\text{cm}^{-1}$  los enlaces  $-\text{C} = \text{C}-$  y en 730-675 $\text{cm}^{-1}$  los alquenos, formados a partir de anillos de pirrol abiertos, ramificaciones y entrecruzamiento durante la síntesis por plasma. La banda 1250-1215  $\text{cm}^{-1}$  se debe probablemente a la interacción del material con el aire. De esta manera se comprueba que los andamios fibrilares de PLA están recubiertos en su superficie por el polímero plasma, y que ofrece una diversidad química y grupos funcionales relevantes en la interacción con el medio biológico.

Adicionalmente, el análisis TG muestra que la capa de polímero por plasma se empieza a descomponer paulatinamente, debido a una estabilidad térmica aportada por éste. Después se pierde la componente de PLA, retardada por el efecto del recubrimiento. Finalmente, se pierde el resto de polímero plasma de la misma forma paulatina<sup>63,71,133</sup>. Por otro lado, el TGA sugiere que el yodo en el composito de PLA+pPPy-I se encuentra en la molécula de forma iónica, que no se encuentra unido de manera covalente a la estructura polimérica, sino inmerso entre las cadenas entrecruzadas<sup>134</sup>.

Los patrones de difracción DRX de los andamios de PLA demuestran su estructura amorfa tanto en las fibras alineadas como en las aleatorias<sup>83,98</sup>. Los andamios recubiertos muestran dos picos de difracción, uno de alta intensidad en 16.7° y uno de menor intensidad en 19°, que corresponden a estructuras cristalinas (200)/(110) y (203) del PLA en su forma  $\alpha$ <sup>132,135,136</sup>.

Los andamios alineados muestran un grado de cristalinidad superior a los aleatorios, así como una intensidad superior del pico asociado a la estructura (200)/(110) en los andamios recubiertos, lo cual sugiere que las fuerzas mecánicas y eléctricas durante el proceso de electrohilado contribuyen a una preorganización de las cadenas de PLA. Dado que el proceso de polimerización por plasma

produce una estructura polimérica entrecruzada y ramificada, estos patrones sugieren la cristalización de las cadenas de PLA.

El grado de cristalinidad se calculó a partir del área bajo la curva del patrón DRX, utilizando la relación  $Ac/(Ac + Aa)$ . En la Tabla 2, se muestran la intensidad de los picos respecto a la línea base, así como y los valores calculados.

Tabla 2. Intensidad de picos característicos y grado de cristalinidad de las muestras rPLA (PLA en configuración aleatoria), aPLA (PLA en configuración orientada), y los andamios recubiertos con el polímero por plasma. Adaptada de <sup>83</sup>.

Andamio	Intensidad en 16.7°	Intensidad en 19°	Grado de cristalinidad
rPLA	-	-	0.07
aPLA	-	-	0.14
rPLA+pPPy	629	-	0.06
aPLA+pPPy	1821	401	0.18
rPLA+pPPy-I	1669	411	0.16
aPLA+pPPy-I	3728	410	0.19

Par confirmar dicha hipótesis, se estudiaron las propiedades térmicas de los materiales por DSC (Figura 9).

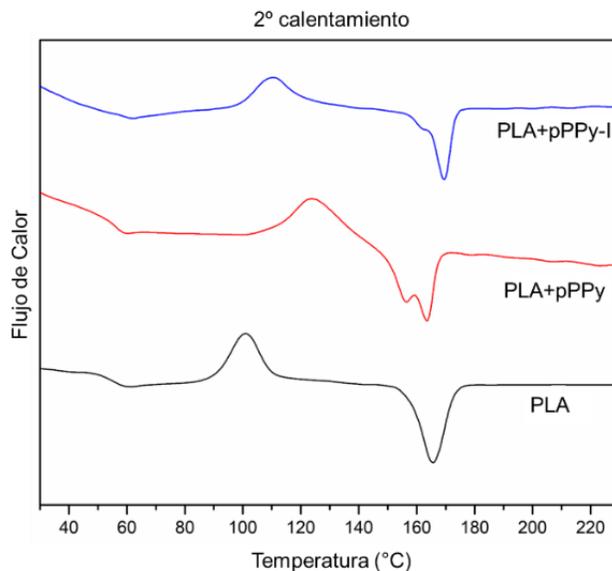


Figura 9. Curvas DSC: Flujo de calor respecto a la temperatura. Adaptada de <sup>83</sup>.

El PLA muestra un pico de cristalización en frío alrededor de 87°C ( $T_{cc}$ ), característico del PLA <sup>137</sup>. Este pico se mueve a una temperatura superior en los andamios recubiertos, de 121°C y 113°C para PLA+pPPy y PLA+pPPy-I, respectivamente. Este incremento de la temperatura de cristalización en frío ( $T_{cc}$ ) sugiere que el recubrimiento polimérico por plasma retrasa la cristalización en frío. No se

encontraron diferencias entre las configuraciones aleatorias y alineadas, ya que esta técnica otorga información sobre las propiedades térmicas del material.

La polimerización por plasma promovió la cristalización de las cadenas de PLA, esto debido al aumento de temperatura en el reactor mayor a 90°C<sup>71</sup>, reflejando un aumento en el grado de cristalinidad y en los picos del patrón DRX de los andamios recubiertos<sup>83,98,138</sup>.

Por otro lado, las curvas endotérmicas de fusión muestran variaciones entre los materiales, ya que, en contraste con el PLA, donde se muestra un único pico de fusión, en PLA+pPPy se muestran dos picos de fusión y en PLA+pPPy-I un hombro asociado al pico de fusión (Tabla 3). Este comportamiento se asocia a la transición de fase cristalina en la estructura del PLA<sup>137,139</sup>.

Tabla 3. Propiedades térmicas de los materiales que constituyen los andamios. Adaptada de<sup>83</sup>.

	PLA	PLA+pPPy	PLA+pPPy-I
<b>Tg (°C)</b>	60	56.5	60
<b>Tcc (°C)</b>	87.44	121.04	106.73
<b>Tm (°C)</b>	167.58	159.47	163.25
<b>Tm<sub>1</sub> (°C)</b>	-	153.65	158

Tg, temperatura de transición vítrea; Tcc, temperatura de cristalización en frío; Tm, Temperatura de fusión; Tm<sub>1</sub>, temperatura del pico de fusión menor.

La interacción con el agua es una propiedad importante en los andamios aplicados a ingeniería tisular. En la Figura 10, se muestran los resultados de la medición del ángulo de contacto.

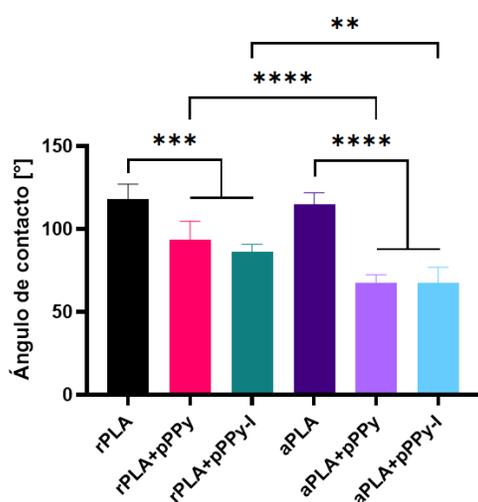


Figura 10. Ángulo de contacto del agua sobre los andamios. Las diferencias estadísticas por ANOVA y prueba de Tukey entre grupos, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Adaptada de<sup>83</sup>.

Los andamios de PLA muestran ángulos mayores a los 100°, debido a su naturaleza hidrofóbica, mientras que los andamios recubiertos muestran ángulos significativamente inferiores, reflejando

un incremento en la hidrofiliidad de los andamios. Además, los andamios alineados mostraron ángulos menores respecto a los aleatorios, lo cual sugiere que la configuración alineada facilita la interacción de las fibras con el agua. En este caso, no solo la estructura molecular de los materiales interviene en la interacción con el agua sino también la configuración de la estructura fibrilar.

## 2.2. Caracterización morfológica

La morfología de las fibras y los poros de los andamios se estudió por MEB.

### 2.2.1. Metodología

Las imágenes de MEB fueron obtenidas en el equipo Jeol JSM-7600F, del Laboratorio Central UAM-I de Microscopía Electrónica. El análisis de imágenes se realizó con el software ImageJ/Fiji (NIH). La distribución de los diámetros de las fibras se determinó tomando 200 mediciones por cada andamio de 3 diferentes imágenes. La porosidad bidimensional aparente se estudió de las imágenes de MEB, tomando 3 diferentes imágenes por andamio. Se aplicó un filtro basado en contraste, donde las partes oscuras corresponden a los poros, y después aplicando el análisis de partículas para obtener los poros segmentados de las imágenes. El procedimiento se muestra en la Figura 11.

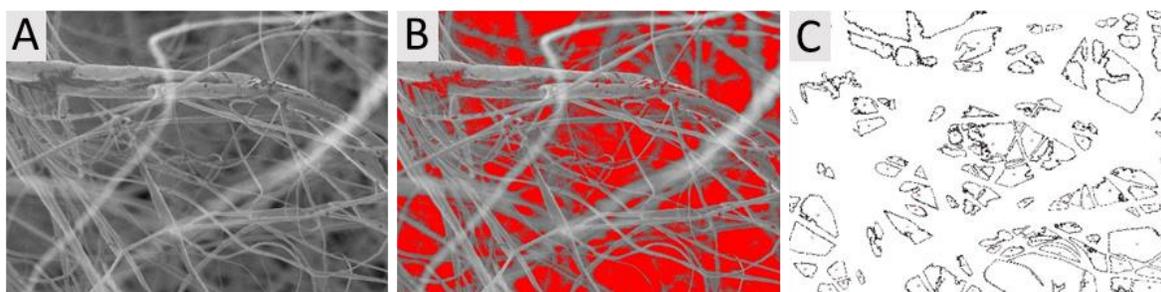


Figura 11. Procesamiento y segmentación de poros bidimensional en imágenes de MEB. Imágenes representativas de un andamio aleatorio (A), filtro de espacio de poro aplicado (B), segmentación y cuantificación de los poros (C).

### 2.2.2. Estructura de los andamios y morfología de las fibras

Las imágenes de MEB muestran la estructura de las fibras y la microestructura de los andamios <sup>83,98</sup>. Las fibras se muestran uniformes, libres de gotas o defectos en general. Esto se debe a las características de la solución polimérica y a los parámetros del proceso de electrohilado, que promueven la conductividad de la solución polimérica, la disipación de las cargas y la elongación de la fibra <sup>140,141</sup>.

Como se muestra en la Figura 12, los diámetros de las fibras aumentan significativamente con el recubrimiento del polímero plasma. De acuerdo con lo observado en las imágenes, el depósito de pPPy-I es más compacto que el de pPPy, reflejándose en un menor incremento en el diámetro de las fibras aleatorias recubiertas <sup>142</sup>.

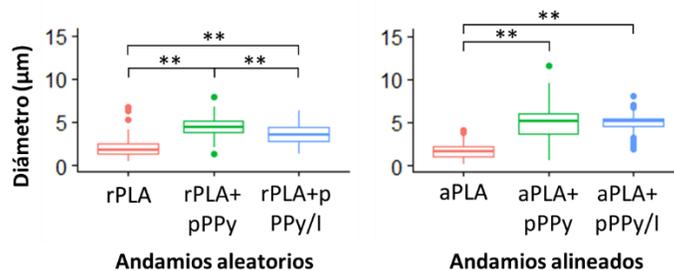


Figura 12. Distribución de diámetros de las fibras. Las diferencias estadísticas encontradas por la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn entre grupos, n=200, \*\*p<0.01, adaptada de <sup>83</sup>.

Los andamios recubiertos tienden a una distribución mayor de diámetros que los andamios de PLA. Esto se debe a que el recubrimiento puede promover la unión de fibras en una sola fibra gruesa. Por la configuración de las fibras alineadas, esto fue más frecuente en los andamios alineados.

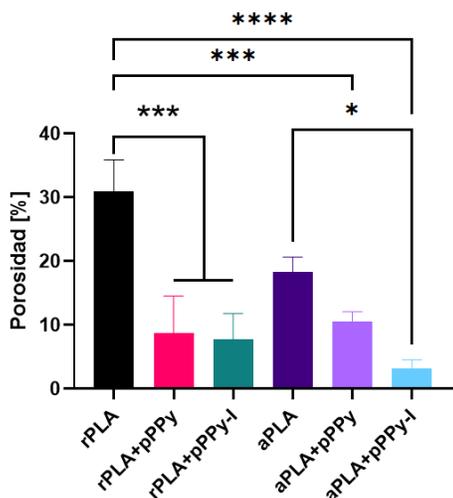


Figura 13. Porosidad aparente de los andamios. Diferencias estadísticas por ANOVA y prueba de Tukey entre grupos, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, adaptada de <sup>83</sup>.

La estructura porosa de los andamios se mantuvo después del recubrimiento con el polímero plasma. El análisis de la porosidad aparente (PA) a partir de la proyección bidimensional de los andamios en las imágenes de MEB, mostró diferencias significativas (Figura 13). La porosidad de los andamios de PLA es significativamente mayor que en los andamios recubiertos. Entre los andamios de PLA no se encontraron diferencias, lo cual sugiere que la orientación de las fibras no influye en la porosidad. Con el recubrimiento del polímero plasma, la PA se reduce, debido al depósito del polímero sobre las fibras.

El análisis del tamaño de los poros mostró diferencias entre los andamios en seco y en cultivo, como se muestra en la Figura 14. El tamaño de poro en rPLA+pPPy y aPLA+pPPy-I aumentó significativamente en cultivo, lo cual sugiere que los andamios expanden su espacio poroso al interactuar con el medio de cultivo y las células. Dada la hidrofiliidad del pPPy y pPPy-I <sup>70,143</sup>, los andamios pueden incorporar el agua en su estructura, lo cual explica el incremento en el tamaño

de poro aparente. En este caso, la apertura del espacio de poro tridimensional no es detectable por el método de análisis aplicado.

Dado que el PLA es hidrofóbico, estos resultados muestran que los poros de los andamios de PLA se mantuvieron en cultivo, y las células ocuparon los espacios disponibles, reflejando un decremento en el espacio de poro. En contraste, al ser hidrofílico el polímero plasma, los andamios recubiertos presentan un aumento en el tamaño de poro, reflejando su interacción con el medio biológico, que en cultivo absorben el agua permitiendo el acceso de células y nutrientes a la estructura.

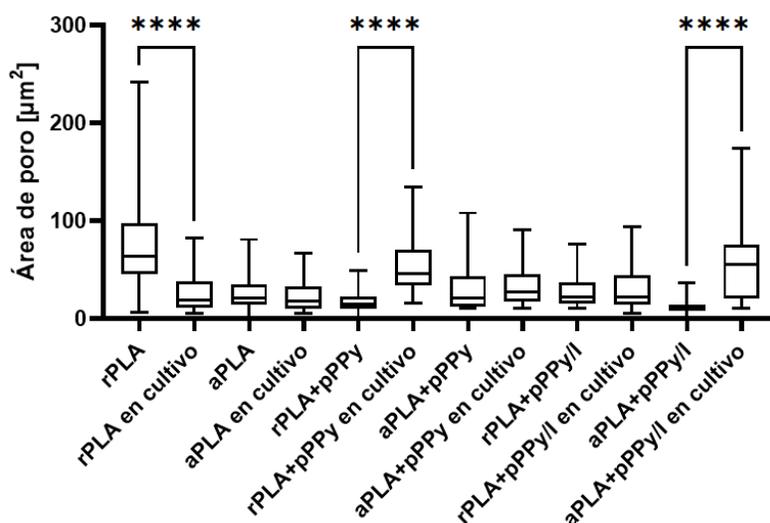


Figura 14. Distribución de áreas de poro de los andamios fabricados y en cultivo. Las diferencias estadísticas se presentan por la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn entre grupos, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , adaptada de <sup>83</sup>.

### 2.3. Caracterización biológica

Se cultivaron células de la línea NG108-15 (ATCC, HB-12317™) para evaluar la respuesta de las células sobre los andamios. La línea NG108-15 puede expresar propiedades observadas en las neuronas tales como memoria, sinapsis, diferenciación, comunicación entre células, movimiento celular, entre otras <sup>144-147</sup>, lo cual la hace una línea propicia para investigar procesos del sistema nervioso e interacción con biomateriales.

#### 2.3.1. Metodología

Las células fueron cultivadas en condiciones estándar, tal como se reportó previamente <sup>98,99</sup>. Se utilizó un medio de cultivo constituido por 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2% (v/v) HAT, 1% (v/v) penicilina y estreptomycin (100 unidades/ml) en DMEM. Los andamios fueron esterilizados con UV previo al cultivo. Las células fueron descongeladas, cultivadas hasta su confluencia, despegadas con pipeteo y contabilizadas con un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Para el cultivo celular sobre los andamios, se colocó cuidadosamente una gota de solución de medio de cultivo con células sobre cada andamio y se incubó por 2 h. Después, se completó el medio de cultivo hasta que los andamios

quedaran completamente cubiertos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C (5% CO<sub>2</sub>/95%aire), en atmósfera húmeda.

Se evaluó la morfología celular por MEB y la viabilidad celular por el ensayo MTT. Para el análisis morfológico, se cultivaron 2x10<sup>4</sup> células en cada andamio y se mantuvieron por 15 días en condiciones estándar. Las muestras se fijaron en glutaraldehído 3.5% en PB 0.1 M a 4°C. Se lavaron con PB a pH 7.4 a 4°C, y se postfijaron en OsO<sub>4</sub>. Después, se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones ascendentes de etanol en agua (30-100%) y secadas al punto crítico. Las muestras se montaron en porta muestras para MEB con cinta de carbón conductora y pintura de grafito. Se cubrieron con oro y se visualizaron en un microscopio JEOL JSM-5900LV.

Se analizaron la morfología y orientación de estructuras celulares en las MEB utilizando el software ImageJ/Fiji (NIH), y el plugin OrientationJ<sup>148,149</sup>. Los parámetros de análisis fueron: ventana gaussiana  $\sigma = 0.7$ , coherencia (min.) = 2%, energía (min.) = 2%<sup>83</sup>. Adicionalmente, se analizaron las curvas de orientación con el fin de determinar si existen tendencias hacia determinada orientación, en especial en dirección de la orientación preferente de las fibras, mediante ajuste gaussiano en el software OriginPro 8.1 (Peak Analyzer). En este ajuste, el primer paso es el ajuste de la línea base, en el cual se elimina la suma de estructuras orientadas en todo el espectro de ángulos (de -90° a 90°), y a continuación encontrar los ángulos de orientación preferente.

Para el análisis de viabilidad celular, se cultivaron 1.65x10<sup>4</sup> células en cada andamio y se mantuvieron por 5 días. Los andamios celularizados y los controles (andamios sin células) fueron colocados en una microplaca de 96 pozos, lavados en PBS y se les aplicó una solución de 0.5 mg/ml de MTT en PBS. Después de incubar por 2h, se les agregó DMSO y se dejaron reposar por 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se adquirió la absorbancia de las muestras y controles en un equipo Epoch Microplate Spectrophotometer a 580 nm y 720 nm como referencia. La medición de la actividad metabólica de las células sobre los andamios se obtuvo restando la absorbancia en 720 nm de la correspondiente en 580 nm, que corresponde a MTT. Las células viables reducen el MTT gracias a su actividad metabólica, por lo que la absorbancia del producto de la reducción del MTT disuelto es proporcional a la cantidad de células viables<sup>150</sup>. Por ello, esta medida se emplea para estimar la viabilidad celular.

### 2.3.2. Respuesta de las células y el medio biológico a los andamios

Las células NG108-15 se encontraron ancladas a los andamios en general<sup>83</sup>. Se observaron diferencias respecto a la morfología celular, ya que en los andamios de PLA y en los aleatorios recubiertos con pPPy (rPLA+pPPy) se detectaron células con membranas granuladas, redondeadas sin proyecciones celulares, o con proyecciones retraídas. Estas características morfológicas se asocian a procesos de muerte celular<sup>151-153</sup>. Si bien estos procesos son considerados normales, estos pueden ser estimulados por un ambiente desfavorable<sup>151</sup>. En contraste, las células cultivadas sobre aPLA+pPPy, rPLA+pPPy-I y aPLA+pPPy-I muestran membranas plasmáticas sanas, que extienden proyecciones celulares y forman sitios de unión con las fibras.

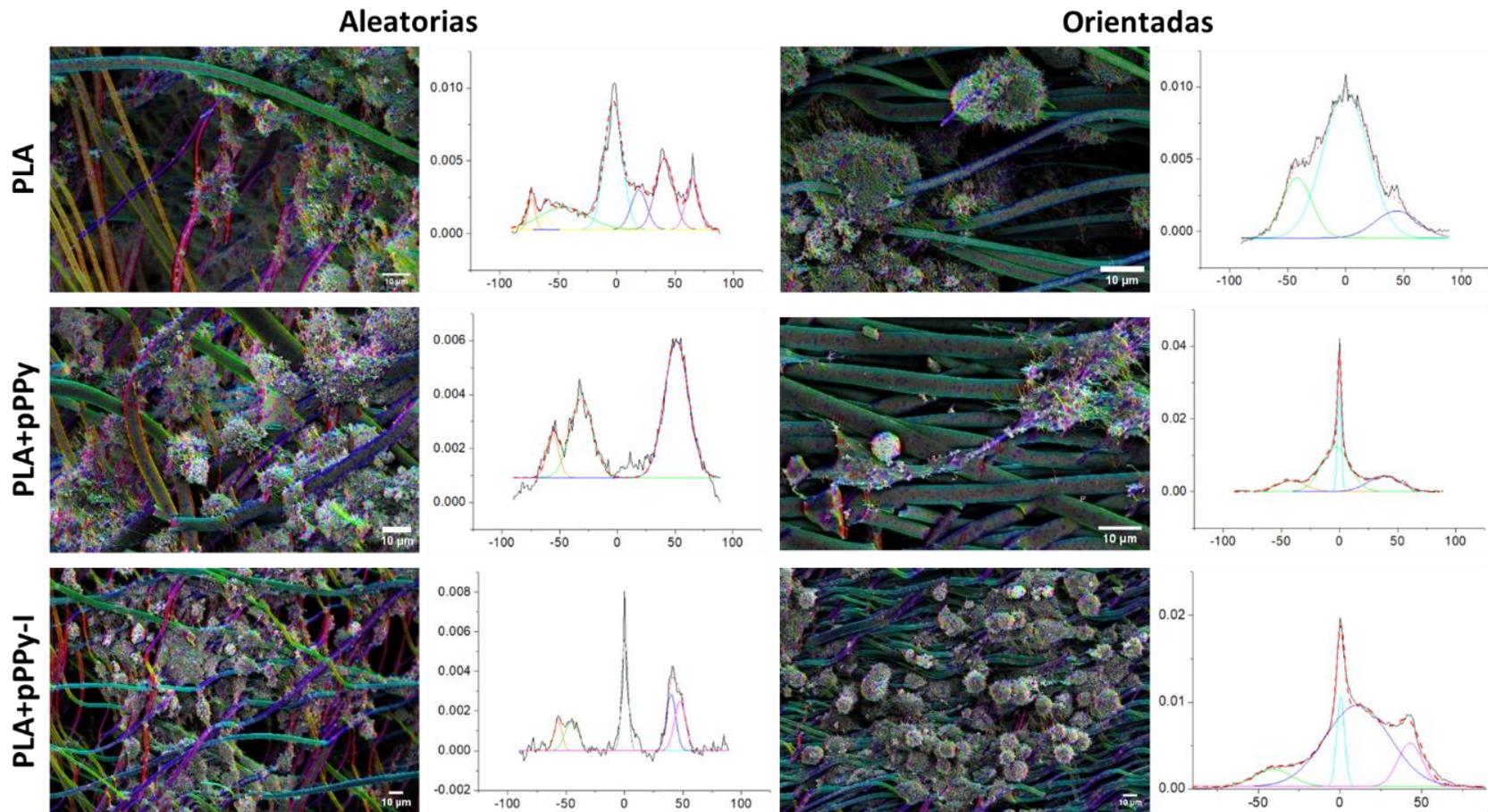


Figura 15. Análisis morfológico de las células NG108-15 cultivadas sobre los andamios. Se muestran las imágenes de MEB codificadas por la dirección de las estructuras junto con el análisis cuantitativo de la orientación utilizando OrientationJ (Fiji-ImageJ, [BIG > OrientationJ \(epfl.ch\)](http://big.epfl.ch)), ventana gaussiana  $\sigma = 0.7$ , coherencia (min.) = 2%, energía (min.) = 2%, donde el rojo representa estructuras orientadas en  $90^\circ$  y  $-90^\circ$ , cian  $0^\circ$ , azul  $45^\circ$  y verde  $-45^\circ$  <sup>83,149</sup>.

El análisis de orientación estructural sobre las imágenes de MEB de los cultivos evidenció la dirección de las fibras y procesos celulares, como se muestra en la Figura 15. Las curvas de orientación indican los ángulos hacia los cuales se ubican las estructuras, tanto fibrilares como proyecciones citoplasmáticas, de manera preferente. Aunque se detectan proyecciones celulares en todas las direcciones, al comparar el mismo material en su configuración orientada respecto a la aleatoria, la cantidad de estructuras orientadas en determinado ángulo es mayor en los andamios orientados.

Sin embargo, la limitación de este estudio es que al incluir tanto estructuras citoplasmáticas como fibras poliméricas, no fue posible cuantificar la orientación de las proyecciones celulares y determinar si estas se orientan en mayor medida en la dirección de las fibras mediante las técnicas utilizadas en este trabajo. Por lo tanto, el desarrollo e implementación de análisis de imágenes que permitan establecer esta cuantificación queda proyectado para trabajos futuros.

Por otro lado, la codificación por color de la orientación estructural evidencia, al menos de manera cualitativa, proyecciones celulares alargadas y orientadas, así como estructuras celulares más aplanadas en los andamios aPLA+pPPy, lo cual sugiere que estos proveen un sustrato permisivo para la formación de sitios focales y adhesión celular, y que tienen el potencial para facilitar estímulos de modificación estructural del citoesqueleto, lo cual es una característica importante en procesos de diferenciación celular<sup>140,154,155</sup>.

Estudios computacionales de la interacción del polímero de pirrol sintetizado por plasma con integrinas de la membrana celular y la matriz extracelular han demostrado que los grupos amina e hidroxilo en la estructura polimérica tienen afinidad con dichas proteínas membranales<sup>81</sup>. Dado que las células que pierden en anclaje al sustrato detienen procesos celulares tales como la proliferación<sup>156</sup>, estimular la adhesión celular promueve la sobrevivencia y proliferación celular sobre los andamios recubiertos con pPPy y pPPy-I.

La viabilidad de las células NG108-15 cultivadas sobre los andamios se estimó mediante el ensayo MTT. En la Figura 16, se muestran los resultados de la absorbancia del producto asociado a la actividad metabólica celular, la cual es una medida que indica la cantidad de células viables.

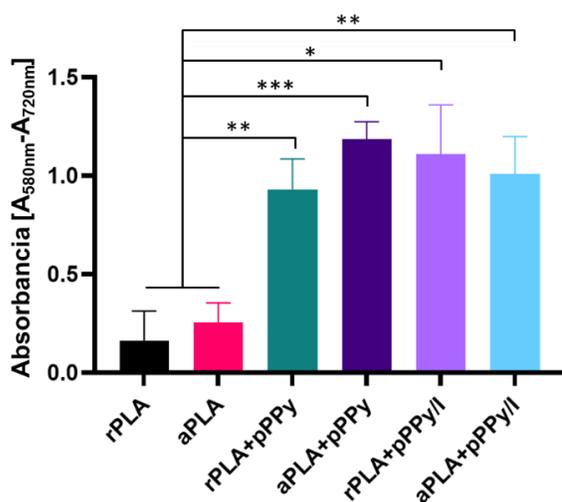


Figura 16. Viabilidad celular por la prueba MTT. Estimación de la viabilidad celular dada por la absorbancia del producto de reducción del MTT gracias a la actividad metabólica de células viables. Diferencias estadísticas por ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, adaptada de<sup>83</sup>.

De acuerdo con lo observado en las imágenes de MEB, se encontró una mayor cantidad de células viables en los andamios recubiertos respecto a los andamios de PLA, lo cual sugiere que el recubrimiento con el polímero sintetizado por plasma mejora las propiedades de los andamios y promueve procesos como sobrevivencia y proliferación <sup>157,158</sup>.

Adicionalmente, se realizó un estudio de correlación entre las propiedades de los andamios y la viabilidad celular. Se encontró que el diámetro de las fibras tiene una correlación lineal con la cantidad de células viables, con un coeficiente de Pearson de 0.88 ( $R^2=0.78$ ), como se muestra en la Figura 17. Esto sugiere que existe una dependencia de las células hacia la disponibilidad de superficie. Daud y cols. también reportaron una correlación significativa entre la viabilidad celular y el diámetro de las fibras <sup>159</sup>.

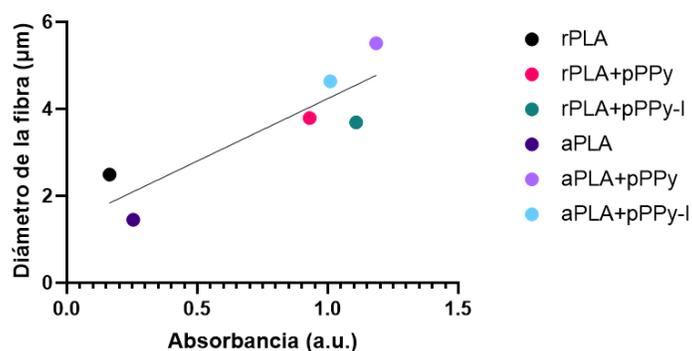


Figura 17. Efecto del diámetro de las fibras en la viabilidad celular. El análisis de correlación lineal mostró un coeficiente de correlación de Pearson de 0.88,  $R^2=0.78$  entre las variables, adaptada de <sup>83</sup>.

Es importante destacar que, en este caso, el aumento del diámetro de las fibras está dado por el recubrimiento de polímero por plasma, por lo que los grupos funcionales como aminas, nitrilos, cadenas alifáticas estructura ramificada del material también influyen en la viabilidad celular.

Estos estudios sugieren que los andamios recubiertos con pPPy y pPPy-I constituyen sustratos permisivos para la adhesión y sobrevivencia de las células de origen neuronal. El análisis de la porosidad e interacción con el agua y el medio biológico sugiere que estos andamios ofrecen a las células espacios para que estas puedan migrar, para que se produzca el transporte de nutrientes y eliminación de desechos, características importantes en su aplicación como andamios de crecimiento y reparación tisular.

Los andamios alineados recubiertos con pPPy, mostraron la capacidad de ofrecer estímulos para la propagación celular y modificación de la morfología celular sin otro estímulo distinto a la topografía del andamio. Las células mostraron elongación de su citoplasma en la orientación de las fibras del andamio, lo cual se evidenció mediante el análisis de imágenes. Este comportamiento sugiere que la orientación de las fibras del andamio constituye una ventaja como sustrato de reparación de nervio periférico, donde la dirección es elemento clave para la recuperación funcional del nervio. Por su parte, los andamios aleatorios presentan una estructura más porosa, que puede ser más ventajosa como sustrato de reparación en el SNC, donde la estructura compleja precisa de estímulos integrales y adhesión de células de soporte para una recuperación funcional.

## Capítulo 3. Modelo de lesión de médula espinal por sección completa e implante de andamios recubiertos

La LMESC es la forma más severa de LME y es muy rara en el ámbito clínico. Puede ser provocada por un corte directo o secundaria al impacto explosivo (disparo de arma de fuego). Implica el ingreso de LCR y disrupción completa de materia gris y tractos de materia blanca, vías tanto ascendentes como descendentes <sup>160</sup>. Al ser una lesión que atraviesa el tejido, la LMESC se caracteriza por el ingreso de fibroblastos al epicentro de la lesión, a diferencia de la contusión, donde las meninges permanecen prácticamente intactas <sup>161</sup>.

Ingreso de fibroblastos al epicentro de la lesión producen la secreción de moléculas en la cicatriz fibrótica que son inhibitorias a la regeneración, ejerciendo efectos químicamente repulsivos a los axones, restringiendo la capacidad natural de las neuronas para regenerarse. En la LME, la primera semana se presenta hemorragia en el epicentro. Para la segunda semana, la hemorragia se ha dispersado, y se produce una cicatriz formada por fibroblastos que ingresan desde las meninges. El tejido degenerado debido a la isquemia y edema produce la formación de cavidades quísticas <sup>161</sup>.

Los modelos de LMESC se utilizan muy frecuentemente en la investigación de sustratos para la reparación y regeneración nerviosa, ya que constituye un modelo reproducible, que permite establecer asociaciones claras con la recuperación funcional del tejido <sup>20</sup>. Por otro lado, los pacientes con LME en estadio crónico padecen los efectos del daño secundario y una cicatriz madura que mantiene un ambiente proinflamatorio, lo cual restringe la regeneración tisular <sup>33</sup>. Se han propuesto estrategias para el tratamiento de estos pacientes, las cuales parten de la remoción de esta cicatriz fibrótica para modificar el sitio de la lesión hacia un ambiente que favorezca la regeneración del tejido <sup>162-164</sup>. Dada la complejidad quirúrgica de estos procedimientos, en el presente trabajo se pretende modelar el efecto del corte limpio de la ME y su interacción con los andamios fibrilares mediante una LMESC.

Los efectos funcionales de la LMESC en las ratas a nivel de la T9 implican la pérdida de la movilidad de las patas posteriores y soporte del peso corporal, de manera que se mueven con sus patas delanteras y arrastrando el tren posterior. Además, pierden la función autónoma de micción, por lo que requieren el vaciamiento manual de la vejiga al menos dos veces al día.

### 3.1. Metodología

#### 3.1.1. Preparación de los implantes y de los animales

Dado que el recubrimiento de pPPy-I modifica propiedades mecánicas de los andamios, el andamio electrohilado de PLA se introduce conformado como implante dentro del reactor para su recubrimiento (Figura 18, A). De esta manera el polímero se deposita en todas las capas de las fibras como se observa en la Figura 18.

En preparación para la cirugía, los animales fueron pesados e identificados asignándoles un número en la base de la cola con un marcador permanente no-tóxico. Los animales fueron anestesiados aplicando el protocolo antes mencionado en la sección 1.7.2.

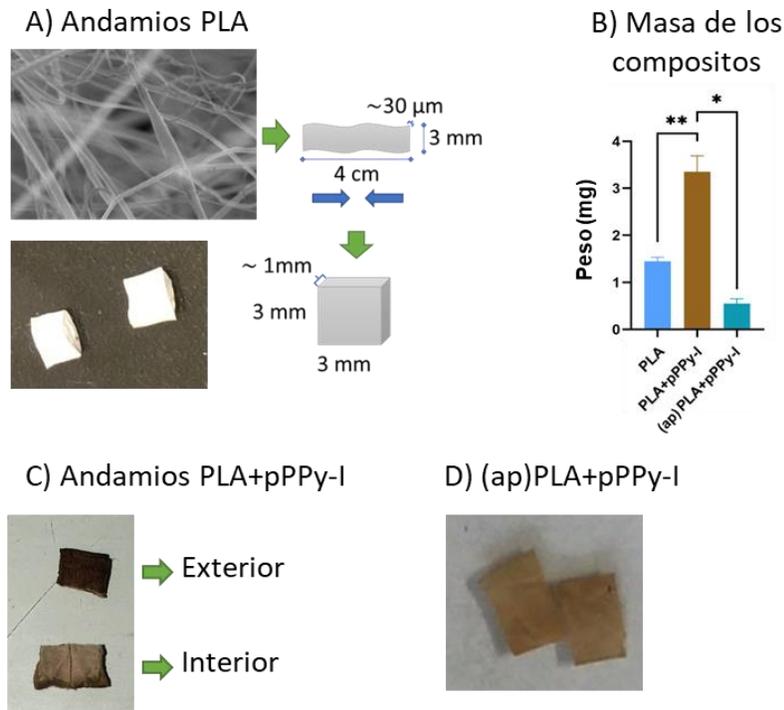


Figura 18. Implantes fibrilares de PLA, PLA+pPPy-I y apósito de PLA+pPPy-I. A) Armado de los implantes de PLA. Las matrices electrohiladas se segmentan y se doblan para formar un andamio implantable en la médula de rata. B) Comparación de la masa de los implantes y el apósito (n=4). El implante de PLA+pPPy-I es significativamente mayor que el de PLA (prueba de t,  $p=0.0017$ ,  $n=4$ ) y que el apósito (prueba Mann Whitney,  $p = 0.0286$ ). C) Implantes de PLA recubiertos con pPPy-I, las capas internas del andamio recubierto muestran un depósito de polímero menor que en capas exteriores. D) Apósito para la incisión en las meninges.

### 3.1.2. Procedimiento quirúrgico

Después de la preparación y anestesia, el dorso del animal se rasuró y se limpió con Germisin espuma. Utilizando instrumental estéril, se accedió a la columna vertebral a través de una incisión en la piel utilizando bisturí. Los músculos paravertebrales se diseccionaron, se realizó la laminectomía en la vértebra T9 y se expusieron las meninges. Se realizó un corte longitudinal en las meninges de aproximadamente 3 mm, evitando perforar la arteria media y estas se abrieron para exponer la ME. Utilizando microtijeras, se realizó un corte transversal de la ME completa y se verificó la LMESC insertando una punta fina en toda el área de corte<sup>20,73,76,115,165</sup>. El implante se insertó entre los segmentos de la ME, mientras que el grupo control no recibió implante. La incisión de las meninges se cubrió con un apósito de 5x3 mm constituido por una sola lámina de PLA recubierta con pPPy-I en todos los animales<sup>166</sup> (Figura 19). El músculo y la piel se cerraron por planos con

suturas absorbibles de PGA y nylon respectivamente <sup>166</sup>. Los animales se dejaron en recuperación junto a una fuente de calor hasta que despertaran completamente.

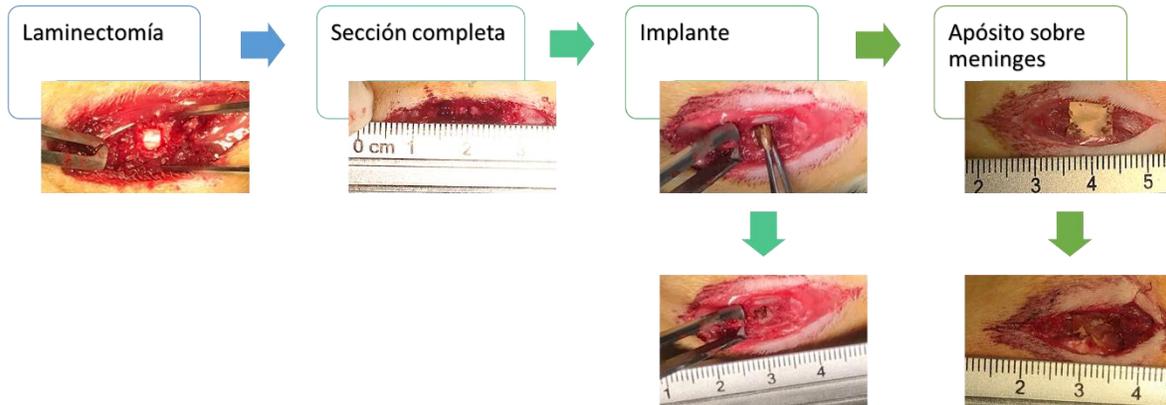


Figura 19. Procedimiento quirúrgico. Después de la laminectomía y exponer la ME, ésta se corta completamente. El implante se ubica entre los segmentos de la ME y las meninges se cubren con (ap)PLA+pPPy-I.

En otros estudios la incisión en meninges se ha cerrado mediante una sutura fina <sup>72,164</sup>. En este trabajo, se realizaron estudios piloto donde se observó que al colocar el (ap)PLA+pPPy-I no se formaba tejido conectivo desde el exterior de la ME, en contraste con modelos donde no se aplicó este apósito. Por lo tanto, se decidió optar por la aplicación de este material para constituir el modelo de lesión sin la formación de tejido fibrótico desde el exterior de las meninges y sin la necesidad de utilizar suturas finas en el proceso quirúrgico.

### 3.1.3. Cuidados postoperatorios

Después de la cirugía, se les aplicó buprenorfina (0.05mg/Kg vía SC) por 3 días como analgésico y enrofloxacina (5mg/Kg vía IM) por 5 días como antibiótico <sup>110</sup>. Después de la cirugía y durante el periodo de evaluación, los animales se alojan nuevamente en su ambiente habitual. Se les facilita el acceso a agua y alimento *ad libitum*, sin necesidad de levantar su cuerpo (Figura 20).



Figura 20. Acondicionamiento del hábitat para animales parapléjicos. Se asegura que el agua y el alimento sean accesibles a los animales, sin necesidad de levantar su cuerpo. Se recomienda el uso de espacios que funcionen como refugio, para reducir la ansiedad debida al confinamiento, además de elementos que faciliten el movimiento, ya que los animales parapléjicos se mueven arrastrando su tren posterior <sup>110</sup>.

Adicionalmente, los animales tuvieron vaciado manual de la vejiga y evaluación del estado de salud diariamente por el equipo de trabajo, supervisado por la médica veterinaria, asegurando la identificación de signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento, y, cuando corresponda, la aplicación del tratamiento específico o eutanasia.

Una semana después de la lesión, los animales son colocados en el espacio abierto, con comida y agua *ad libitum* para la locomoción voluntaria (Figura 21). Esta práctica ayuda al estado general de salud de todos los animales, ya que se constituye un estímulo, les permite explorar, moverse libremente, jugar entre ellos. Además, se observó que contribuye a mejorar el nivel de locomoción general ya que voluntariamente podían realizar movimientos amplios por todo el espacio abierto fuera de su confinamiento. Esta práctica se realizó incluyendo todos los grupos de estudio.



Figura 21. Espacio acondicionado para movimiento voluntario libre. Se puede colocar la caja abierta en un campo abierto, con una rampa que permita el libre paso de los animales. Se pueden agregar diversos objetos de cartón y papel para disminuir la ansiedad del confinamiento y mejorar el bienestar animal. El agua y el alimento se ubican al alcance de los animales parapléjicos.

### 3.2. Resultados del modelo de sección completa

Se operaron un total de 55 animales, los cuales se dividieron aleatoriamente entre 3 grupos de estudio: control (lesión sin implante), PLA (lesión + implante de PLA), PLA+pPPy-I (lesión + implante de PLA+pPPy-I). Los animales que mostraron tractos remanentes por DTI y una recuperación motora

dentro de los 5 días posteriores a la cirugía, o animales que tuvieran atrofia muscular debido a patas mordidas fueron excluidos del estudio.

Tal como se observa en la Figura 22, del total de animales control, PLA y PLA+pPPy-I, el 58%, 77.77% y 72.72% sobrevivió a la cirugía respectivamente, con una supervivencia a la cirugía total de 74.5%. A pesar de que la mortalidad a la cirugía del grupo de PLA es menor, no se cuenta con evidencia que señale al implante como única variable determinante, además de que la mortalidad parece equilibrarse respecto a los demás grupos en los días posteriores.

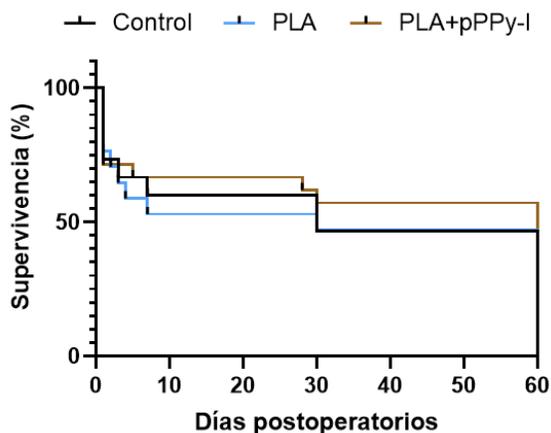


Figura 22. Número de animales sobrevivientes. El experimento se llevó a cabo durante 8 semanas (60 días).

Después de 8 semanas de estudio, se obtuvo una supervivencia total de 51%, 46.66% de animales control, 47% del grupo PLA y 62% del grupo PLA+pPPy-I.

A continuación, se muestra la evolución del peso corporal de los animales a lo largo de 8 semanas de estudio (Figura 23). Ningún animal tuvo una reducción del 20% o más respecto al peso inicial previo a la lesión.

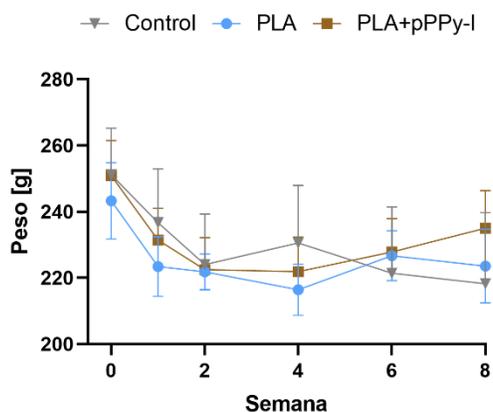


Figura 23. Evolución del peso corporal en los animales de estudio. En 0 se muestra el peso inicial previo a la cirugía.

## Capítulo 4. Evaluación de la respuesta funcional

El crecimiento tisular implica procesos de migración, anclaje, proliferación y diferenciación, entre otros, sin embargo, es necesario evaluar si el neotejido es funcional. En el caso del sistema nervioso, la funcionalidad implica la transmisión de señales bioeléctricas entre las células excitables, hacia tejidos efectores, de manera que se produzca el movimiento, la respuesta sensorial o autónoma.

En este capítulo se abordan dos técnicas de evaluación de la funcionalidad: la locomoción y los potenciales evocados. Con el análisis de la locomoción se evalúa la recuperación de vías motoras hacia las patas posteriores. Los potenciales evocados son una técnica electrofisiológica para evaluar la funcionalidad de circuitos ascendentes y descendentes de forma cuantitativa.

Ambas técnicas son ampliamente utilizadas en el campo de la investigación de terapias para la recuperación de la LME, además de ser complementarias.

### 4.1. Evaluación de la locomoción

Una de las técnicas estándar de evaluación funcional es el análisis de la locomoción con base en la escala BBB, diseñada por Basso, Beattie y Bresnahan en 1995, la cual fue desarrollada a partir de sus observaciones de la locomoción en ratas con lesión leve y moderada, de tipo contusión o impacto con compresión transitoria a nivel torácico <sup>18</sup>. La escala BBB consiste en 22 puntos que se asocian a un nivel de recuperación funcional, donde 0 corresponde a la ausencia total de movimiento en las extremidades posteriores, y 21 a la locomoción normal, es decir, marcha coordinada con pasos plantares consistentes, despliegue de dedos, posicionamiento paralelo de las patas, estabilidad del tronco y cola levantada consistentemente. Asimismo, permite predecir alteraciones anatómicas de acuerdo con la calificación asignada ya que demostraron los cambios estructurales del tejido asociados con la recuperación funcional, por lo que se utiliza comúnmente en los estudios de LME torácica y lumbar <sup>18</sup>.

En el artículo original de Basso *et al.*, reportan la respuesta locomotora en la lesión leve a moderada, por lo que otros autores argumentan que la escala BBB presenta limitaciones en cuanto a su sensibilidad para tomar en cuenta movimientos asociados con la LMESC. Antri y cols. (2002) presentaron una escala BBB modificada para evaluar la recuperación en una LMESC, que ha sido utilizada por otros grupos de investigación <sup>164,167</sup>. Dado que la escala BBB se diseñó para lesiones parciales, se toma en cuenta la coordinación de patas frontales y posteriores como clave en la recuperación, por lo que se argumenta que en la LMESC “no tiene sentido evaluar esta característica”, ya que en la LMESC esta habilidad se pierde totalmente. Además, la original “no contempla la posibilidad de recuperación desde las propiedades endógenas intrínsecas de la ME por debajo de la lesión en la ausencia del restablecimiento de controles supra espinales” <sup>168</sup>.

Si bien la escala modificada no se presenta con un análisis exhaustivo de los movimientos junto con la histología tal como en su momento presentaron su escala Basso y cols., sí se define una serie de niveles con movimientos definidos en cada nivel de recuperación. Sin embargo, ambas escalas son herramientas subjetivas, que dependen del criterio del observador, que dan como resultado una valoración cuantitativa que permite asignar un puntaje a movimientos característicos que los

animales presentan durante el periodo de estudio. Para poder comparar directamente con los demás estudios realizados en la línea de investigación, en este trabajo se utiliza la escala BBB original.

#### 4.1.1. Metodología

La locomoción de los animales se analizó en dos instancias, de la forma estándar, en un campo abierto y adicionalmente en una pasarela, para analizar detalladamente la pisada, colocación de la pata, soporte del peso corporal y coordinación entre patas delanteras (PD) y posteriores (PP). La locomoción se grabó con dos cámaras para registrar dos ángulos simultáneamente, para su almacenamiento y análisis más detallado <sup>169,170</sup>.

Para el análisis en campo abierto se instaló un cilindro de material transparente donde se coloca el animal a estudiar <sup>171</sup>. El movimiento se graba durante al menos 3 min con una cámara superior y una lateral, para visualizar claramente si el animal es capaz de soportar su peso corporal (Figura 24).

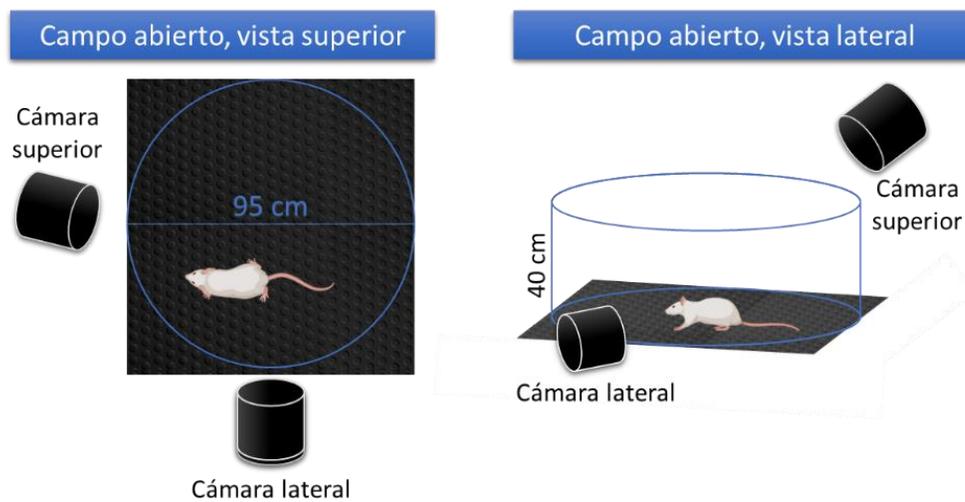


Figura 24. Espacio para la evaluación de la locomoción en campo abierto.

Para el registro en pasarela, ésta se coloca a una altura aproximada de 120 cm del piso, con una cámara inferior que registra el aspecto inferior del animal. Una cámara lateral graba simultáneamente la vista lateral del movimiento (Figura 25).

Los videos se analizaron semanalmente y se le asignó un puntaje de la escala BBB a cada animal. La escala traducida se encuentra en los anexos. Para el caso de la LMESC, los puntos clave en la escala pueden ser: 4 (movimiento leve de las tres articulaciones de la PP), 7 (movimiento amplio de las tres articulaciones de la PP) y 9 (se introduce la capacidad de soportar el peso corporal), correspondientes a los niveles de recuperación <sup>168</sup>.

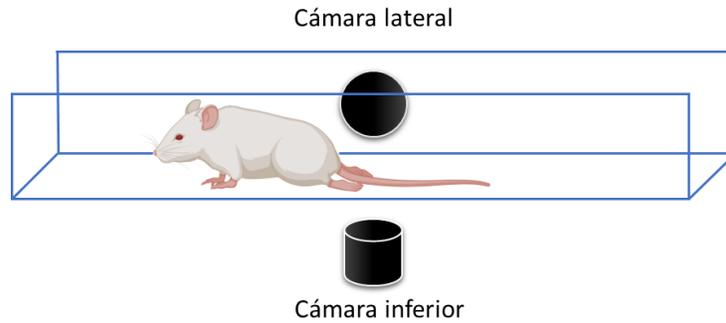


Figura 25. Análisis de locomoción en pasarela. Una cámara inferior registra el aspecto inferior del movimiento, forma de la pisada y coordinación entre patas posteriores y anteriores, en caso de presentarse. La cámara lateral registra en detalle la posición de la pata y la capacidad de soporte del peso corporal.

#### 4.1.2. Recuperación motora de animales con LMESC

A la primera semana, los animales quedan paráliticos, de tal manera que se mueven utilizando sus patas anteriores, arrastrando las patas posteriores sin soporte del peso corporal (Figura 26).

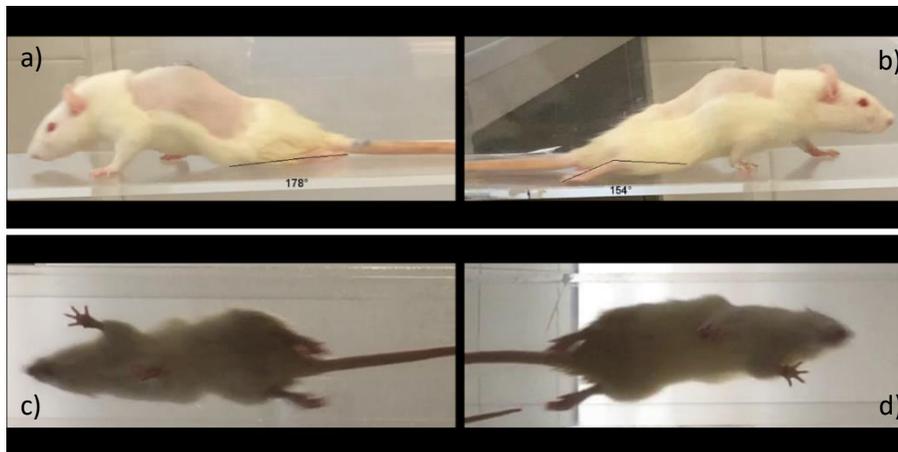


Figura 26. Capturas de la locomoción a la primera semana después de la lesión. El animal pierde el control de las patas posteriores, las cuales son arrastradas y por lo tanto el ángulo rodilla-tobillo-dedos tiende a los  $180^\circ$ , como se observa en a) vista pata izquierda, b) vista pata derecha, c) y d) ángulo inferior de a) y b) respectivamente.

A la cuarta semana, el grupo PLA+pPPy-I muestra una recuperación funcional tal que logran mover ligera a ampliamente las articulaciones cadera, rodilla y tobillo (de 4 a 7 puntos en la escala BBB). Además, hay intentos ocasionales de soporte del peso corporal y pasos plantares, los cuales son rasgos claves de la recuperación motora<sup>18</sup> (Figura 27).

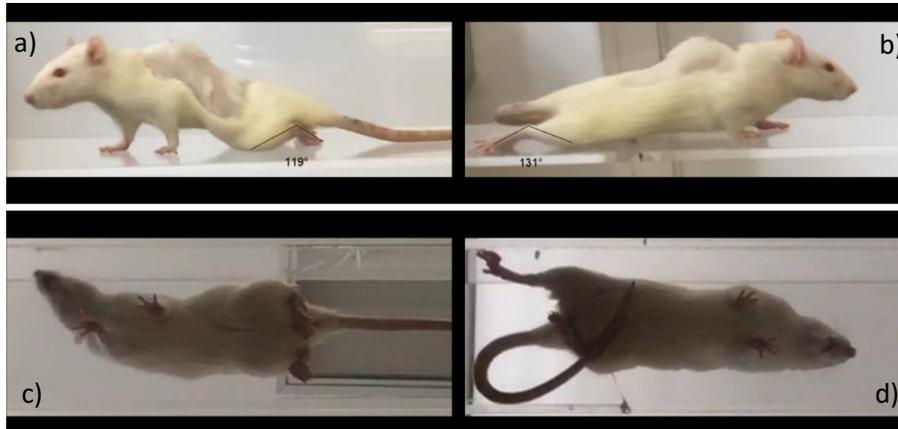


Figura 27. Capturas de la locomoción de un animal implantado con PLA+pPPy-I cuatro semanas después de la lesión. En este caso se muestra el mismo animal que en la Figura 26. Hay una reducción en el ángulo rodilla-tobillo-dedos como se observa en a) y b) vistas de la pata izquierda y derecha respectivamente. Se detecta intento de soporte del peso corporal en lado derecho (b). En la pata izquierda el paso tiende a ser dorsal (c) mientras que en la derecha hay apoyo ocasional de la planta (d). Vista lateral izquierda en a) y derecha en b); c) y d) ángulos inferiores de a) y b) respectivamente.

En la semana 8 el grupo PLA+pPPy-I mostró un nivel de recuperación funcional significativamente superior al grupo control (Figura 28).

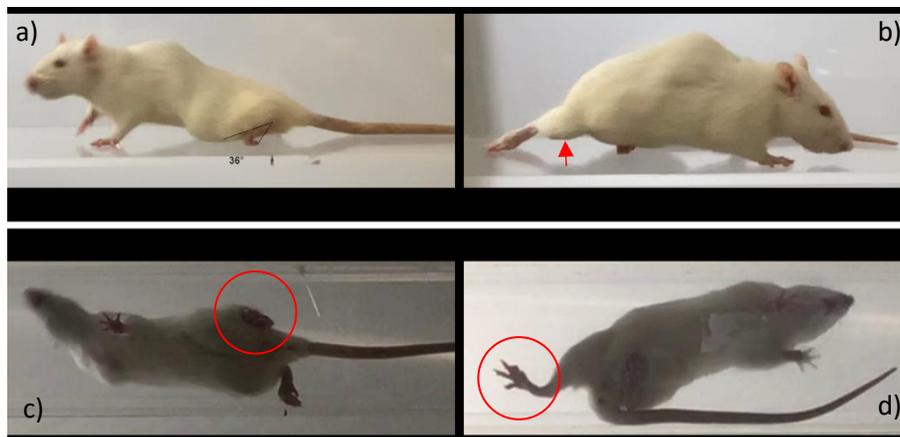


Figura 28. Capturas de la locomoción a la semana 8 después de la lesión del animal implantado con PLA+pPPy-I (mismo caso). Las articulaciones presentan una mayor movilidad (a) el ángulo rodilla-tobillo-dedos se reduce), el soporte del peso corporal se vuelve más frecuente (b) y ocasionalmente se detecta separación de los dedos en la pata posterior (d). En el lado izquierdo se detectan pasos preferentemente dorsales (a) y (c), sugiriendo que la recuperación es superior en el lado derecho en este caso. Vista lateral izquierda a), c) ángulo inferior de a); b) vista lateral derecha, d) ángulo inferior de b) antes de levantar la pata para dar el paso con soporte del peso corporal.

A pesar de no presentar coordinación entre patas anteriores y posteriores, lo cual representa un puntaje de 12 en la escala BBB, sí se detecta ocasionalmente la separación de los dedos en ciertos casos con implante fibrilar. Esta característica se presenta en la escala BBB a partir de los 15 puntos, mencionándose después de la recuperación de la coordinación entre patas anteriores y posteriores<sup>18</sup>.

En la Figura 29, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación semanal en los grupos de estudio. El grupo control presentó una recuperación espontánea, lo cual es común en este modelo animal<sup>172</sup>. Comparado con el grupo control, PLA+pPPy-I presentó una recuperación significativamente superior a la semana 5 y 8.

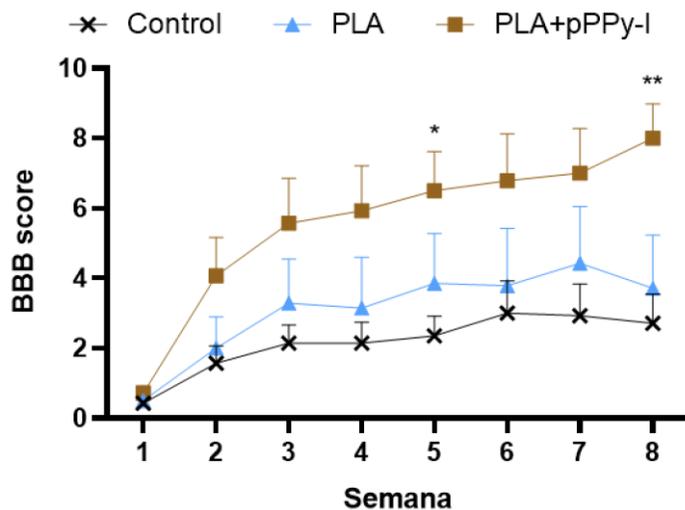


Figura 29. Puntuación en la escala BBB de animales de estudio durante 8 semanas. La gráfica muestra la media  $\pm$  ESM,  $n=7$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  entre Control y PLA+pPPy-I, por ANOVA de medias repetidas.

Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico por ANOVA de dos vías, para detectar si debido al tratamiento había cambios relevantes en el tiempo. Ni en el grupo control ni en PLA hubo diferencias significativas entre las medias de BBB entre las semanas de estudio, mientras que en el grupo PLA+pPPy-I hubo diferencias significativas a partir de la semana 4 con respecto a la semana 1. Este comportamiento muestra que a pesar de que en los 3 grupos existe una recuperación espontánea por cambios debidos a los mecanismos propios de los animales en respuesta a la lesión, en el grupo PLA+pPPy-I se observa una recuperación significativamente más rápida, la cual se mantiene hacia valores mayores mientras que en los otros grupos incluso dicha recuperación espontánea decaía hacia la semana 8.

#### 4.2. Electrofisiología

Los potenciales evocados son una herramienta objetiva y cuantitativa para estimar la funcionalidad de las vías neurales<sup>173,174</sup>. Son técnicas diagnósticas ampliamente utilizadas en la clínica ya que contribuyen a identificar vías neurales, la velocidad de conducción y cantidad de fibras funcionales.

En el contexto de la LME los potenciales evocados se utilizan para diagnosticar la progresión de la recuperación o déficit, tipo de lesión (completa/incompleta) y en el caso de la lesión completa, si la recuperación se debe a una reconexión o reorganización de las vías por debajo de la lesión <sup>168,175</sup>. Por lo tanto, el análisis de los potenciales evocados es una técnica comúnmente utilizada para evaluar estrategias para el tratamiento de la LME.

Al estimular el sistema nervioso inevitablemente se debe tener en cuenta el artefacto del estímulo. Su origen es complejo y se considera que sus características tales como duración y amplitud dependen de cada sujeto <sup>176</sup>. Usualmente se toma como punto de referencia para medir la latencia del potencial evocado, pero la contaminación de la señal por el artefacto del estímulo es un problema común <sup>176,177</sup>.

Por otro lado, las señales deben ser filtradas para obtener potenciales evocados libres del ruido del ambiente, tanto de la línea eléctrica (filtro rechaza banda de 60Hz) como del mismo paciente <sup>178</sup>. Comúnmente, a los potenciales evocados motores y somatosensoriales se les aplican filtros pasa banda entre 1 y 5000 Hz, de acuerdo con las características de las señales <sup>76,112,179-181</sup>.

De acuerdo con la literatura, una latencia entre 5-20 ms es lo común en animales intactos <sup>173,182,183</sup>. Al presentarse déficits en las vías neuronales esta latencia aumenta como resultado del deterioro de las vías, y su amplitud se reduce, dado que la respuesta se asocia a una menor cantidad de fibras nerviosas funcionales.

#### 4.2.1. Potenciales evocados motores (PEMs)

Según Fehlings y cols. (1988) <sup>116</sup> para obtener PEMs es necesario estimular con pulsos con duración >0.2ms. Oria y cols. (2008) y otros autores con experimentos similares, utilizan 0.1ms de duración del pulso. Redondo-Castro proponen que para asegurar la correcta colocación de los electrodos, se obtengan los potenciales de acción compuesto (CMAP) del músculo tibial, que para el caso del modelo de LME es un nervio intacto <sup>113</sup>. De esta manera, se aseguran los electrodos de registro y posteriormente se cambian los de estimulación a la corteza para adquirir los PEMs.

#### 4.2.2. Potenciales evocados somatosensoriales (PESs)

Según Fehlings y cols. (1988) <sup>116</sup> la frecuencia del estímulo, duración del pulso ni la intensidad alteran la latencia o la amplitud de los picos, aunque el umbral promedio para obtener los PESs fue de  $2.9 \pm 0.8$  mA con una duración de 50  $\mu$ s.

#### 4.2.3. Anestesia

Se ha reportado que los anestésicos inhalados suprimen los PESs. Además, se recomienda hacer el estudio neuro eléctrico bajo anestesia profunda, ya que las amplitudes y latencias de las respuestas evocadas disminuyen cuando la anestesia es superficial.

El isoflurano es un anestésico estable, con menos posibles efectos adversos en la rata que la combinación xilacina/ketamina, facilita una recuperación eficiente de la anestesia, se puede controlar más fácilmente que anestésicos inyectados y produce menos estrés en el roedor. Sin embargo, afecta los potenciales evocados, dado que incrementa la latencia y disminuye la amplitud de las respuestas. Esto es porque entorpece la transmisión pre- y postsináptica y disminuye la

activación cortical por la vía aferente primaria<sup>182</sup>. Por otro lado, se ha reportado que la combinación xilacina/zoletil presenta variabilidad<sup>106</sup>, sin embargo, en este trabajo se utiliza esta combinación ya que no suprime las respuestas evocadas.

#### 4.2.4. Metodología

##### 4.2.4.1. Registro

El protocolo de anestesia fue el mismo que para la cirugía y los estudios de resonancia magnética: 10 mg/kg de xilacina y 10 mg/Kg de Zoletil. Se aseguró la anestesia profunda verificando mediante estímulos en las patas anteriores que no hubiera respuesta y de ser necesario se ajustó la dosis de Zoletil agregando 0.02ml (Zoletil 100, vial de 100mg/ml).

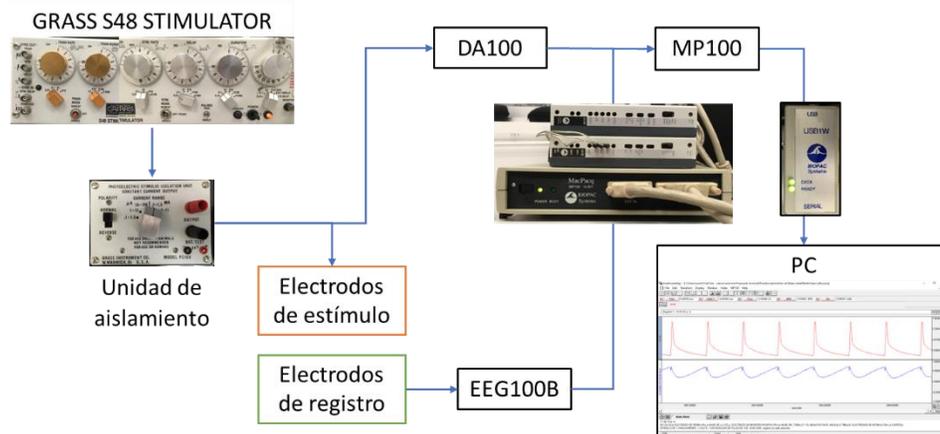
Para el registro, se utilizó el equipo BIOPAC MP100 y el software de registro y análisis AcqKnowledge 3.9.1. El MP100 fue acoplado a los amplificadores DA100 y EEG100B, con el filtro rechaza banda de 60Hz activo en los amplificadores. Para la estimulación se trabajó con el estimulador GRASS acoplado a una unidad de corriente aislada PSIU6 y con el módulo UIM100A acoplado al estimulador STM100A, conectado al adaptador STMISO para aplicar el estímulo al animal (Figura 30).

Los estímulos se aplicaron a través de electrodos de aguja subdérmicos (25x0.35mm, 28G, marca Technomed ref TE/AP2535-335). Para los PEMs se estimuló a 1 Hz, 1 ms de ancho de pulso. Para los PES se aplicaron estímulos a 2.5Hz (cada 0.4s), con 0.05ms de ancho de pulso. El estímulo fue registrado por el DA100 y las respuestas evocadas por el EEG100B utilizando electrodos de aguja subdérmicos. Para obtener PEMs, se insertaron dos electrodos de estímulo entre las orejas sobre la corteza motora<sup>114</sup>, el electrodo de tierra se insertó en la base de la cola, el electrodo activo de registro en el músculo sobre el nervio tibial y el electrodo de referencia en la almohadilla plantar, evitando tocar algún nervio<sup>184</sup> (Figura 31).

Se registraron y promediaron al menos 200 a 300 respuestas (PEMs y PESs respectivamente). La frecuencia de muestreo fue de 4000 muestras por segundo. Se les aplicó un filtro pasa banda de 10 a 1000 Hz a cada potencial evocado, antes de promediarlos con el fin de reducir el ruido. Adicionalmente, se adquirieron los potenciales evocados de las patas delanteras como referencia<sup>181</sup>.

Finalizado el estudio, los animales se dejan en recuperación junto a una fuente de calor hasta que despiertan completamente y se les aplica analgésico (Tramadol vía subcutánea, 5mg/Kg).

A) Instrumentación con GRASS



B) Instrumentación con STM100A – STMISO

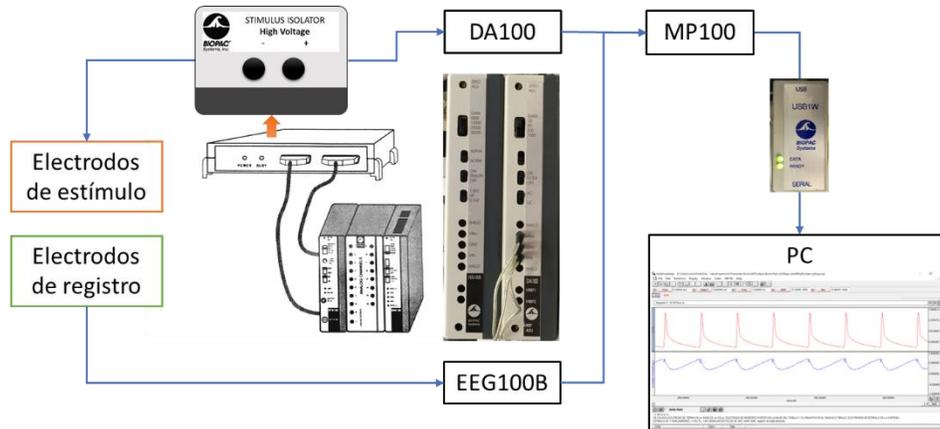


Figura 30. Instrumentación de registro de potenciales evocados.

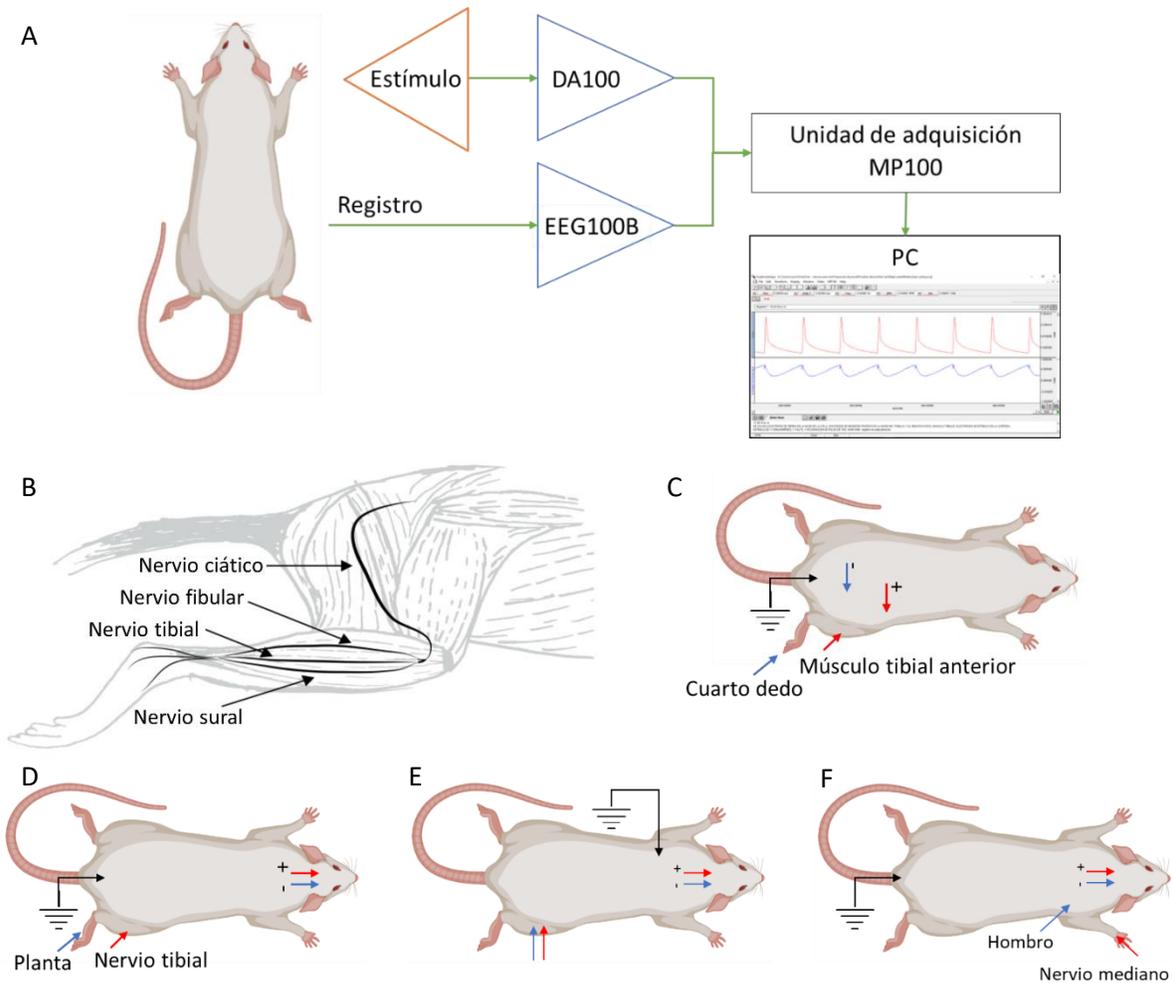


Figura 31. Instrumentación para la adquisición de potenciales evocados. A) Configuración de los módulos del MP100 para adquisición de potenciales evocados: El módulo del estímulo se conectó al amplificador DA100, para registrar la entrada de los estímulos que iban al animal por medio de los electrodos de aguja. Las señales se adquirieron utilizando electrodos de aguja y se enviaron al amplificador EEG100B. Con la unidad de adquisición conectada a una PC se almacenaron las señales para su posterior procesamiento y análisis. B) Referencia anatómica del nervio ciático para ubicar los electrodos de estímulo y registro, imagen modificada de <sup>185</sup>. C) Ubicación de los electrodos para registrar el CMAP del músculo tibial. El estímulo se aplica en el foramen ciático y se registra la respuesta con el electrodo activo en el músculo tibial anterior y la referencia en el cuarto dedo de la pata. Figura adaptada de <sup>113</sup>. D) Configuración para obtener PEMs, con el ánodo (+) hacia el nervio tibial, el cátodo hacia la planta, la tierra en la base de la cola y los electrodos de estímulo hacia la corteza. E) Configuración para PESs, con dos electrodos de estimulación hacia el nervio tibial, en paralelo con 5mm de separación, la tierra al hombro opuesto y los electrodos de registro hacia la corteza, basado en <sup>114</sup>. F) Electrodos de registro de referencia de vía intacta de la pata delantera. El ánodo (+) se colocó hacia el nervio mediano <sup>186</sup>, cerca de la muñeca, el cátodo hacia el hombro y los electrodos hacia la corteza. Para el estudio de cada pata se tuvo en cuenta el cruce de los tractos piramidales, por lo que, al estudiar la pata derecha, por ejemplo, se colocaron los electrodos en la corteza con el ánodo (+) hacia el hemisferio izquierdo <sup>184</sup>.

#### 4.2.4.2. Procesamiento de señales

El procesamiento de señales bioeléctricas se realizó en MATLAB 2020. Se programó un script con el siguiente diagrama de flujo:

1. Se importa la señal
2. Las respuestas evocadas se filtran con un filtro pasa banda de 10-1000Hz.
3. Se localizan los picos del estímulo utilizando la función `findpeaks()` (Figura 32).
4. Se divide la señal por ventanas del tamaño del periodo de estímulo.
5. Se promedia cada ventana.
6. Se verifica que el procedimiento se haya hecho correctamente, graficando los estímulos y verificando que se encuentren empalmados.

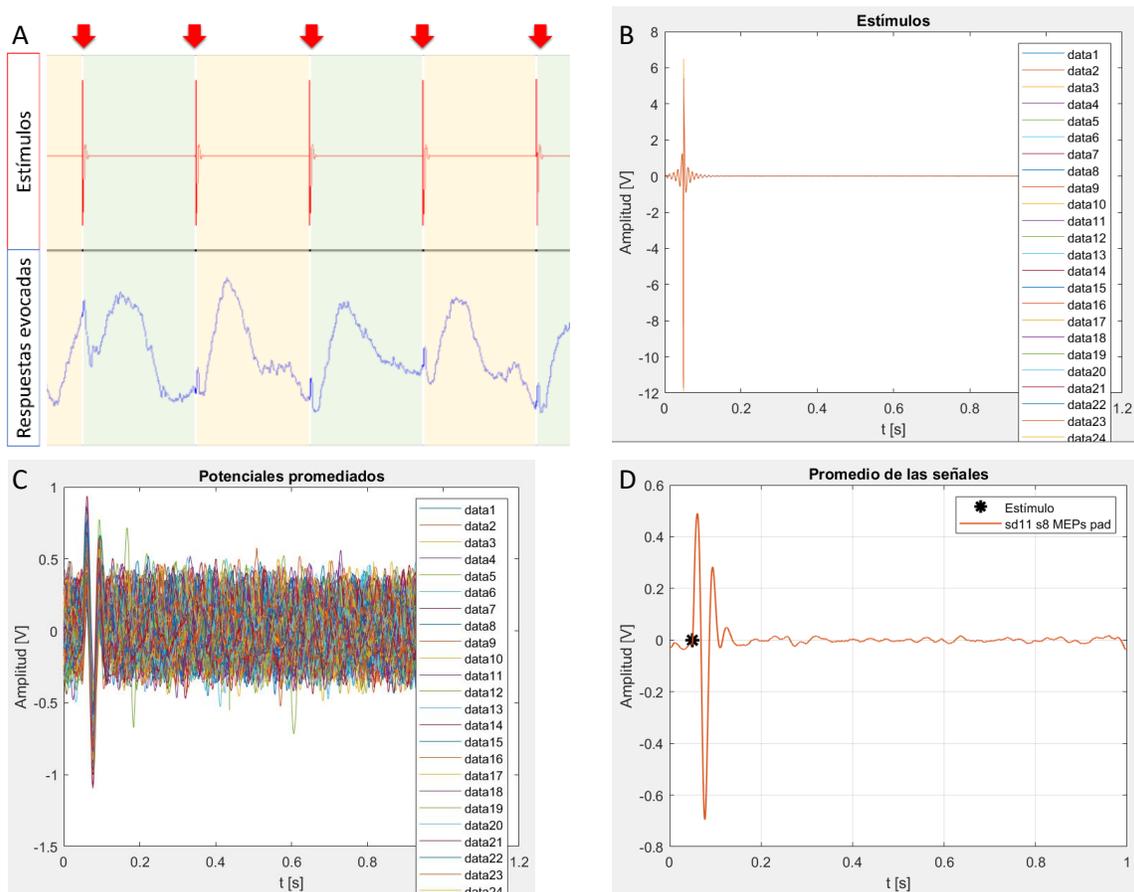


Figura 32. Procesamiento de los potenciales evocados. A) La señal filtrada se divide por ventanas del tamaño del periodo del estímulo, tomando como inicio el pico de éste para promediar las respuestas asociadas a cada estímulo. B) Verificación del procedimiento, graficando cada ventana del estímulo y asegurando su empalme. C) Gráfica de las respuestas asociadas a cada estímulo empalmadas. D) Señal resultante del promedio, \* entrada del estímulo.

## 4.2.5. Análisis de potenciales evocados en animales experimentales

### 4.2.5.1. PEMs

Los potenciales motores obtenidos de las patas delanteras marcan una latencia corta, como se muestra en la Figura 33. La cercanía entre los electrodos refleja una mayor amplitud del MEP en la pata anterior respecto a la posterior.

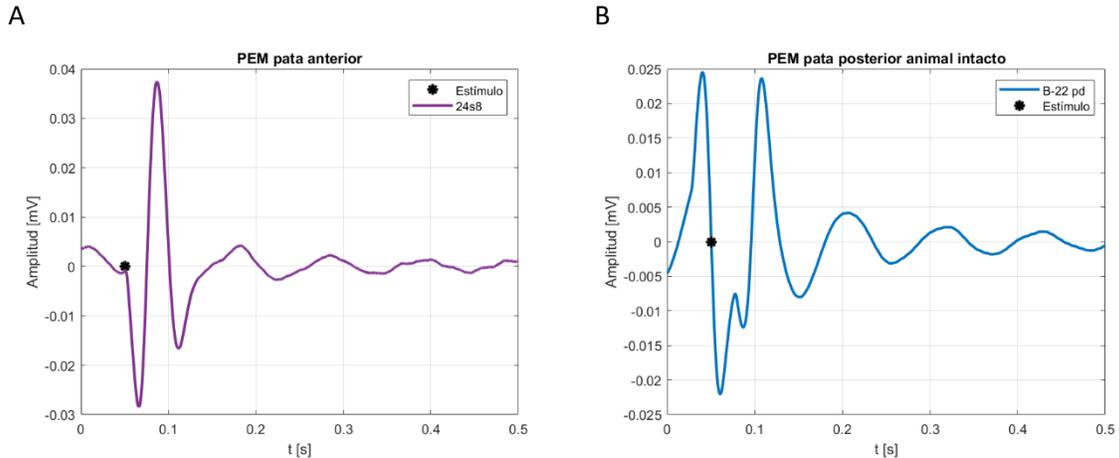


Figura 33. PEMs en vías intactas. A) PEM obtenido de la pata delantera como referencia, con una latencia de 1.5ms, 64 $\mu$ V, pico a pico de amplitud. Los estímulos se aplicaron con el STMISO. B) PEM obtenido de la pata posterior de un animal intacto (sin LME), donde el artefacto del estímulo se encuentra encimado con la respuesta. Los estímulos se aplicaron con el GRASS.

Dadas las complicaciones para analizar las señales obtenidas con el estimulador GRASS, se continuaron los análisis con el estimulador STMISO.

Pruebas realizadas en animales con la LMESC a la semana 8 de estudio muestran potenciales evocados en animales implantados con el compuesto fibrilar, como se muestra en la Figura 34.

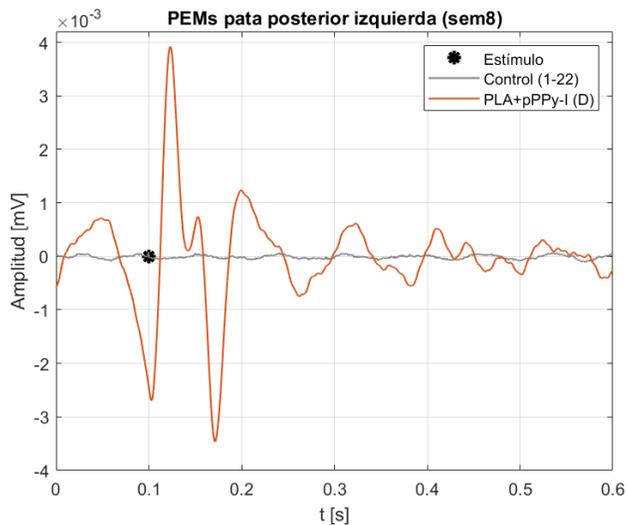


Figura 34. PEMs registrados tras 8 semanas de estudio en Control y PLA+pPPy-I. En contraste con el control donde no se obtuvieron respuestas evocadas, el animal implantado muestra una respuesta evocada. Sin embargo, el artefacto del estímulo se encuentra traslapado con el PEM.

En la Figura 35, se presenta una comparación de los PEMs obtenidos de un animal control, uno con PLA y uno con PLA+pPPy-I. No se lograron obtener las latencias de las señales, ya que el artefacto del estímulo se confunde con la respuesta evocada, por lo que es necesario realizar más estudios y afinar la técnica para poder obtener resultados concluyentes <sup>176</sup>.

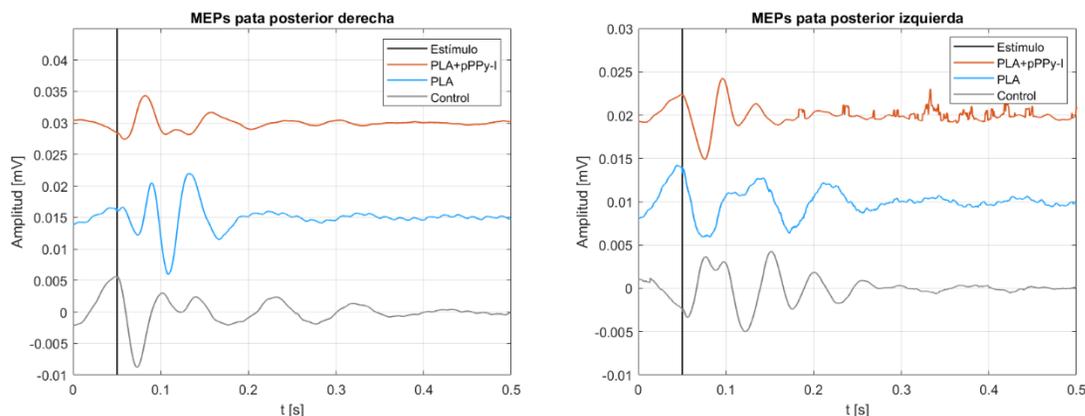


Figura 35. Comparación PEMs entre grupos de estudio. Respuestas obtenidas de las patas posteriores de tres animales en la semana 8.

#### 4.2.5.2. PESs

Los PESs presentaron la dificultad de registrarse mediante electrodos de aguja por el aislamiento que provee el cráneo, sin embargo, se obtuvieron señales a través de tractos sensoriales espinales hacia la corteza cerebral.

Como se observa en la Figura 36 (A), la referencia del intacto muestra el artefacto del estímulo contaminando la respuesta, por lo que no permite medir la latencia. Como ejemplo, se muestra un animal control en la Figura 36 (B), que muestra únicamente el artefacto del estímulo, sin respuesta evocada, lo cual se espera de animales control sin tratamiento. En C y D de la Figura 36, se muestran los PESs de un animal con PLA+pPPy-I y PLA comparado con un intacto, respectivamente. El animal con PLA+pPPy-I presentó una latencia de 146 ms seguido de una respuesta 2.26 $\mu$ V de amplitud, no obstante, la latencia no fue clara en el intacto y PLA.

Adicionalmente, se evidenció que la amplitud de las señales puede verse afectada por la impedancia de cada individuo, lo cual dificulta la comparación entre sujetos y por lo tanto es necesario realizar más pruebas para obtener conclusiones de las pruebas electrofisiológicas <sup>187</sup>. Otra limitación es que al realizar la promediación de las señales a posteriori, no se pueden corregir errores en tiempo real durante la adquisición tales como colocación de los electrodos de aguja y amplitud del estímulo, por lo que es necesario implementar la promediación en tiempo real para limitar la pérdida de datos electrofisiológicos.

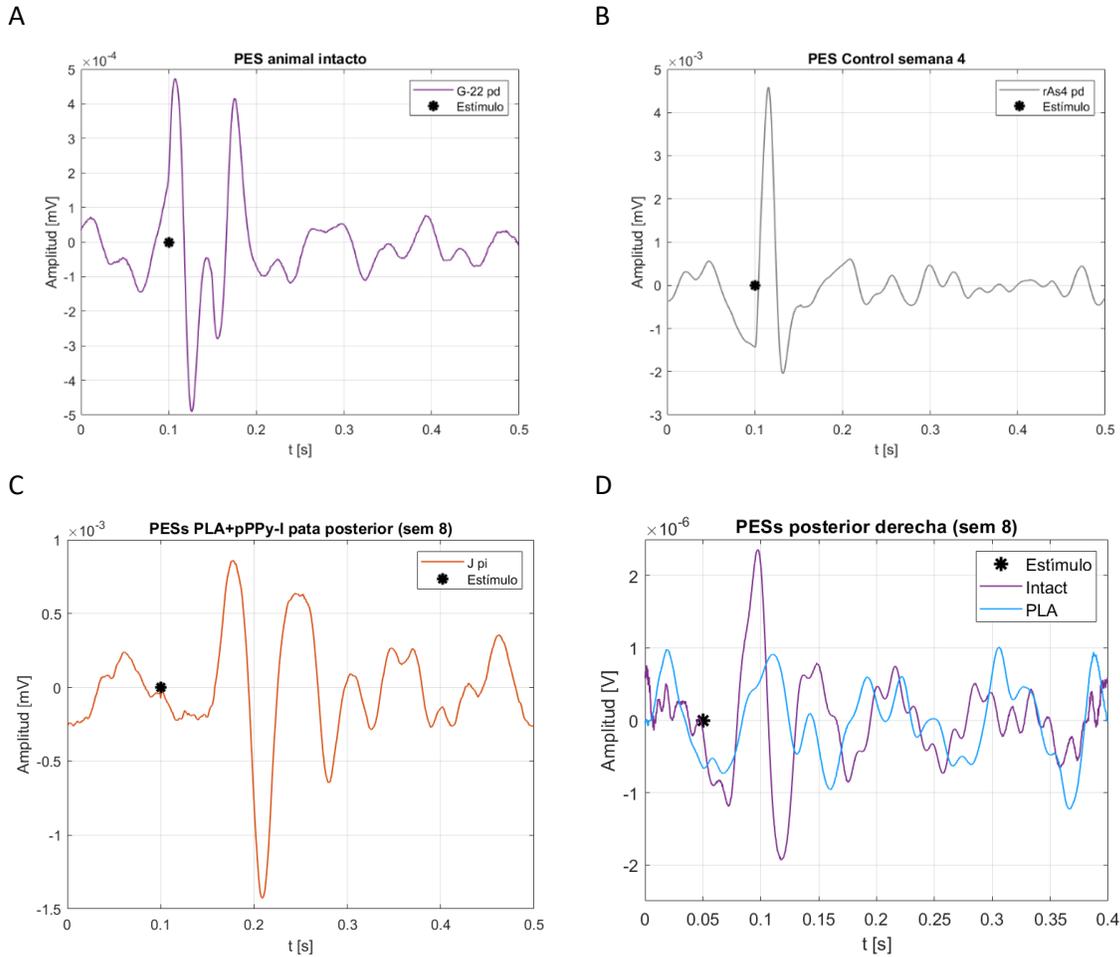


Figura 36. Potenciales evocados somatosensoriales de las patas traseras. En A) animal intacto, B) control. C) PLA+pPPy-I y D) comparación entre un animal intacto y uno con PLA, donde se hace evidente la necesidad de un análisis más profundo para caracterizar la velocidad de respuesta del potencial evocado.

Estos resultados demuestran que hay registros de potenciales evocados a través del tejido lesionado, lo cual sugiere que hay una conexión bioeléctrica entre los segmentos de ME seccionados en los animales implantados con el compuesto fibrilar. Estos resultados se deben complementar con más estudios que permitan visualizar las respuestas claramente en tiempo real, además de implementar técnicas que permitan separar el artefacto del estímulo del potencial evocado, para definir el tiempo de latencia y su amplitud <sup>177</sup>.

## Capítulo 5. Estudio de la estructura tisular por imagenología de resonancia magnética

La IRM es una técnica no ionizante para el estudio de los tejidos *in vivo*, de forma tridimensional y alta resolución espacial. A pesar de su alto costo y su lenta resolución temporal, es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las enfermedades neurológicas del cerebro y la ME, angiografía, función cardíaca, estructura de músculos y ligamentos, gracias a que produce imágenes con excelente contraste de los tejidos blandos <sup>188</sup>.

La señal de IRM proviene de los protones presentes en el agua y los lípidos del cuerpo. El paciente se introduce dentro de un imán de alto campo magnético y sus protones se alinean a dicho campo magnético. La aplicación de campos de radiofrecuencia (RF) produce cambios en los protones de los tejidos, los cuales son codificados de acuerdo con un contraste o intensidad y así poder identificarlos <sup>188</sup>. Tejidos que sean hiperintensos en T1 muestran la presencia de grasa, mientras que una hiperintensidad T2 muestra grasa y agua. Un tejido que es hipointenso en T1 pero hiperintenso en T2, sugiere la presencia de líquido, edema, o cavidades (Tabla 4) <sup>160,189</sup>.

Tabla 4. Interpretación del contraste en IRM

	T1	T2
Hiperintenso	Grasa	Grasa y agua
Hipointenso	Líquido, patología	Hueso, patología

Dado que la información que provee la IRM convencional no es específica y no es sensible a los cambios microestructurales de los tejidos, técnicas avanzadas como DTI y MRS surgen como herramientas para permitir un diagnóstico más acertado de las condiciones tisulares <sup>190</sup>.

DTI es una técnica que detecta el movimiento de las moléculas de agua. El agua se mueve de forma libre en cualquier dirección, siendo limitada por las estructuras que la confinan. En las células del cuerpo, la difusión del agua se ve afectada por las estructuras membranales, de tal manera que, en tejidos como axones, fibras nerviosas o tractos de la materia blanca, la difusión el agua difunde preferentemente en la dirección longitudinal, mientras que la difusión perpendicular es restringida.

Este movimiento se modela matemáticamente como un tensor definido en el espacio ortogonal con tres vectores asociados a la función de densidad de probabilidad (FDP) de la difusión del agua. Si los vectores tienen la misma magnitud, el tensor representa una esfera donde la difusión es isotrópica (igual en todas las direcciones), mientras que, si se mueven en una dirección particular, el tensor adquiere una representación elipsoide. Este modelo es la base de DTI. Dado que en las fibras nerviosas la mayor difusión se restringe hacia el eje longitudinal, la difusión axial es mayor que la perpendicular o radial, lo cual se conoce como difusión anisotrópica (Figura 37) <sup>191</sup>.

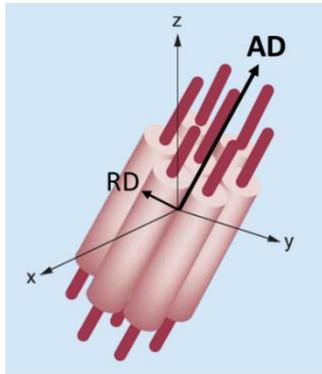


Figura 37. Esquema de la difusión en los tractos neuronales. Las membranas celulares de los axones y el recubrimiento de las vainas de mielina forman una barrera que restringe la difusión del agua en la dirección longitudinal o axial (AD), mientras que la difusión perpendicular o radial es menor (RD).

Por lo tanto, DTI permite caracterizar la microestructura tisular, ofreciendo además medidas cuantitativas de la difusión del agua <sup>74,77,79,192</sup>. La más utilizada es la FA, una medida de la difusión preferente del agua en el tejido, donde 0 corresponde a una difusión isotrópica y 1, una difusión anisotrópica. Por ejemplo, la difusión isotrópica se presenta en los espacios del LCR, mientras que la difusión anisotrópica se presenta en los tractos de la materia blanca <sup>193</sup>.

La MRS proporciona información a nivel molecular del tejido, ya que permite obtener la concentración de metabolitos fisiopatológicos, aumentando la sensibilidad de la RM *in vivo* y contribuyendo a realizar diagnósticos más acertados <sup>190</sup>. Además, permite realizar evaluaciones longitudinales de los tejidos a nivel molecular y la evolución de enfermedades <sup>194,195</sup>. Es una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico de isquemia y tumores cerebrales <sup>195</sup>.

La identificación de los metabolitos es posible gracias al desplazamiento químico que experimentan los átomos en el estudio de RM, y es particular de cada compuesto. Normalmente se expresa en partes por millón (ppm) <sup>195</sup>. Dado que la señal del agua en los tejidos es mucho mayor que la de los demás metabolitos, las secuencias empleadas para su detección incluyen supresión del pico del agua. Entre los metabolitos fisiopatológicos en el estudio del SNC destacan el N-acetil aspartato (NAA), Myo-inositol (mi), colina (Cho), creatina (Cr), lactato (Lac), glutamato-glutamina-GABA (Glx) <sup>196,197</sup>.

Creatina y fosfocreatina (Cr y Cr2) son compuestos implicados en la regulación del metabolismo energético celular. Cr2 es un reservorio de fosfatos de alta energía en el citosol de neuronas y músculos, que se detecta en 3.9 ppm. La señal de Cr es mayor en la materia gris que en la blanca <sup>195</sup>. Detectada en 3.0ppm, Cr se considera constante, y por lo tanto se utiliza como una referencia de concentración interna <sup>196</sup>. Aunque estudios más recientes demuestran que los niveles de Cr se alteran en procesos patológicos <sup>194,198</sup>, se sigue utilizando como un metabolito de referencia ya que la evidencia sugiere que los índices referidos a Cr son marcadores potenciales de procesos fisiopatológicos <sup>190</sup>.

Es importante mencionar que el neurotransmisor GABA, que es de muy baja concentración en el cerebro, se presenta al igual que otros metabolitos de mayor concentración como la Cr en 3.0 ppm <sup>199</sup>.

NAA es un marcador de tejido nervioso sano, que se presenta en neuronas, oligodendrocitos y mielina funcionales y se detecta en 2.01ppm. El NAA es parte de las vías de señalización entre neuronas y glía <sup>200</sup>. Dado que Cr está presente en neuronas y en la glía, NAA/Cr representa la proporción de neuronas funcionales. Una reducción en NAA/Cr se asocia a la pérdida neuronal. Qian y cols. encontraron que Cr también disminuye al igual que NAA en la lesión por contusión. <sup>194</sup>.

Cho es un biomarcador del metabolismo de la membrana celular que refleja la densidad celular y la tasa de rotación de membranas celulares <sup>194</sup>. Por otro lado, es un producto de la descomposición de la mielina, así como indicador de la proliferación de células tumorales <sup>198</sup>. La disminución en la síntesis de membranas celulares podría estar asociada con la cavidad y la fibrosis en el EC, mientras que el aumento podría estar asociado a la síntesis o densidad celular <sup>194,201,202</sup>.

En un espectro típico PRESS, resonando en 3.75 ppm, 2.3 ppm y 2.1 ppm se encuentra el glutamato. Estas resonancias se superponen a las señales de otros metabolitos, en particular la glutamina, por lo que con frecuencia se reportan como Glx <sup>199</sup>. La excitotoxicidad es un efecto del daño secundario que es parte del desbalance bioquímico en el sitio de la lesión. Después de una LME, los niveles de Glutamato se han encontrado en niveles que pueden ser neurotóxicos.

El ml es un marcador glial, que tiene un papel crucial en la señalización intracelular. Su incremento se asocia con la proliferación de células gliales. Después de una LME se presenta astrogliosis, reflejándose en un incremento del ml <sup>198,202</sup>.

La resonancia de ml y Glx, así como de lípidos se detecta en secuencias con TE cortos (18 a 45ms), debido a su tiempo de relajación muy corto. Por otro lado, TE más largos (288ms) permiten la detección correcta de lactato (Lac), metabolito relevante en procesos inflamatorios. La elección de los parámetros de adquisición a su vez tiene limitaciones que se relacionan con los tiempos de adquisición y la relación señal a ruido (SNR) por lo que con frecuencia se opta por una optimización de parámetros comprometiendo cierta información <sup>198,203</sup>. En este caso, se utilizó un TE de 144ms, dada su SNR y tiempo de adquisición adecuados para un tamaño de voxel tan pequeño como el seleccionado en el presente estudio.

En el parénquima nervioso sano, un espectro normal muestra un pico prominente de NAA, seguido de un pico de Cr y uno de menor amplitud de Cho, como se muestra en la Figura 38.

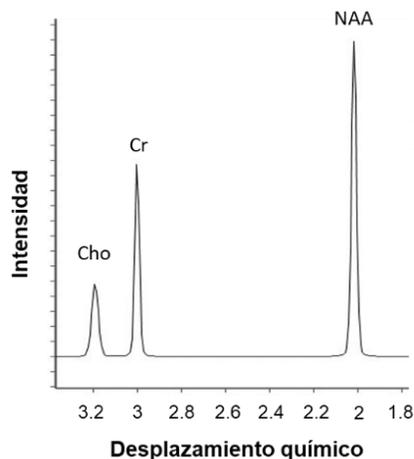


Figura 38. Espectro de RM de la médula espinal de una rata intacta. En este caso, al adquirir con un TE “intermedio” de 144ms, se detecta N-acetil-aspartato (NAA) en 2.01ppm, creatina (Cr) en 3.0ppm y colina (Cho) en 3.2ppm <sup>197,198</sup>.

### 5.1. Metodología

Los animales se anestesiaron con el protocolo estándar (10 mg/kg de xilacina y 10 mg/Kg de Zoletil). La vejiga se drenó, se les aplicó gel ocular y sus orejas se cubrieron con gasas para protegerlas del ruido y mantener la temperatura corporal. Para marcar la zona de interés, se colocó una cápsula de gel, la cual emite señal de RM. El cuerpo se envolvió con una microfibras para disminuir el efecto del movimiento asociado a la respiración y mantener la temperatura corporal (Figura 39).

Los estudios de RM se realizaron a la semana 1, para verificar la lesión y los efectos iniciales de los andamios; y a las semanas 4 y 8 para estudiar los cambios asociados al daño secundario y a los efectos de los implantes.

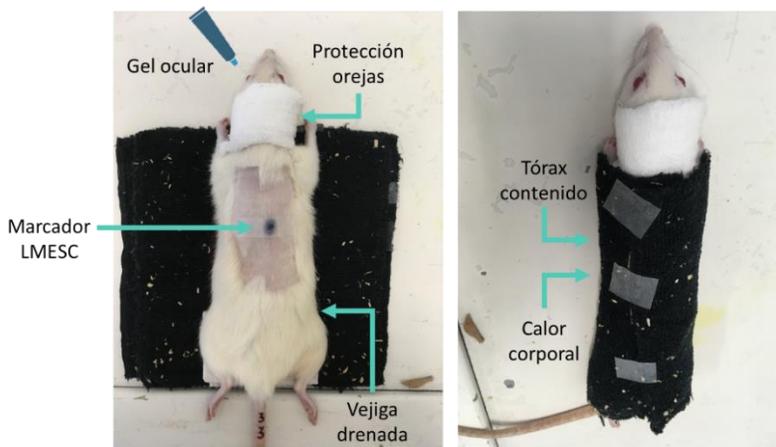


Figura 39. Preparación de los animales para los estudios de RM.

### 5.1.1. Adquisición

Se utilizó el equipo de resonancia magnética de 3T Phillips Achieva del CI3M, acoplado a una antena neurovascular de 16 canales, donde se introdujeron los animales por parejas. Se adquirieron imágenes anatómicas con los contrastes T1 y T2 para un análisis general del estado de los animales. Para las imágenes T1 se utilizó una secuencia TFE Gradient Recalled 3D con TE = 4.6ms, TR = 9.9ms, matriz de 384x384, tamaño de voxel 0.8x1.08x0.8 mm, campo de visión (FOV) 246x246 mm, 140 rebanadas de 0.8mm de grosor, espacio entre rebanadas (Gap) de -0.4, número de señales promediadas (NSA) 7. Las imágenes T2 se adquirieron de forma sagital mediante la secuencia Spin Echo con TE = 80ms, TR = 3000ms, matriz de 512x512, FOV 230x230 mm, voxeles de 0.6x0.62x2 mm, 24 rebanadas de 2mm de grosor, NSA 4.

Estas secuencias después son utilizadas para planear la adquisición de las imágenes DTI (Figura 40).

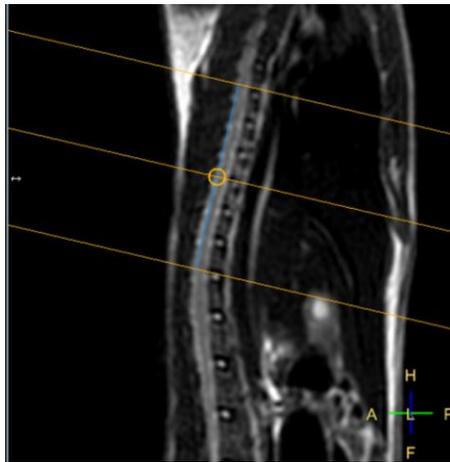


Figura 40. Región de adquisición de las imágenes por tensor de difusión. Vista sagital de la región de adquisición, ubicada en T9.

Para obtener las imágenes DTI, se utilizó una secuencia ponderada en difusión de 33 direcciones, adquirida de manera trasversal. El valor b fue de 800 s/mm<sup>2</sup>, TE = 84 ms, TR = 2521 ms, tamaño de voxel 1.51x1.54x1.5 mm, FOV = 224x224 mm, matriz de 160x160, 20 rebanadas, NSA 9.

El espectro de RM se adquirió a nivel de la T9, en el epicentro de la lesión (Figura 41), mediante la secuencia PRESS (point-resolved)<sup>199</sup> con supresión del agua, TE = 144 ms, TR = 2000 ms, multivoxel de 5x1x5 mm, NSA 32. El espectro se procesó en el software del equipo, ajustando la curva a para la detección de NAA, Cho y Cr.

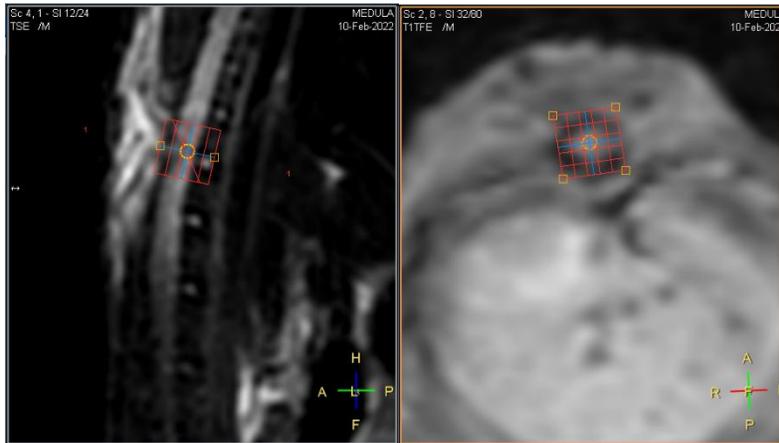


Figura 41. Adquisición del espectro de RM. La región de interés se localizó a nivel de la vértebra T9, en el epicentro de la lesión.

### 5.1.2. Procesamiento

Se aplicó una interpolación de 100x a las imágenes T1 y T2 para mejorar la definición de las estructuras (Figura 42). El script para Matlab es el siguiente:

```

%% Interpolación de imágenes de RM
% 1. Importar la imagen
File_Name='nombre-del-archivo.tif'; %formato de imagen soportado por Matlab.
imagen=imread(File_Name);
figure
imshow(imagen)
% 2. Seleccionar la región de interés (row,column)
A=imagen(10:128,142:266);
imshow(A) %visualizar la región de interés
%%
% 3. Ejecutar el interpolante F
F = griddedInterpolant(double(A));
[sx,sy,sz] = size(A);
% 4. Ejecuta el zoom x100
xq = (1:0.01:sx)'; %cada pixel se divide 100x en x
yq = (1:0.01:sy)'; %cada pixel se divide 100x en y
zq = (1:sz)';
F.Method = 'spline';
vq = uint8(F({xq,yq}));
figure
imshow(vq)
imwrite(vq,[File_Name(1:end-4) '_interpo.tif']) % guarda la imagen procesada

```

Imagen original

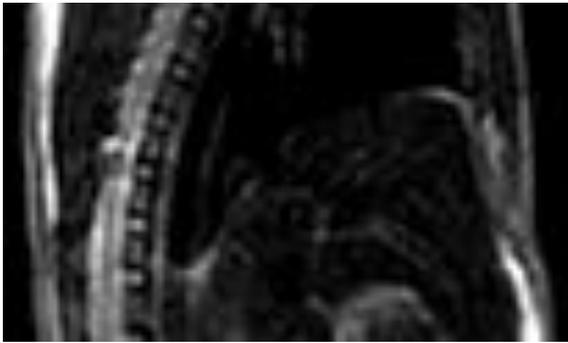


Imagen procesada

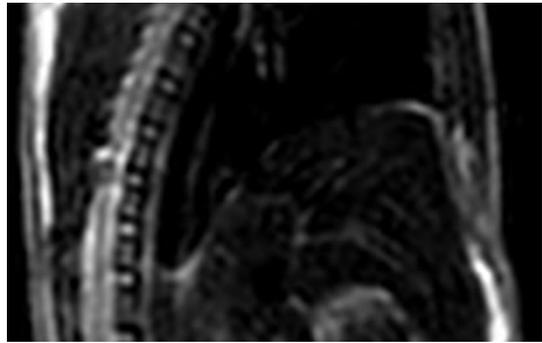


Figura 42. Procesamiento de imágenes anatómicas. Con el fin de obtener imágenes más definidas, se aplicó una interpolación x100 a las secciones de interés de la ME con LMESC.

Los datos de DTI se procesaron en DSI Studio (<https://dsi-studio.labsolver.org/>). Se calculó el tensor de difusión y se determinó la orientación de los tractos mediante un algoritmo determinístico <sup>204</sup>. Se obtuvieron los índices FA, MD, AD y RD en cada rebanada de la sección de la ME adquirida, teniendo como parte central el epicentro (EC) de la LMESC.

Para la tractografía se colocó una ROI en la ME (Figura 43) de  $327 \pm 64 \text{ mm}^3$  y se definió un umbral de anisotropía de 0.2, umbral angular de  $40^\circ$  y pasos de 0.2mm. Las fibras fueron suavizadas promediando la propagación de la dirección con el 50% de la dirección previa. Tractos menores a 1mm y mayores a 300mm fueron eliminados. Las falsas conexiones fueron eliminadas de la tractografía aplicando el algoritmo basado en topología con 2 iteraciones <sup>205</sup>.

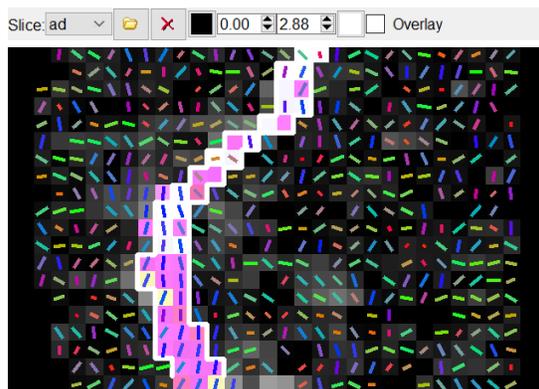


Figura 43. Segmentación de la médula por la orientación de los tractos longitudinales del DTI. En el plano sagital, como se muestra en esta imagen, el epicentro de la lesión se muestra como una discontinuidad en la orientación longitudinal.

No se consideraron los estudios que presentaron artefactos de movimiento y espectros de RM con baja señal que no fuera posible ajustar a los picos seleccionados para el análisis de metabolitos.

## 5.2. Efecto del modelo de lesión e implantes en imágenes de resonancia magnética

La LMESC se verificó en la semana 1 por RM, en primer lugar, por medio de la intensidad T1 y T2 a nivel de la T9 como un corte uniforme de la ME. En algunos casos, los animales control mostraron hipointensidad T1 y T2 en el epicentro de la lesión sugiriendo necrosis, gliosis, o hemorragia <sup>194</sup>. Los casos donde se detecta hiperintensidad T2 e hipointensidad T1 son asociados con líquido, hemorragia o fuga de LCR <sup>160</sup>, como se muestra en la Figura 44.

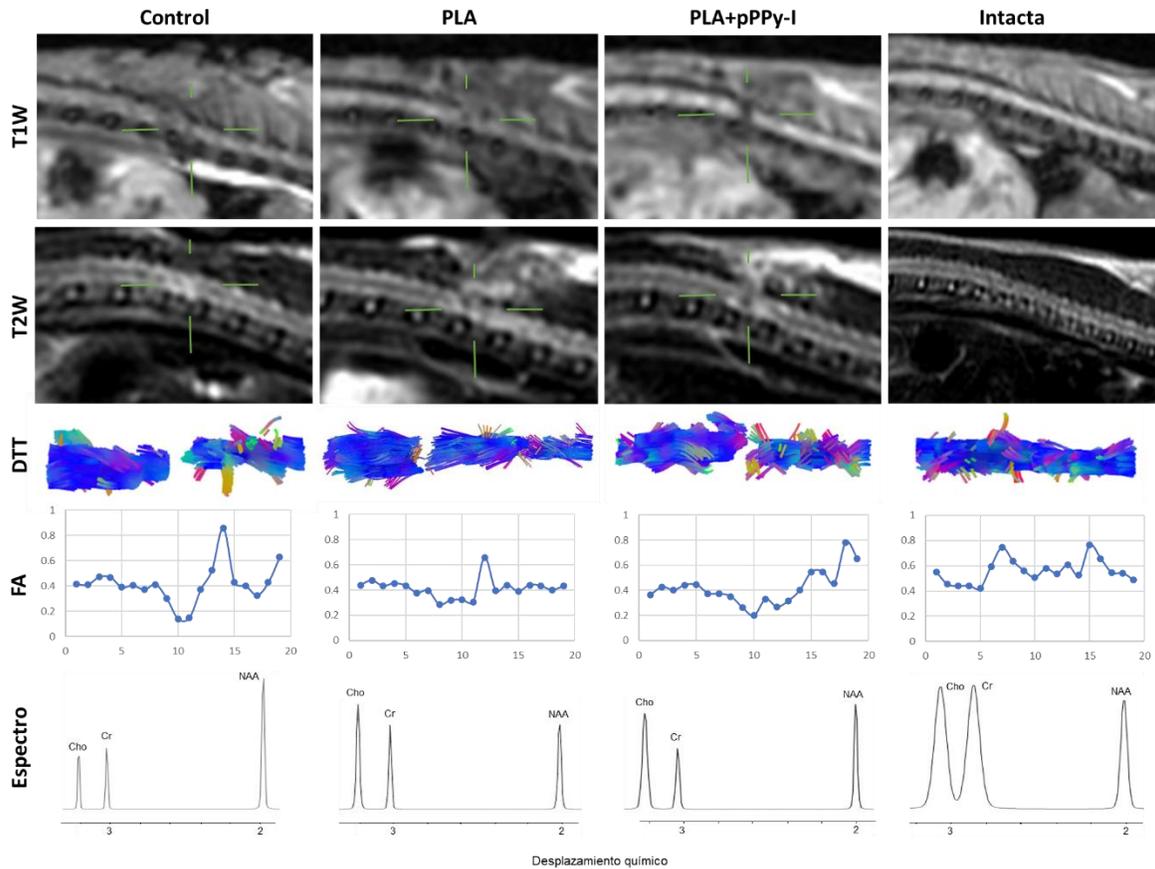


Figura 44. Imágenes representativas de RM a la semana 1. El animal control muestra T1 hipointensa y T2 hiperintensa en el epicentro de la lesión, sugiriendo hemorragia o filtración de LCR. T1 y T2 hipointensas a la primera semana después de la lesión e implante muestran la LMESC y la presencia del implante. La tractografía confirma lo mostrado por las imágenes T1 y T2, incrementando la resolución y evidenciando la microestructura de los tractos. Los valores de FA se presentan por rebanadas transversales de 1.5mm de grosor (0 lado caudal, 20 lado rostral). Por último, se presenta el espectro de RM adquirido en la zona de la lesión en cada caso.

En animales implantados, la presencia del andamio se evidencia como hipointensidad, ya que los andamios poliméricos no presentan señal de RM. Estos resultados se complementan con la tractografía, aumentando la resolución espacial y demostrando la extensión de la lesión <sup>191</sup>.

Adicionalmente, los espectros aportan información acerca de la constitución molecular en el sitio de la lesión. La disminución de Cr y Cho se asocia con una caída en el metabolismo celular por la pérdida de masa celular. A pesar de que NAA puede aparecer con una intensidad similar que el animal intacto, esto representa moléculas de NAA residuales atrapadas entre los restos de tejido nervioso muerto <sup>194</sup>.

Para la cuarta semana de estudio, los animales implantados muestran intensidad T1 y T2 en la zona del implante, que se asocia con tejido sobre éste, mientras que los animales control muestran evidencia de daño secundario por hipointensidad T1 colocalizada con hiperintensidad T2, que en ciertos casos se extendió a la zona caudal del epicentro de la lesión.

En los animales implantados con PLA se detecta una respuesta inflamatoria en la periferia de los andamios dada por hiperintensidad T2 y, por lo tanto, una discontinuidad de los tractos adyacentes, como se muestra en la Figura 45. Sin embargo, el implante se encontró con intensidad T1 y T2 asociados a tejido, lo cual sugiere posible infiltración de fibroblastos y células inflamatorias al andamio, con formación de tejido fibrótico.

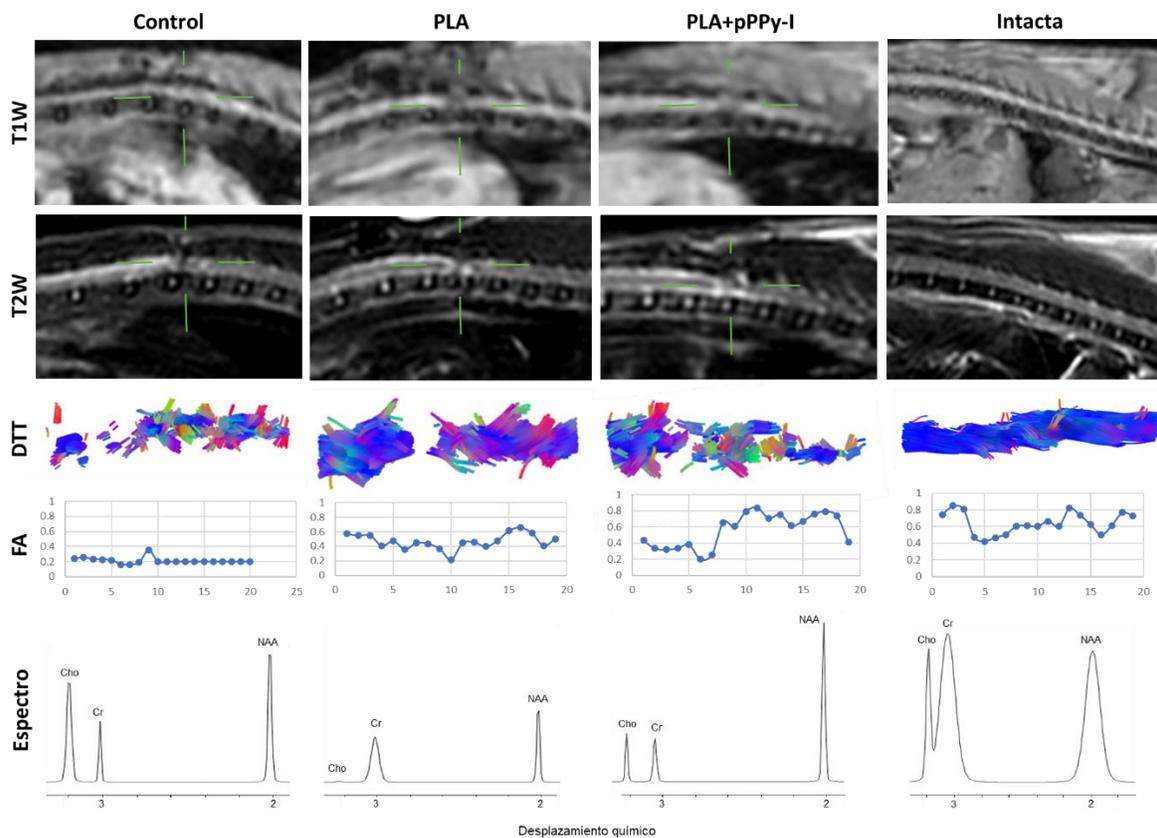


Figura 45. Imágenes representativas de RM a la semana 4. El control muestra intensidades T1 y T2 patológicas extendidas hacia la zona caudal, como efecto del daño secundario, confirmado por la pérdida de tractos en dicha región. En PLA se muestra inflamación por la hiperintensidad T2 en la periferia del andamio, por lo que persiste la discontinuidad de los tractos. En contraste, los animales implantados con PLA+pPPy-I presentan intensidad T1 y T2 asociada con tejido nervioso y evidencia de tractos a través de la lesión e implante. Los

valores de FA se presentan por rebanadas transversales de 1.5mm de grosor (0 lado caudal, 20 lado rostral). Por último, se presenta el espectro de RM adquirido en la zona de la lesión en cada caso.

De acuerdo con la espectroscopía, el control no muestra cambios respecto a la semana 1, sin embargo, PLA muestra una baja intensidad de Cho, lo cual sugiere baja densidad celular. El aumento de NAA puede ser provocado por mecanismos de compensación en la actividad mitocondrial de neuronas que posteriormente se degeneran <sup>202</sup>.

Para la semana 8 no se detectan cambios importantes respecto a la semana 4 en las imágenes convencionales T1 y T2 de los grupos control y PLA+pPPy-I, mientras que en PLA se observó una reconexión de tractos en el grupo PLA (Figura 46).

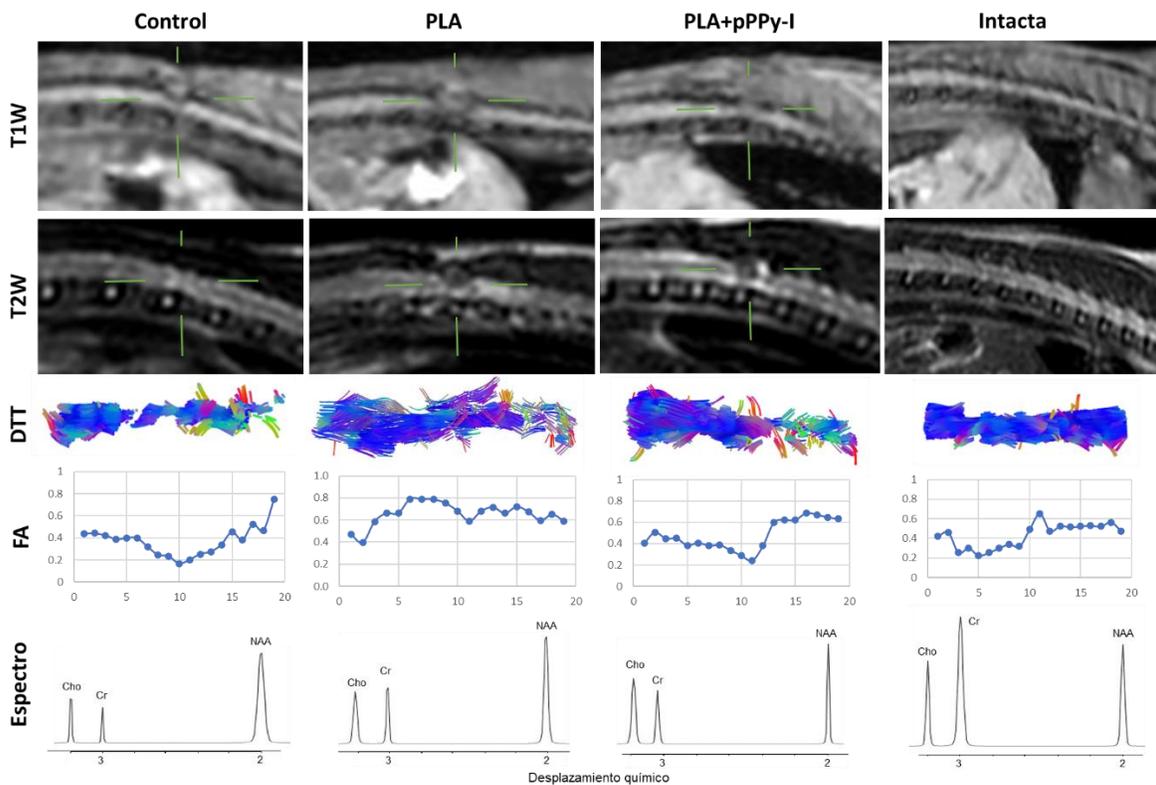


Figura 46. Imágenes representativas de RM a la semana 8. Las imágenes de RM convencionales siguen mostrando la misma información respecto a la semana 4. Los cambios importantes se detectaron mediante la tractografía, donde una reconexión de los tractos en PLA sugiere cambios en la microestructura del tejido en el epicentro e implante. Los valores de FA se presentan por rebanadas transversales de 1.5mm de grosor (0 lado caudal, 20 lado rostral). Por último, se presenta el espectro de RM adquirido en la zona de la lesión en cada caso.

Para este punto, los niveles de los metabolitos evaluados por MRS parece que se normalizan, posiblemente debido a la estabilización de la cicatriz glial que busca contener la propagación de la lesión. Si bien en este caso no se evidencian diferencias entre los animales, se realizó un análisis

estadístico de la intensidad de los metabolitos tomando en cuenta varios sujetos por cada grupo para buscar las diferencias, el cual se presenta más adelante (sección 5.3. Espectroscopía).

Aprovechando los datos cuantitativos de la tractografía, se estudió el impacto del volumen de los tractos reconstruidos en el tiempo entre los grupos de estudio (Figura 47). La reducción significativa del volumen de los tractos en el grupo PLA+pPPy-I a la semana 1 se relaciona con la falta de señal propia del implante y con la contundencia de la LMESC. A la semana 4 el volumen de los tractos se recuperó en PLA+pPPy-I, mientras que la reducción significativa en PLA y control reflejan los efectos del daño secundario. A la semana 8 el volumen de los tractos de los animales control se redujo significativamente respecto a los animales intactos y los implantados. En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre los animales implantados y los intactos, lo cual sugiere que los implantes constituyeron un sustrato permisivo para la adhesión celular y desarrollo tisular.

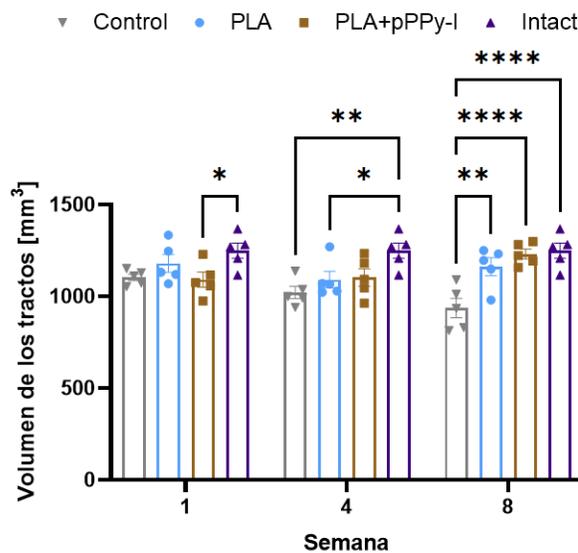


Figura 47. Volumen de los tractos en animales intactos y de los control, PLA y PLA+pPPy-I a la semana 1, 4 y 8. Diferencias estadísticamente significativas por ANOVA de dos vías, n=5, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

La recuperación del volumen de los tractos en PLA+pPPy-I para la semana 4 muestra un efecto superior del compuesto sobre el implante de PLA, el cual mostró una reducción significativa en la semana 4, sugiriendo que las fibras recubiertas con pPPy-I producen un efecto más eficiente en la recuperación tisular.

### 5.2.1. Índices DTI

DTI ofrece medidas cuantitativas que permiten establecer comparaciones objetivas entre grupos de estudio y asociaciones con la microestructura del tejido nervioso basado en tensores (Figura 48).

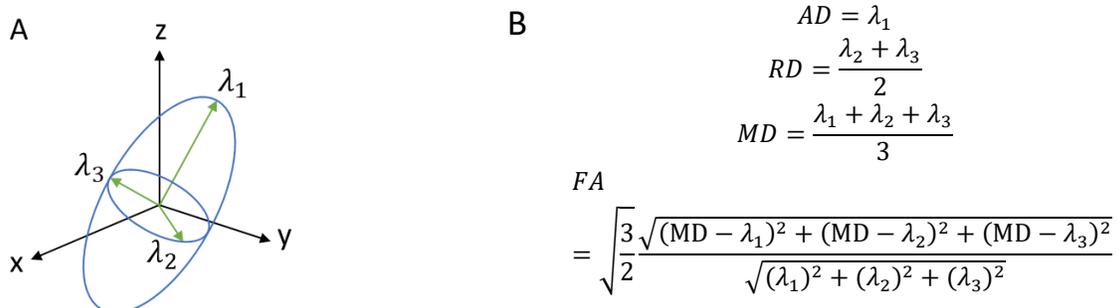


Figura 48. Representación de la difusión del agua en los tejidos por tensores. A) Representación del tensor de difusión y los vectores asociados con la FDP de la difusión del agua. B) Índices asociados a la magnitud de FDP: AD, RD, MD y FA <sup>206,207</sup>.

Se obtuvieron los índices del DTI en las rebanadas de 1.5mm de la ME adquiridas, los cuales son una medida cuantitativa de la microestructura tisular. En las siguientes gráficas se comparan los índices FA, MD, AD y RD en los grupos experimentales a la semana 1, 4 y 8 comparándolos con el grupo intacto. Adicionalmente, para evidenciar los cambios en el tiempo, se realizó un análisis estadístico de los índices a la semana 1, 4 y 8 en cada grupo de estudio. De esta manera se realizan dos análisis estadísticos para responder a dos cuestiones:

1. El comportamiento de los índices entre los 4 grupos de tratamiento, comparándolos en cada una de las 3 etapas del estudio: 1ª, 4ª y 8ª semana;
2. La evolución en el tiempo en los sujetos del mismo grupo de tratamiento, para determinar si existen cambios estructurales que podrían explicar la diferencia en la recuperación funcional más eficiente del grupo PLA+pPPy-I comparada con el Control o PLA.

#### 5.2.1.1. Análisis entre los grupos de tratamiento

La mayor alteración se detectó en el epicentro de la lesión a la semana 1 después de la lesión, con una disminución en FA y un incremento en RD estadísticamente significativas de los tres grupos de estudio respecto a los intactos, como efecto de la destrucción tisular asociada al modelo de lesión (Figura 49).

MD no presenta diferencias significativas, aunque sí se produce un aumento significativo de RD en el EC en el grupo control, asociado a hemorragia y fuga de LCR. Los tractos rostrales sufren una alteración significativa, sin embargo, dado que esta sección se encuentra lejos de la zona lesionada, esta alteración se asocia con artefactos debidos a la reducción del volumen de la ME hacia la zona rostral.

Para la semana 4, FA se mantiene significativamente menor respecto al intacto en el grupo PLA, mientras que los grupos control y PLA+pPPy-I ya no presentan diferencias significativas respecto al intacto (Figura 50).

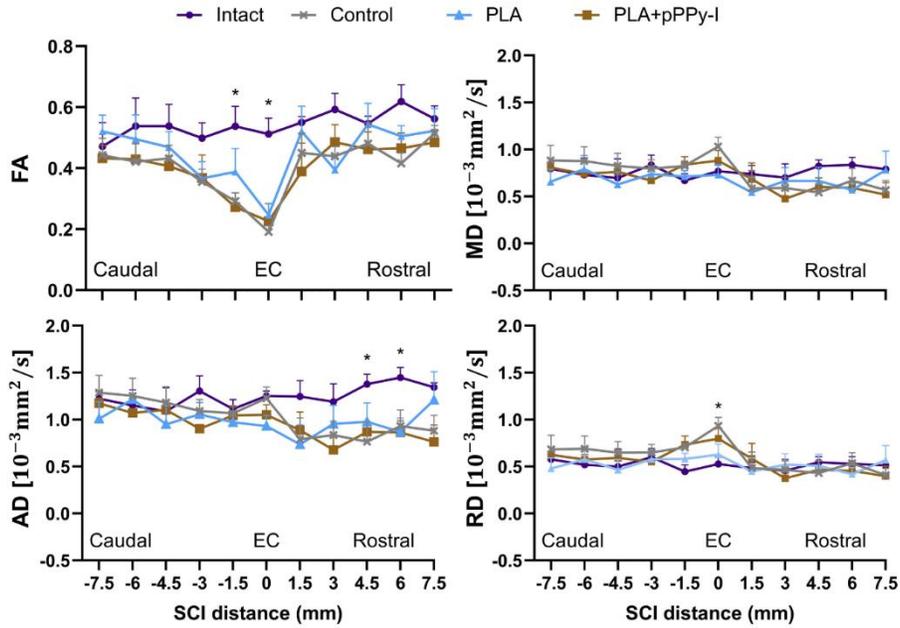


Figura 49. Índices DTI en la semana 1. Diferencias significativas por ANOVA de dos vías: distancia a la lesión y grupo, con prueba post hoc de Tukey (n=5 sujetos por grupo). FA: p=0.049 PLA+pPPy-I vs. Intacto 1.5mm caudal al EC; p=0.0076 Control vs. Intacto, p=0.025 PLA+pPPy-I vs. Intacto, p=0.0167 Intact vs. PLA en el EC. MD: ligero aumento en el EC en el grupo control. AD: p=0.042 4.5mm rostral al EC y p=0.032 al extremo rostral en PLA+pPPy-I vs. Intacto. RD: p=0.038 en el EC en Control vs. Intacto.

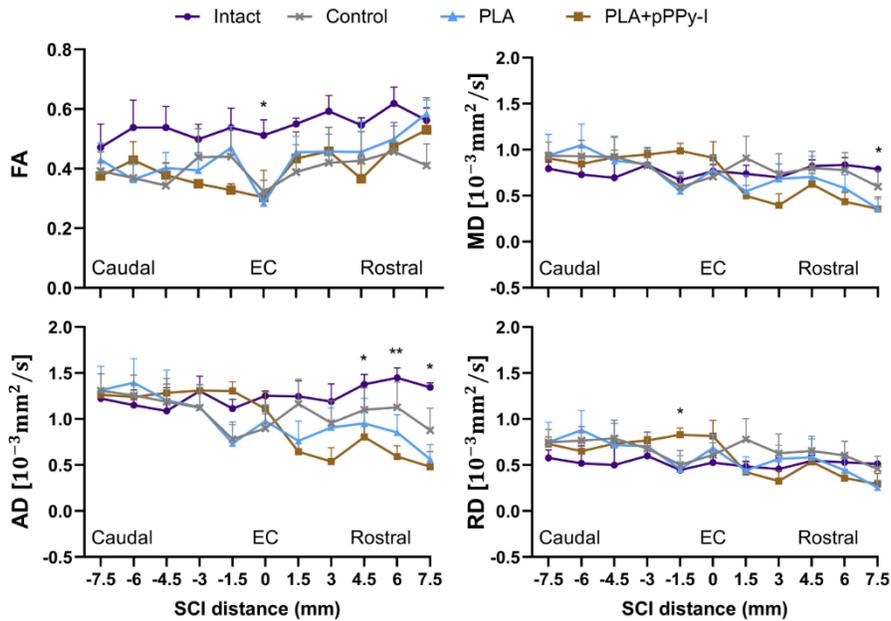


Figura 50. Índices DTI en la semana 4. Diferencias significativas por ANOVA de dos vías: distancia a la lesión y grupo, con prueba post hoc de Tukey (n=5 sujetos por grupo). FA: p=0.034 Intacto vs. PLA en el EC. MD: p=0.045 Intacto vs. PLA en extremo rostral. AD: p= 0.026 y p=0.003 4.5 y 6 mm rostral al EC en PLA+pPPy-I vs.

Intacto;  $p=0.017$  en PLA+pPPy-I vs. Intacto y  $p=0.023$  PLA vs. Intacto al extremo rostral. RD:  $p=0.024$  1.5mm caudal al EC en PLA+pPPy-I vs. Intacto.

Para la semana 8, los valores de FA se recuperan y se presentan en magnitud similar a los intactos. MD tuvo una disminución significativa en el grupo PLA en el extremo rostral del EC, asociado con una caída en AD, lo cual sugiere daño axonal en esta región (Figura 51).

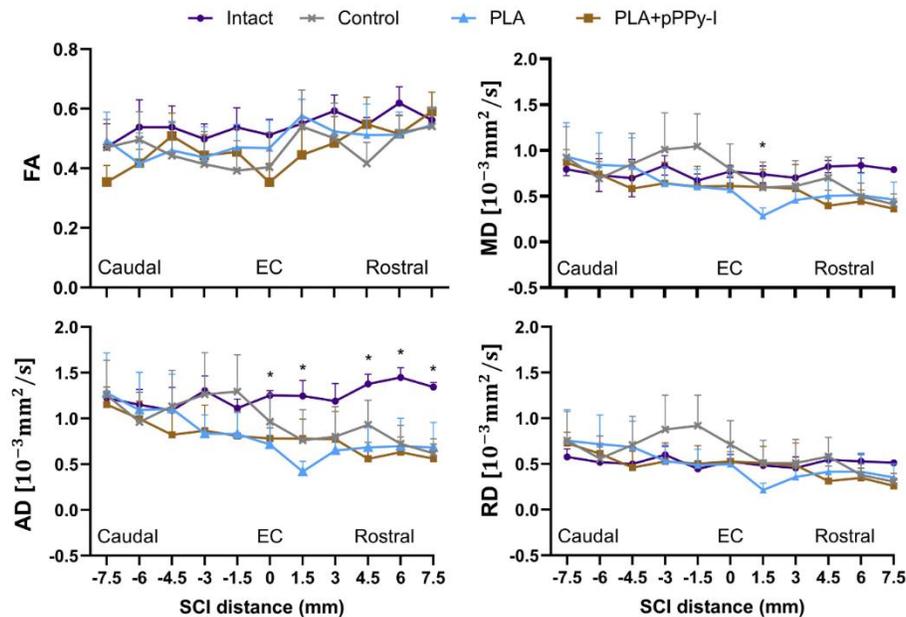


Figura 51. Índices DTI en la semana 8. Diferencias significativas por ANOVA de dos vías: distancia a la lesión y grupo, con prueba post hoc de Tukey ( $n=5$ ). FA: sin diferencias significativas entre grupos. MD:  $p=0.029$  1.5mm rostral al EC en Intacto vs. PLA. AD:  $p=0.045$  en EC en Intacto vs. PLA+pPPy-I,  $p=0.019$  1.5mm rostral al EC en intacto vs. PLA,  $p=0.027$  4.5mm y  $p=0.019$  6mm rostral en intacto vs. PLA+pPPy-I;  $p=0.029$  en Intacto vs. control y  $p=0.022$  en Intacto vs. PLA+pPPy al extremo rostral. RD: ligero aumento en la zona caudal al EC.

Para la semana 8, los valores de FA y RD se normalizaron en los grupos de estudio, ya que no se observaron diferencias significativas respecto a los intactos, únicamente una tendencia al aumento de RD en la zona caudal de los animales control, que se asocia a daño secundario extendido de forma caudal. Aun así, se detectan diferencias en AD de los animales de estudio respecto a los intactos, desde el epicentro hacia la zona rostral.

Además de las limitaciones respecto al tamaño del tejido, es importante destacar que las interpretaciones que se realicen con los índices del DTI se deben acompañar con otras técnicas de análisis, ya que como todo modelo presenta ciertas limitaciones inherentes a las restricciones establecidas. Una de las más importantes es el problema de las fibras cruzadas, que pueden arrojar incrementos o decrementos en los índices del DTI paradójicos. Este efecto puede presentarse en procesos tales como neurodesarrollo, plasticidad o reparación del tejido nervioso<sup>208</sup>.

### 5.2.1.2. Análisis de los cambios en el tiempo

Ni en el grupo Control sin implante ni en el grupo implantado con PLA se encontraron diferencias significativas en los índices FA, MD, AD o RD respecto al tiempo. Tal como se encontró en el análisis funcional, en estos grupos hubo una recuperación paulatina de la microestructura tisular. Sin embargo, en el grupo implantado con el composito (PLA+pPPy-I), MD muestra un incremento significativo hacia la zona caudal entre la semana 1 y 4 ( $p=0.049$  3mm caudal al EC), debido a un incremento en AD ( $p=0.005$ ). Este incremento podría asociarse con la organización caudal de las fibras axonales adyacentes al implante e integridad axonal. Esta recuperación estructural podría explicar la recuperación más eficiente en los animales implantados con el composito PLA+pPPy-I que la recuperación debida a procesos endógenos.

Aunque hacer un análisis estadístico entre los grupos de estudio puede dar un panorama general de la alteración de los índices microestructurales, es evidente que se pierde la singularidad de la lesión en cada animal. Tal como se mostró en la sección anterior, la información aportada por cada una de las técnicas permite realizar una historia de cada caso, mientras que realizar un promedio de las variables aisladas enmascara ciertos aspectos del desarrollo de la lesión, la cual resultó desarrollarse de manera heterogénea. Por lo tanto, el análisis individual de cada animal mediante las imágenes y valores cuantitativos ofrece mayor claridad del desarrollo de la lesión e interacción con el implante que el análisis por variables independientes.

### 5.3. Espectroscopía

En esta sección se presentan los resultados de la espectroscopía por resonancia magnética. La intensidad de la señal se correlaciona con las condiciones normales y fisiopatológicas<sup>197,200-202</sup>. Tratándose de espectros adquiridos en el SNC, se esperaría que NAA sea el pico prominente, seguido del pico Cr y de menor intensidad el pico de Cho<sup>200,209</sup>, sin embargo, las condiciones de adquisición son diferentes a lo reportado en la literatura. En este caso se utilizó un TE=144ms, mientras que normalmente se utilizan TE cortos<sup>210-212</sup>. Esto puede tener efectos sobre la cuantificación de Cr y Cho<sup>203</sup>. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de los metabolitos NAA, Cr y Cho, en la médula intacta se encontró ligeramente mayor la intensidad de Cr, seguida de NAA y Cho (Figura 52, B).

La intensidad absoluta de los metabolitos se obtuvo de los espectros de RM procesados, tales como los que se muestran en la Figura 52, A, y se realizó un análisis estadístico de la intensidad de NAA, Cr y Cho en los diferentes grupos y en los tres tiempos de estudio (semana 1, 4 y 8). La intensidad de las señales se alteró, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

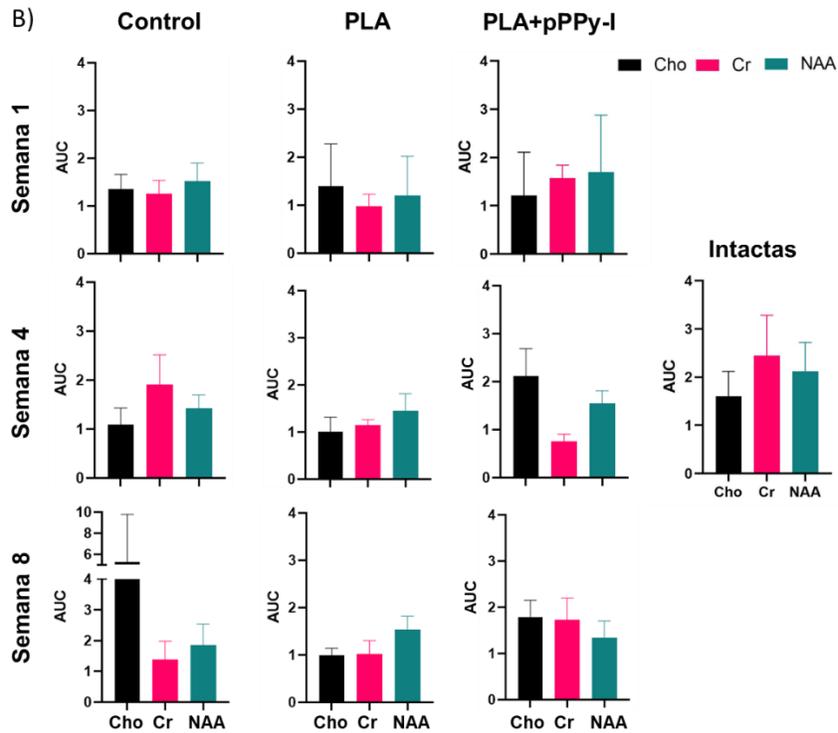
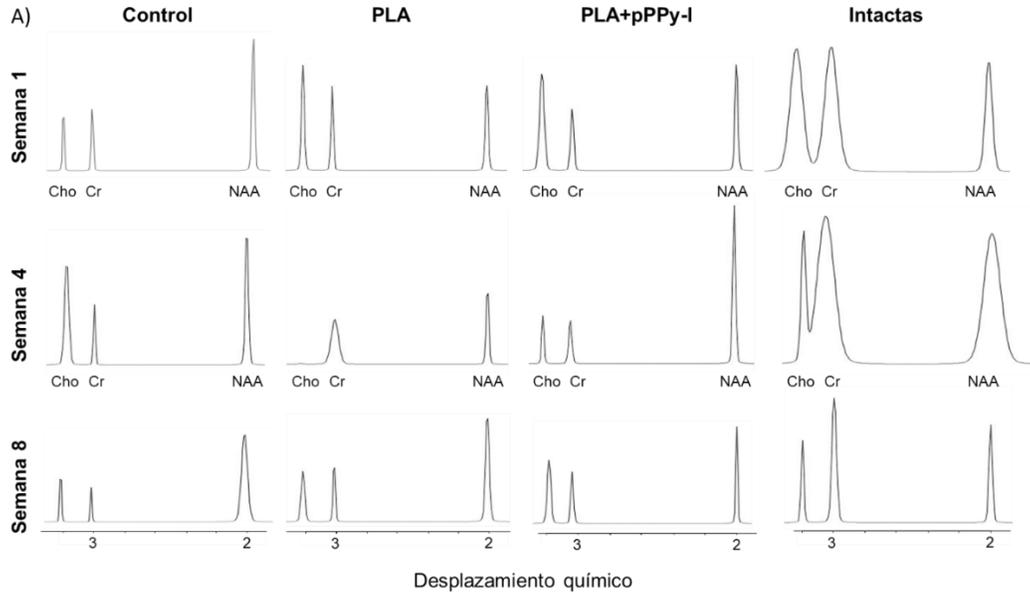


Figura 52. Espectroscopía del sitio de la lesión e implante. A) Espectros representativos: NAA se encuentra en 2.01ppm, Cr en 3.0ppm y Cho en 3.2ppm <sup>197,198</sup>. B) Análisis estadístico de la intensidad de la señal de cada metabolito (área bajo la curva [AUC] relativa a la concentración), sin diferencias significativas, en control: n=4 (semanas 1 y 4), n=3 (semana 8); en PLA: n=5; en PLA+pPPy-I: n=5, n=4 y n=7 (en semanas 1, 4 y 8 respectivamente); en intactas n=12. Nótese que Cho aumenta de forma importante en los controles para la semana 8, debido a inflamación y desmielinización <sup>194,202</sup>.

En la semana 1, el Cr disminuye ligeramente respecto a NAA, mientras que Cho comienza a aumentar, debido a la inflamación y destrucción celular en los grupos control y PLA. Para semana 4, la intensidad de los metabolitos en el grupo control muestra una disposición similar al grupo intacto, posiblemente debido a un aumento en el metabolismo celular en el sitio de la lesión, con la secreción de colágena. Por otro lado, PLA+pPPy-I muestra respecto a NAA una reducción en Cr y aumento de Cho, posiblemente debido al proceso inflamatorio asociado a la lesión. Por su parte, PLA muestra una intensidad acorde con lo reportado en la literatura, sugiriendo que para la semana 4 el proceso inflamatorio empieza a disminuir y recuperar valores normales.

En la semana 8, el grupo control muestra un aumento en Cho que puede estar asociado al daño secundario en etapa crónica, que incluye desmielinización junto con inflamación continua. Los grupos implantados muestran un comportamiento estable de la intensidad, aunque NAA se encuentra ligeramente disminuido respecto a Cr y Cho, probablemente debido al daño neuronal provocado por la LMESC.

Para buscar los efectos del modelo de lesión e implante, se realizó un análisis estadístico de la intensidad de los metabolitos en el tiempo entre los grupos de estudio. En la Figura 53 se muestra la evolución de la Cr en los grupos experimentales. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, hubo una reducción en la intensidad de Cr, en especial en el grupo de PLA+pPPy-I para semana 4, que se recupera para la semana 8.

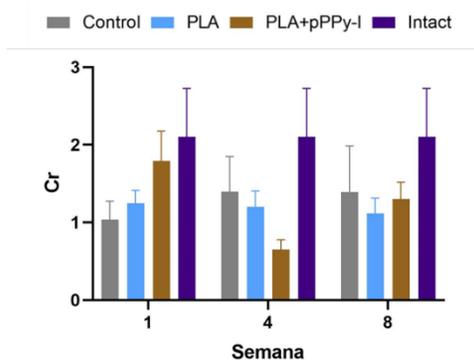


Figura 53. Evolución de la creatina en ratas con LMESC y andamios fibrilares. Sin diferencias significativas entre los grupos, prueba ANOVA de dos vías (n=3).

Los niveles de NAA se encontraron aun altos en la semana 1 después de la cirugía (Figura 54). De acuerdo con la literatura, las moléculas de NAA pueden quedar atrapadas entre los restos de tejido nervioso en la fase aguda, y se van reduciendo en la fase subaguda<sup>194</sup>. Sin embargo, los valores de NAA tienden a normalizarse en la semana 8<sup>194,202</sup>.

Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, se observa una tendencia a la disminución de NAA/Cho en general (Figura 54). Cho es un marcador de la síntesis y descomposición de membranas celulares<sup>194</sup>. La relación NAA/Cho se ha propuesto como un predictor del desarrollo motor, además, se ha encontrado una correlación de NAA/Cho con FA<sup>213</sup>. Dado que NAA indica tejido nervioso sano y Cho se relaciona con el metabolismo de la membrana celular, el índice NAA/Cho podría indicar la proporción de neuronas funcionales respecto a gliosis o inflamación, ya

que el inverso, Cho/NAA, se ha estudiado como un parámetro que define la extensión de gliomas sobre tejido nervioso sano <sup>201,214</sup>.

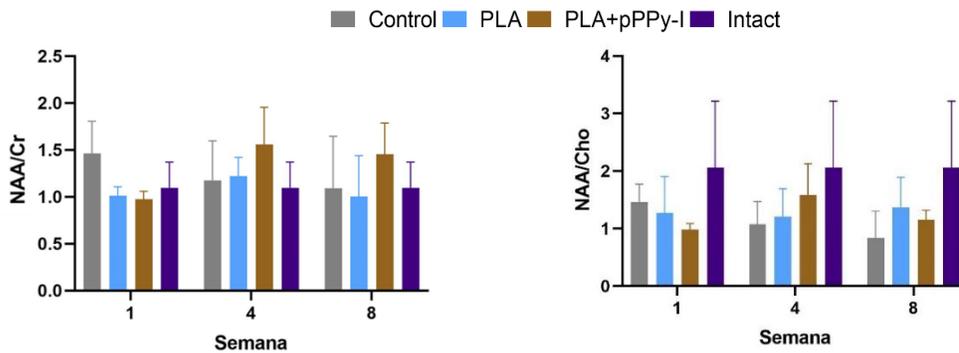


Figura 54. Evolución de NAA/Cr y NAA/Cho. NAA/Cr muestra una reducción no significativa en los animales implantados, mientras que NAA/Cr aumenta debido a una reducción en Cr, aunque no es significativa. NAA/Cho se reduce en general, aunque sin diferencias significativas. Análisis estadísticos por ANOVA de dos vías (n=3).

En la octava semana, el daño secundario se acentúa en el control produciendo un aumento en Cho/Cr, aunque no es significativa estadísticamente (Figura 55), el cual se asocia con gliosis y desmielinización <sup>194,202</sup>.

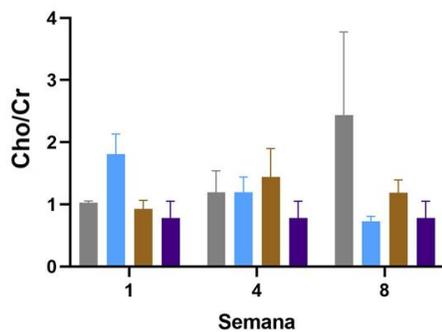


Figura 55. Evolución de Cho. Sin diferencias significativas entre los grupos, prueba ANOVA de dos vías (n=3).

La técnica de MRS presenta varias limitaciones, en especial en la ME de pequeños animales como las ratas. Esto se debe a inhomogeneidades del campo magnético en volumen de interés que es muy pequeño, así como la presencia de las vértebras y el movimiento asociado a la respiración <sup>194,202</sup>. Por ello, la MRS se debe complementar con otras técnicas de análisis de manera que se puedan validar los resultados.

## Capítulo 6. Histología e inmunofluorescencia

El análisis histopatológico de la morfología tisular es una de las principales maneras de entender las enfermedades, ya que permite hacer un análisis de la morfología de los tejidos y su funcionamiento <sup>215,216</sup>.

La tinción HE es la tinción básica para hacer una evaluación inicial de la estructura tisular. La hematoxilina tiñe de violeta los ácidos nucleicos y la eosina tiñe de rosa las proteínas de forma inespecífica. HE no provee información suficiente para establecer diferencias entre las principales células del sistema nervioso como neuronas o células gliales, por lo que se vuelve necesario realizar tinciones especiales que permitan evaluar las estructuras citoplasmáticas <sup>215,216</sup>.

El violeta de cresilo es una tinción que se une a los ácidos nucleicos, preferentemente ARN, por lo que tiñe tanto neuronas como glía <sup>217</sup>. Además, el violeta de cresilo permite identificar a las neuronas, ya que evidencia los cuerpos de Nissl (Figura 56).

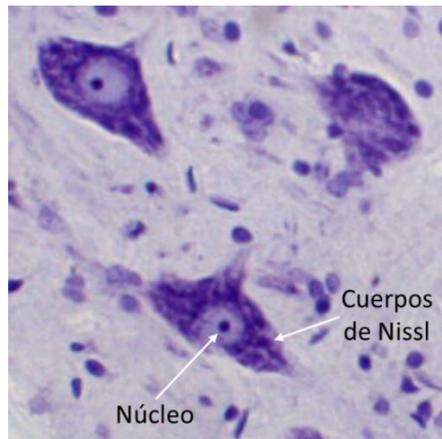


Figura 56. Neuronas marcadas con violeta de cresilo.

Los cuerpos de Nissl son cúmulos de retículo endoplasmático rugoso que se encuentran en el pericarion y en la primera porción de las dendritas en las neuronas. El axón no contiene cuerpos de Nissl <sup>215</sup>.

La técnica de Schiff es una reacción que utiliza PAS y se utiliza para la tinción de estructuras que contengan macromoléculas de carbohidratos como las glucoproteínas, proteoglicanos y membranas celulares, que son típicas de tejido conjuntivo y lámina basal, entre otros. PAS tiñe de magenta a rojo estas estructuras <sup>216</sup> (Figura 57).

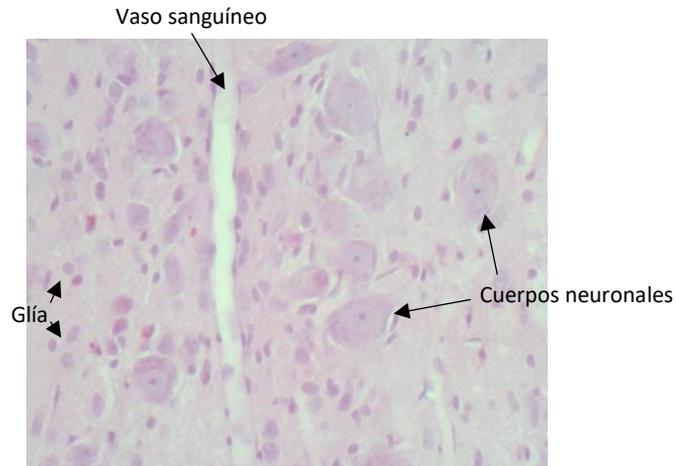


Figura 57. Médula espinal sin lesión con tinción de PAS. Se destaca la presencia del lumen longitudinal de un vaso sanguíneo, cuerpos neuronales y células gliales con la membrana celular en un tono magenta, positivo para PAS.

La tinción por tricrómica de Masson tiñe de azul las fibras de colágeno tipo I, el citoplasma de rojo y el núcleo de lila o marrón <sup>215</sup> (Figura 58).

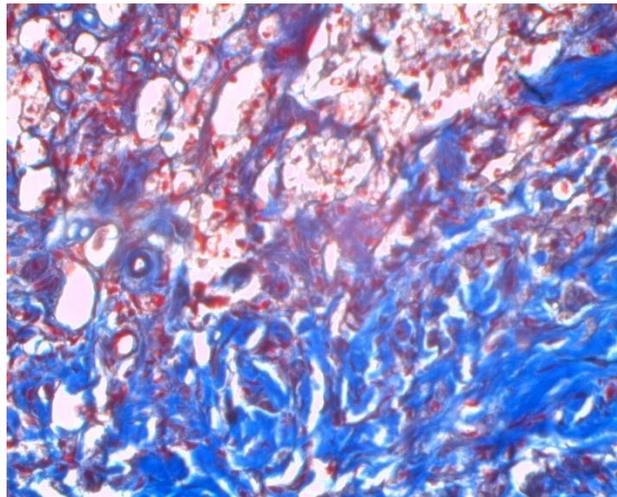


Figura 58. Epicentro de la lesión de un animal control teñido con tricrómica de Masson. En azul se marcan las fibras de colágeno tipo I.

La inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia son técnicas que permiten la detección de antígenos tales como proteínas en las células y los tejidos por medio de la unión específica entre un anticuerpo con determinado antígeno. En particular, la inmunofluorescencia implica el uso de anticuerpos acoplados a fluoróforos, de manera que el anticuerpo se une a su antígeno y el fluoróforo es detectado por microscopía de fluorescencia, indicando la presencia del antígeno.

MAP2 se expresa únicamente en las neuronas maduras y especialmente en las dendritas de estas células <sup>58,218</sup>. Los anticuerpos a MAP2 son, por lo tanto, excelentes marcadores de las células neuronales, el soma y las dendritas neuronales <sup>44,219,220</sup> (Figura 59).

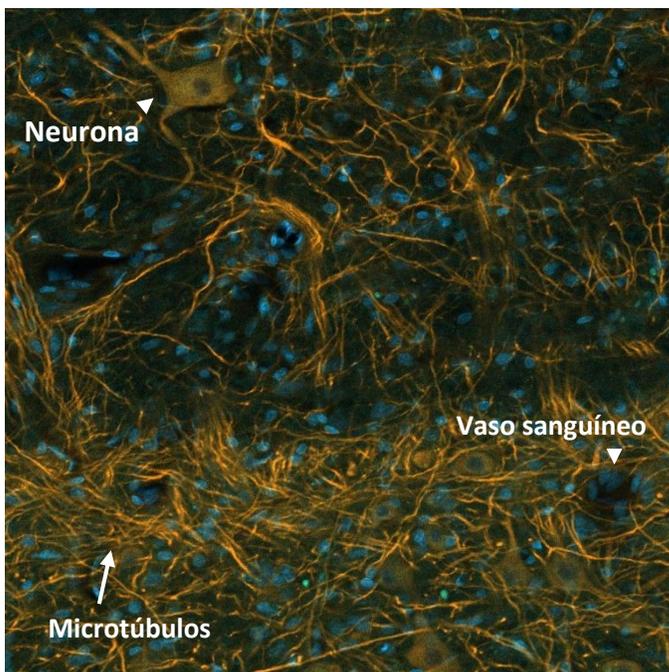


Figura 59. Médula espinal marcada por inmunofluorescencia. La marca de MAP2 (color naranja) se encuentra específicamente en el citoplasma de las neuronas. En azul se marcan los núcleos celulares (DAPI), que pertenecen a las neuronas, células gliales y epiteliales que forman vasos sanguíneos.

DAPI es un marcador que se une específicamente al ADN, y por lo tanto es utilizado en inmunofluorescencia para marcar los núcleos de las células en color azul <sup>221,222</sup>.

### 6.1. Metodología

Después de 8 semanas de estudio, las ratas fueron anestesiadas con 100mg/kg de pentobarbital. Utilizando una bomba peristáltica a 18ml/min, se perfundieron vía transcardiaca 250 ml de NaCl 0.9% fría y 250ml de PFA 4% frío (las soluciones se ponen sobre hielo durante todo el proceso, este paso es clave para obtener inmunofluorescencias adecuadas). Se extrajo la ME y una sección de 1cm rostral y 1 cm caudal al epicentro de la lesión fue sumergida en PFA 4% por 24h a 4°C y transferidas a sacarosa al 30% en PB a 4°C <sup>219</sup>.

Para la inmunofluorescencia, las muestras de ME se seccionaron longitudinalmente en rebanadas de 40 µm utilizando un criostato. Las secciones se bloquearon con BSA 5% en TBS con Tritón X-100 0.5% (v/v) y se incubaron con anti-MAP2 (1:200; Invitrogen, PA5-17646) por 24 h. A continuación, las secciones se lavaron tres veces con TBS y se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 (anti-rabbit, 1:300, ThermoFisher Scientific, A11035) en TBS a temperatura ambiente en oscuridad. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal (Zeiss LSM 800) <sup>219</sup>. Se obtuvieron una media de 32 rebanadas ópticas cada 1 µm por cada Z-stack.

El análisis de las imágenes y cuantificación del tejido se realizó en Fiji - ImageJ (NIH) y CellProfiler 4.2.5 (Broad Institute, Inc.).

#### 6.1.1. Cuantificación del tejido degenerado y quistes en las muestras completas

En las muestras completas a un acercamiento de 1.25x tinción HE, se midió el total de la muestra y después se aplicó un filtro para definir las zonas de tejido dañado y los quistes (espacios blancos), las cuales son cuantificadas con Particle Analyzer (Figura 60).



Figura 60. Procedimiento para la cuantificación de quistes y tejido degenerado. Se delimita el total de muestra a analizar, y se aplica un umbral para segmentar los espacios de quiste. Con el analizador de partículas se cuantifica el porcentaje de la muestra equivalente a los quistes en las muestras con un aumento de 1.25x.

#### 6.1.2. Cuantificación de la marca de colágeno

En las muestras con tricrómica de Masson, se utilizó la función *Color Threshold* (Fiji) para segmentar la marca azul que representa el colágeno. La imagen se convierte a binaria (*Process – Binary – Convert to Mask*) dejando la marca de interés en blanco y *Measure* para para medir la proporción de la imagen que representa el colágeno (Figura 61).

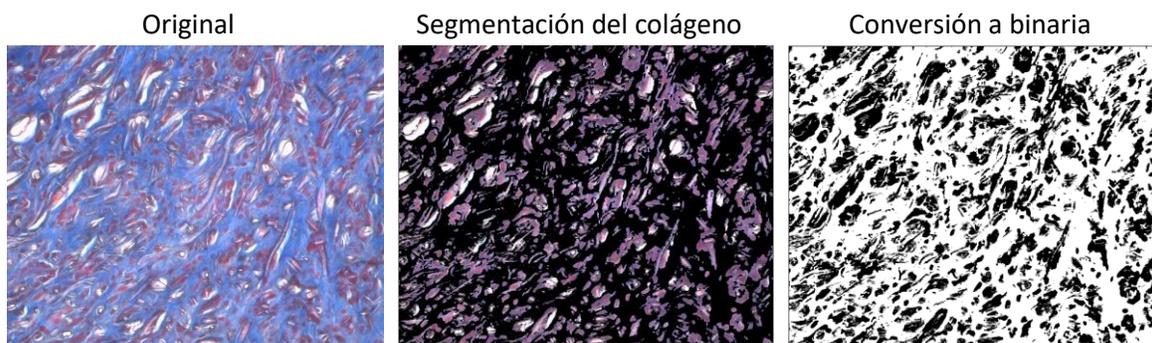


Figura 61. Procedimiento para la identificación y cuantificación de la marca de colágeno tipo I.

Este procedimiento se realiza imagen por imagen, lo cual puede ser muy lento.

#### 6.1.3. Cuantificación de marca PAS y violeta de cresilo

El análisis de las imágenes se realizó en el software libre CellProfiler (4.2.5) mediante la siguiente secuencia:

▪ <i>Images</i>	Selección de imágenes a procesar.
▪ <i>Names and Types</i>	Asignación de nombres de variable.
▪ <i>UnmixColors</i>	Segmentación de los píxeles con marca.
▪ <i>Threshold</i>	Conversión a imagen binaria, blanco equivale a la marca ( <i>foreground</i> ).
▪ <i>MeasureImageAreaOccupied</i>	Medición del área ocupada por píxeles blancos.
▪ <i>ExportToSpreadsheet</i>	Los resultados se exportan en una hoja de datos csv.
▪ <i>SaveImages</i>	Guarda las imágenes procesadas en una carpeta destino definida.

De esta forma, se puede realizar la cuantificación en varias imágenes en pocos minutos y automáticamente, sin necesidad de realizar el protocolo de análisis imagen por imagen. La información cuantitativa queda almacenada en una tabla de datos csv, para su posterior análisis estadístico.

Como ejemplo en la Figura 62, A se muestra la imagen original de ME marcada con violeta de cresilo. Al aplicar *UnmixColors* se obtienen imágenes en escala de grises, con la marca especificada en blanco (*foreground*), en este caso, la marca de violeta de cresilo (Figura 62, B). Al aplicar el umbral (*Threshold*), se obtienen imágenes binarias, con la marca de interés en blanco (Figura 62, C).

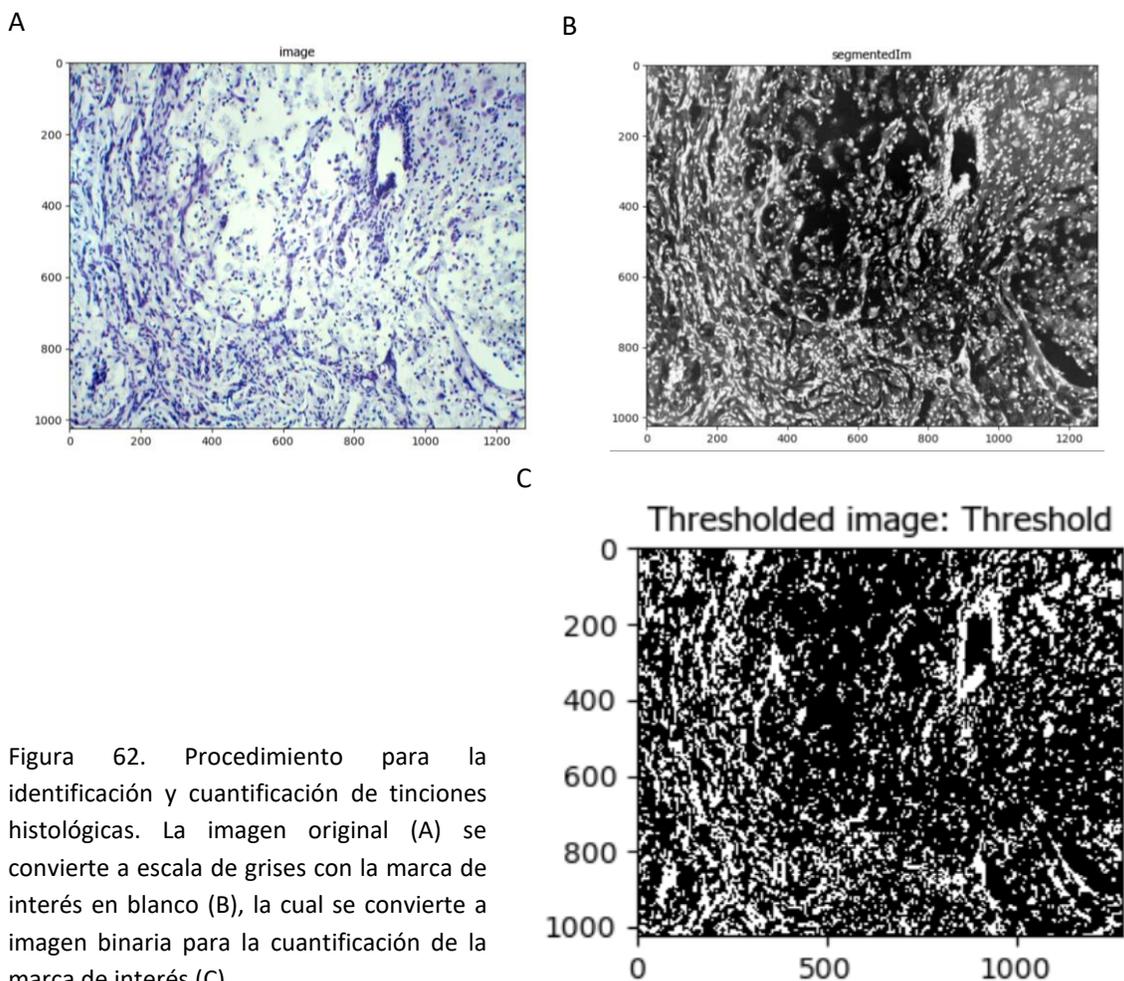


Figura 62. Procedimiento para la identificación y cuantificación de tinciones histológicas. La imagen original (A) se convierte a escala de grises con la marca de interés en blanco (B), la cual se convierte a imagen binaria para la cuantificación de la marca de interés (C).

## 6.2. Estudio del epicentro de la lesión por histología

Los cortes de ME con 8 semanas de estudio se evaluaron por distintas tinciones histológicas para caracterizar el epicentro de la lesión. Las imágenes de animales control muestran que la LMESC produjo grandes quistes y tejido deteriorado en general. Los implantes se encontraron cubiertos por tejido en general, como se observa en las imágenes con HE (Figura 63). Sin embargo, en los tejidos de animales control se observan mayor cantidad de quistes y tejido degenerado, respecto a los animales implantados con los andamios fibrilares.

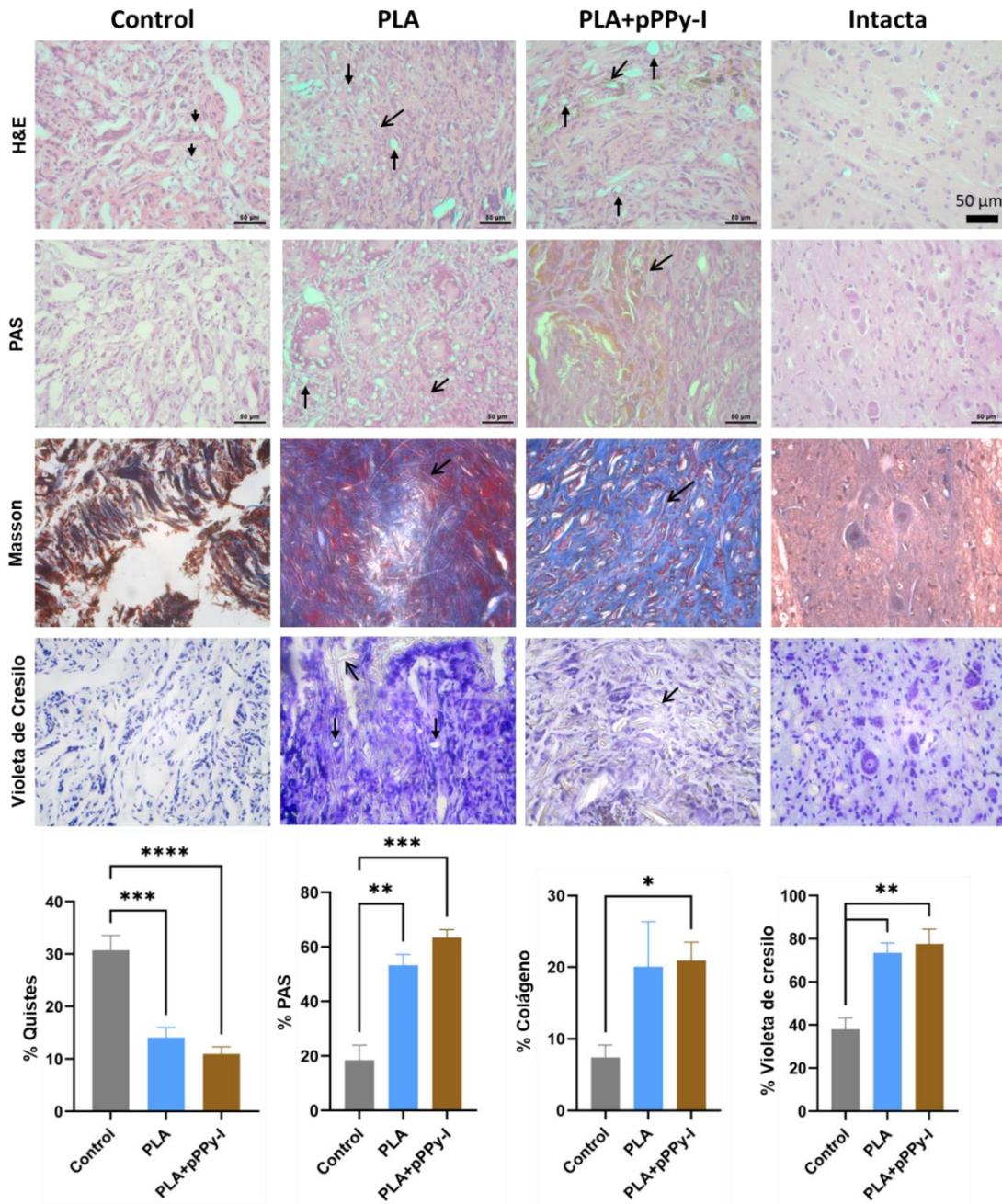


Figura 63. Epicentro de la lesión e implante por varias tinciones histológicas y cuantificación. Las flechas cerradas apuntan a posibles vasos sanguíneos y las flechas abiertas a las fibras de los andamios. El análisis

estadístico muestra diferencias significativas en control respecto a los implantados (\*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001) por ANOVA; \*p<0.05 en el porcentaje de colágeno tipo I entre el control y PLA+pPPy-I por la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn entre grupos. Se encontró significativamente menos marca de violeta de cresilo (\*\*p<0.01) y de PAS (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) en control respecto a los implantados por la prueba ANOVA.

Además, se encontró una cantidad significativamente menor de células en el epicentro, y una menor cantidad de área cubierta por lámina basal en los animales control respecto a los implantados, como se muestra en las imágenes con tinción PAS (Figura 63).

En contraste con los implantes de PLA+pPPy-I, los de PLA muestran grandes áreas sin infiltración celular, sin embargo, en todos los grupos se observan zonas redondeadas con núcleos celulares que posiblemente son células endoteliales rodeando vasos sanguíneos, tanto en el epicentro como dentro de los implantes (Figura 63, flechas cerradas). Para confirmar la presencia de células endoteliales y vasos sanguíneos se puede implementar una marca específica de este tipo de células. La irrigación sanguínea es un rasgo importante de los tejidos viables, ya que indica que los tejidos están siendo oxigenados.

La tinción de tricrómica de Masson revela que en los andamios se encuentra colágeno tipo I (Figura 63), probablemente debido a la infiltración de fibroblastos provenientes de las meninges, como parte del efecto de la LMESC <sup>161</sup>.

De acuerdo con las imágenes de RM, los tejidos de animales implantados muestran el epicentro de la lesión cubierto con mayor cantidad de tejido neuronal y lámina basal que los animales control, como se muestra en las imágenes con tinción de violeta de cresilo y PAS (Figura 63).

En la Figura 64 se muestra la comparación de un animal de cada grupo de estudio por distintas técnicas imagenológicas implementadas en este trabajo: IRM, tractografía del DTI, Fracción de anisotropía e histología. En las distintas imágenes se observa la estructura de la ME, de manera que permiten validar imágenes de RM *in vivo* de las primeras fases del estudio (semanas 1 y 4). Como se ilustra en las secciones histológicas, el segmento caudal de los animales control y PLA se encuentra con una extensa degradación tisular, quistes y edema, lo cual confirma lo que se muestra en las imágenes de RM: menor volumen de los tractos, hiperintensidad T2 e hipointensidad T1 <sup>223</sup>.

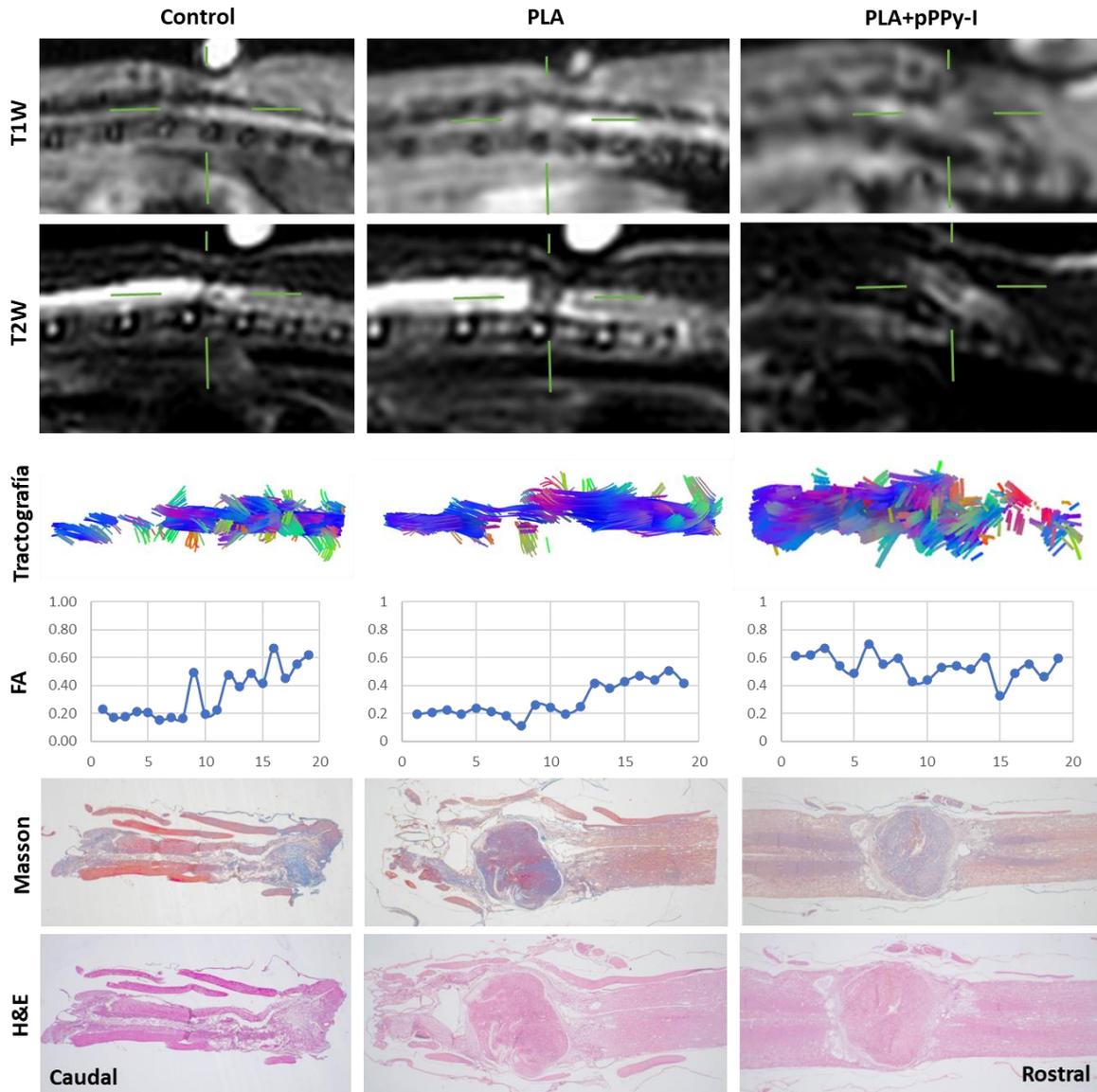


Figura 64. Imágenes representativas de un animal control, PLA y PLA+pPPy-I por distintas técnicas imagenológicas. Comparación de imágenes de RM T1 y T2, tractografía, FA, tricrómica de Masson y HE del mismo animal representativo de cada grupo de estudio. Las líneas verdes apuntan al epicentro de la lesión.

En contraste, las imágenes del animal implantado con PLA+pPPy-I muestran quistes más pequeños en la periferia del andamio, lo cual se relaciona con las intensidades T1 y T2. De esta manera se puede confirmar que en este caso el implante promueve la formación tisular en el epicentro de la lesión y continuidad de tractos entre los segmentos de la ME, lo cual demuestra que el desempeño del composito fibrilar es superior al implante de PLA, promoviendo neuroprotección y reduciendo los efectos del daño secundario.

### 6.3. Inmunofluorescencia

Como se muestra en la porción intacta de la ME, este tejido se encuentra compartimentado, con la materia blanca rodeando la materia gris (Figura 65, a). Dado que la materia blanca está formada por las fibras nerviosas o axones, estos no se marcan con MAP2. Para marcarlos se podría utilizar el anticuerpo para Tau. En la materia gris se encuentran los somas y las sinapsis neuronales, y como MAP2 se encuentra en el pericarion y las dendritas, la materia gris contiene MAP2 en una densidad mucho mayor que en la materia blanca. La marca azul es DAPI, que marca los núcleos de las células. El cúmulo de núcleos al centro de la ME indica el canal central, rodeado por las células ependimarias.

La infiltración celular dentro de los andamios fue evidente gracias a la marca de DAPI. Adyacente al implante también se observa la marca de MAP2 (Figura 66). En PLA, los microtúbulos muestran una disposición aleatoria sobre las fibras del andamio (Figura 66, d). Adyacentes a los andamios, se observan microtúbulos organizados linealmente (Figura 66, b). Esta marca sugiere la presencia de neuritas prolongadas en la periferia y a través del andamio de PLA (flecha de bloque, Figura 66, b).

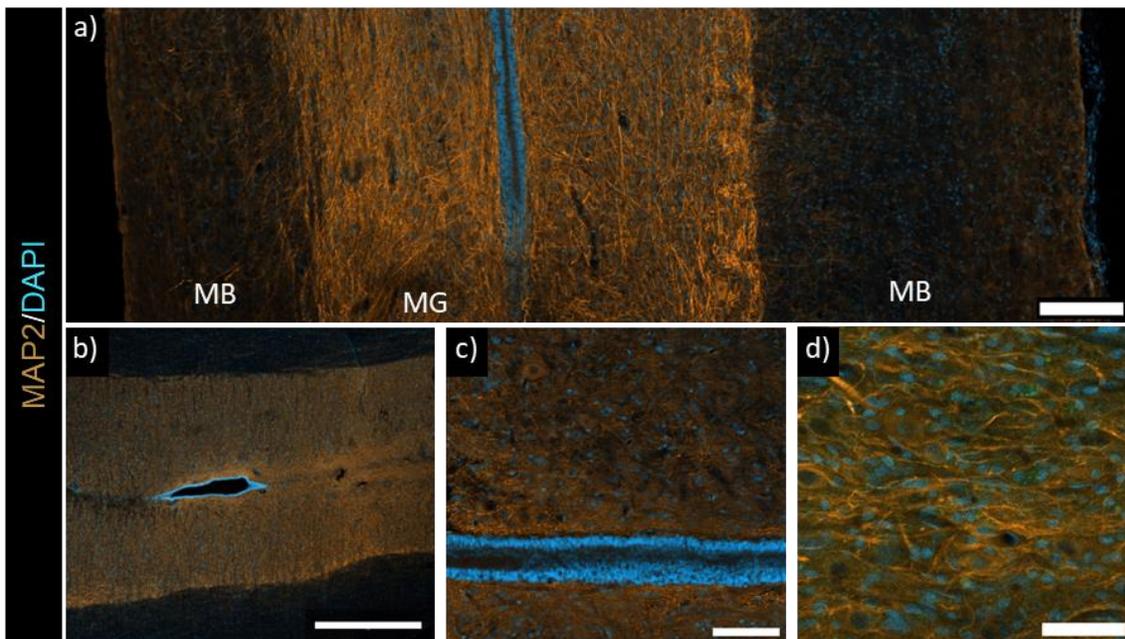


Figura 65 . Inmunofluorescencia de médula intacta. Muestra completa en a) y b), barra = 100µm en (a) y 1mm en (b); acercamientos en c) y d), barra = 100 y 50 µm respectivamente. MB = materia blanca, MG = materia gris.

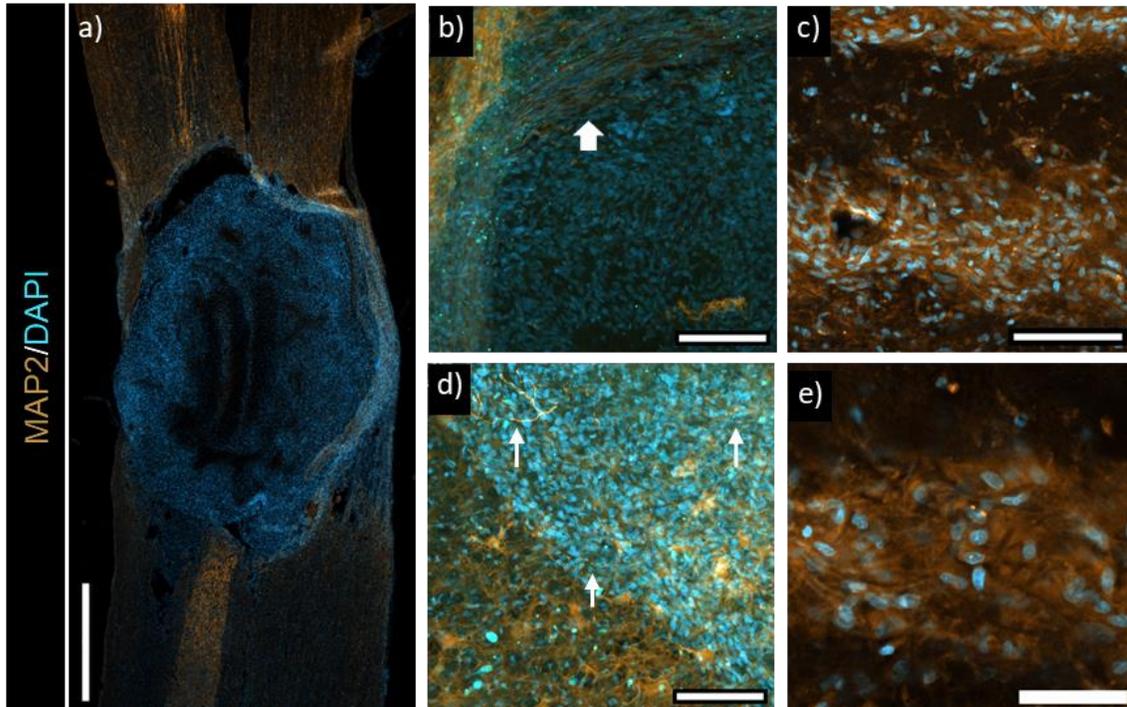


Figura 66. Inmunofluorescencia de médula implantada con PLA. Muestra completa en a), barra = 1mm; acercamientos en b), c) y d), barra = 100 µm, e) barra = 50 µm. La flecha de bloque indica microtúbulos organizados, las flechas, microtúbulos dentro del implante dispuestos aleatoriamente. En b) y d) se muestra el borde del andamio y en c) y e), la parte interna del andamio.

Como se observa en las imágenes de PLA+pPPy-I, el material presenta fluorescencia en todos los canales <sup>133,224</sup>, por lo que la señal de MAP2 se traslapa con la de las fibras recubiertas con pPPy-I (Figura 67).

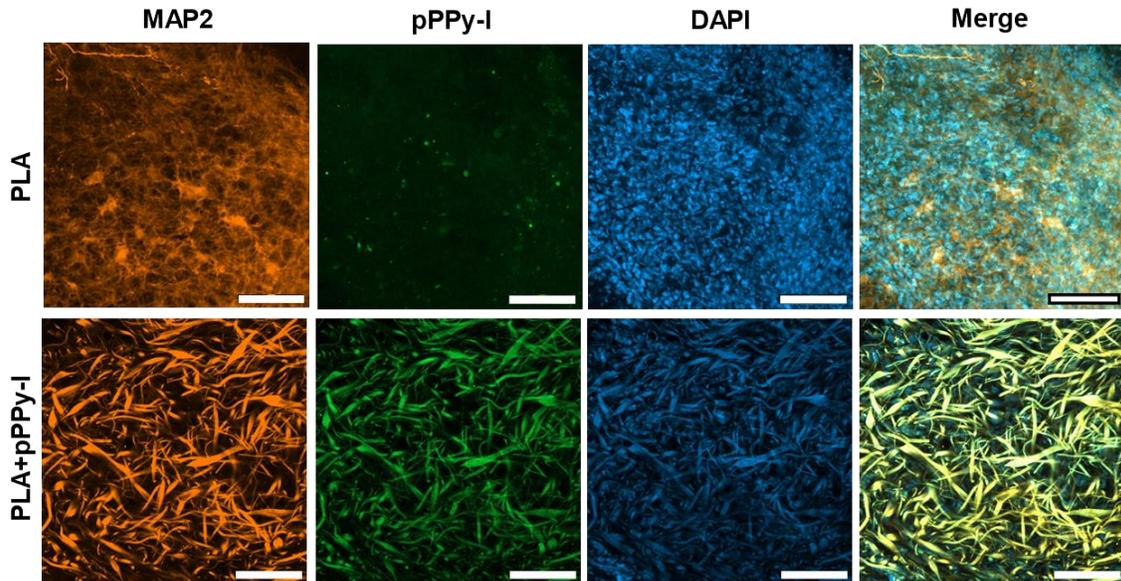


Figura 67. Separación por canales de imágenes de inmunofluorescencia. En PLA, no hay señal de pPPy-I, facilitando la identificación de las marcas de interés. En el PLA+pPPy-I se obtiene fluorescencia en los tres canales, por lo que las señales de MAP2 y DAPI se encuentran traslapadas con la del pPPy-I. Barra=100 $\mu$ m.

Sin embargo, la marca de MAP2/DAPI se detecta en los andamios y en el tejido adyacente, adentrándose al andamio (Figura 68). Para tratar de identificar cada una de las marcas por separado e independientes de la fluorescencia del pPPy-I, las imágenes de microscopía confocal fueron separadas por canales y se aplicó la operación *división* entre el canal de la marca de interés (MAP2 o DAPI) y el canal de fluorescencia del pPPy-I (canal verde), por cada rebanada óptica. El procedimiento esquemático se muestra en la Figura 69. De esta forma se detectaron microtúbulos y pericarion de neuronas dentro del implante fibrilar, como se muestra en la Figura 70.

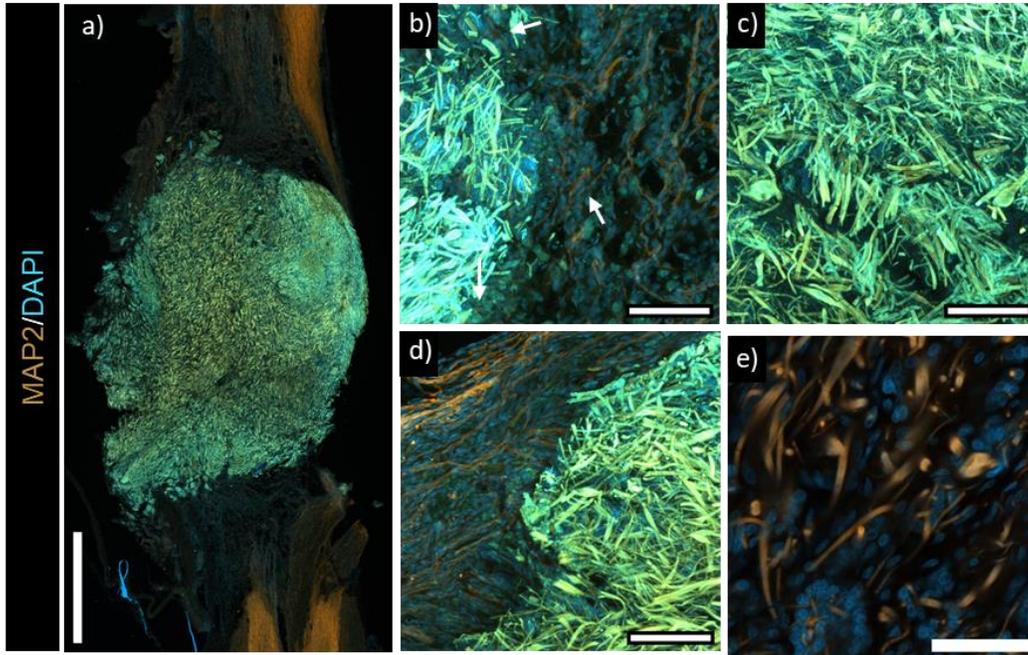


Figura 68. Inmunofluorescencia de médula implantada con PLA+pPPy-I. Muestra completa en a), barra = 1mm; acercamientos en b), c) y d), barra = 100  $\mu$ m, e) barra = 50  $\mu$ m. Las flechas indican microtúbulos adentrándose al andamio. En b) y d) se muestra el borde del andamio y en c) y e), la parte interna del andamio.

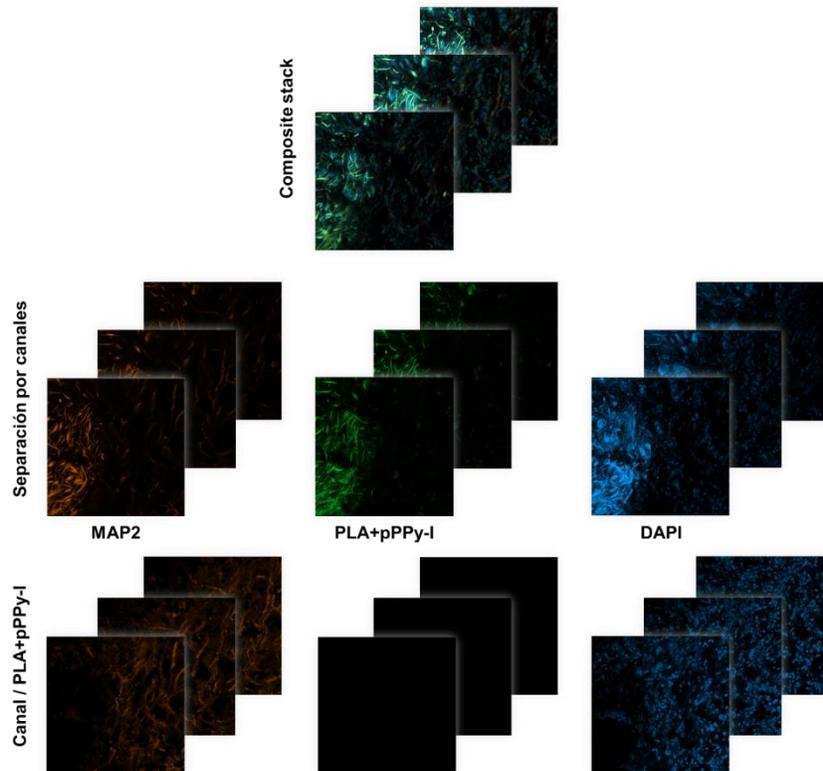


Figura 69. Esquema del procesamiento de imágenes de inmunofluorescencia. La pila de imágenes es separada por canales (MAP2, PLA+pPPy-I y DAPI). Las pilas de MAP2 y DAPI se dividen respecto a la pila de PLA+pPPy-I

de forma independiente (Canal/PLA+pPPy-I) para eliminar la marca de fluorescencia del PLA+pPPy-I e identificar las señales de MAP2 y los núcleos (DAPI).

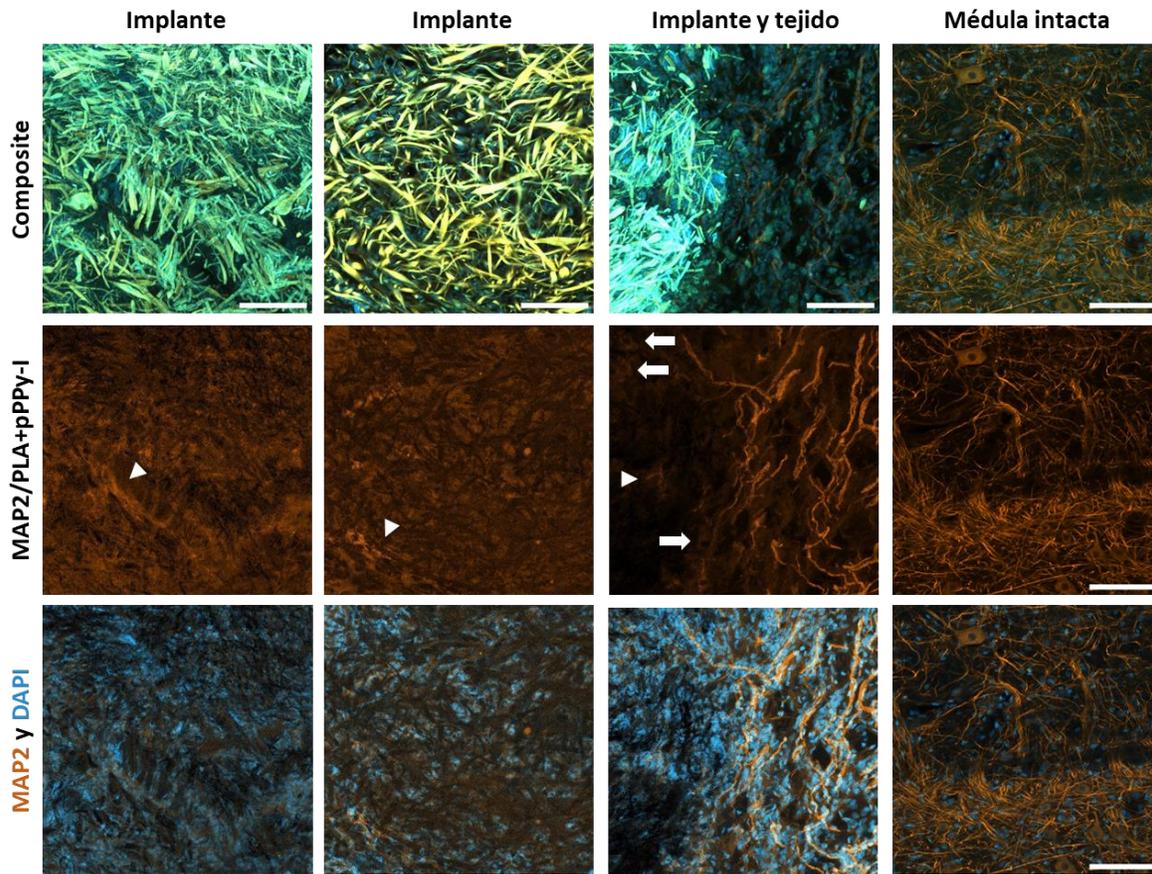


Figura 70. Evidencia de neuronas proyecciones citoplasmáticas neuronales en el implante. En la primera fila se muestra la imagen compuesta por los 3 canales adquiridos, en la segunda la imagen procesada para eliminar la fluorescencia de las fibras de PLA+pPPy-I, quedando únicamente la marca del anticuerpo para MAP2. Las flechas de bloque indican los somas de neuronas y las cabezas de flecha, microtúbulos (proyecciones dendríticas). En la última fila se muestra la imagen compuesta por las marcas de MAP2 y DAPI sin la marca de PLA+pPPy-I. Barra = 100  $\mu$ m.

Sin embargo, este procesamiento presenta la limitación de la posible pérdida de intensidad de MAP2 y DAPI colocalizadas con las fibras de PLA+pPPy-I, por lo que se requieren más análisis para cuantificar la marca pura de inmunofluorescencia sobre las fibras del compuesto.

Aunque este procesamiento presenta limitaciones importantes de pérdida de señal, al quitar la marca de fluorescencia del pPPy-I, la imagen compuesta de MAP2+DAPI muestra que entre las fibras del andamio hay células y tejido asociado con microtúbulos, lo cual sugiere la prolongación neurítica sobre las fibras de los andamios de PLA+pPPy-I.

## Discusión

La LME produce una disrupción irreversible en la integridad del tejido nervioso, muerte celular, destrucción axonal, proliferación de astrocitos reactivos, falla en la diferenciación de oligodendrocitos y por lo tanto desmielinización, afectando la función motora, sensorial y autonómica<sup>4,225</sup>. Esta problemática se debe en gran medida al daño secundario, donde se agrava la condición de la LME al formarse un tejido que inhibe la reconexión de los segmentos funcionales de la ME. Como se observó en los análisis *in vivo*, las imágenes de RM del grupo control muestran desde la primera semana de estudio los rasgos asociados con disrupción de la integridad tisular e inflamación, tal como se observa en la práctica clínica<sup>160</sup>, lo cual valida el modelo de LMESC.

En humanos, las LMESC son raras, pero en investigación experimental son un modelo contundente y reproducible para estudiar la regeneración tisular<sup>20</sup>. Los modelos de LMESC implican la disrupción total de la ME, por lo que no hay comunicación de las señales bioquímicas y bioeléctricas, y, por lo tanto, se pierde la función motora y sensorial. Los modelos de LME incompleta tienen un mejor pronóstico de recuperación, ya que en los tractos remanentes se produce reorganización de circuitos nerviosos y plasticidad, recuperando la función motora y sensorial<sup>35</sup>.

En estudios de LME mediante contusión dorsal se observa una recuperación motora espontánea en animales control sin tratamiento que es superior a la que se observa en los modelos de LMESC. Como se reporta en<sup>74,80</sup>, los animales control sin tratamiento alcanzan un nivel de recuperación motora alrededor de los 4/21 puntos en la escala BBB, mientras que los animales con LMESC sin tratamiento alcanzan alrededor de 2/21 como se muestra en el presente trabajo y en<sup>76</sup>, quienes emplearon este mismo modelo de LME. Además, como se demostró en<sup>226</sup> existe una relación directa entre la recuperación motora espontánea y la severidad de la LME.

Por otro lado, la protección del tejido preservado de los efectos del daño secundario es crucial para que los procesos tales como plasticidad se produzcan<sup>38</sup>. Como se ha reportado en estudios previos, el uso del pPPy-I produce la neuroprotección de la ME, facilitando la recuperación estructural y funcional<sup>74,76,78,80</sup>. De esta manera, la recuperación motora se vio incrementada significativamente respecto a los animales que no se les aplicó el tratamiento.

En este trabajo, se observó una recuperación motora con el tiempo en los tres grupos de estudio, lo cual fue de acuerdo con la literatura donde se reporta que en modelos de LME en rata se ha observado cierta recuperación espontánea, sin embargo, en el grupo PLA+pPPy-I se encontró una recuperación estadísticamente significativa, en comparación con el grupo control sin tratamiento, con más del 70% de animales con un nivel entre 8 y 12 puntos en la escala BBB.

Después de 5 semanas de tratamiento, los efectos del implante de PLA+pPPy-I produjeron una recuperación motora significativamente superior que la de los animales control, lo cual representa un resultado relevante considerando que los pacientes con LME actualmente cuentan con limitadas opciones terapéuticas que permitan una recuperación eficiente<sup>38,45,227</sup>. Además, el nivel de recuperación motora alcanzado supera en promedio 3 puntos de la escala BBB de locomoción, en comparación con el implante de la pastilla de pPPy-I reportado en estudios previos<sup>72,76</sup>. Esto sugiere

que la estructura fibrilar con superficie de pPPy-I puede producir un efecto superior dado por una disponibilidad mayor del pPPy-I a las células, en conjunto con un sustrato más robusto aportado por la estructura fibrilar.

Aunque no hubo diferencias significativas entre el grupo PLA y los otros dos grupos experimentales, se observó una recuperación motora promedio ligeramente superior respecto al control, debido a una respuesta bimodal en el grupo PLA. En general, se observó que para la semana 4 el grupo PLA manifestó rasgos estructurales similares al control, con una significativa disminución en el volumen de los tractos de la ME, que se recuperan para la semana 8. La recuperación motora fue similar al grupo control en el 88.2% del grupo PLA y similar a PLA+pPPy-I en los demás casos, lo cual sugiere que el implante de PLA puede tener un efecto terapéutico después de las 4 semanas, a menos que la reacción inflamatoria hacia el implante y el daño secundario sean exacerbados <sup>228</sup>, como se muestra en los estudios de RM y en las pruebas histológicas. Tal como se mostró en <sup>46</sup>, quienes también aplicaron implantes de PLA fibrilar, aunque se observe una respuesta estructural adecuada del tejido debida al implante, éste puede no ser funcional. Por ello, a pesar de la versatilidad del PLA <sup>127</sup>, en este trabajo se comprueba que al recubrirlo con pPPy-I mejora su desempeño como implante en LMESC y promueve la recuperación funcional.

La LMESC a nivel torácico produce paraplejia, pérdida de la sensibilidad por debajo del sitio de lesión y disfunción autonómica <sup>10,225,229</sup>. La primera semana de estudio, los animales tuvieron parálisis de las patas posteriores y pérdida de la función autónoma de micción. En este sentido, se ha reportado que la recuperación motora está correlacionada con la recuperación de la función vesical <sup>230</sup>. En el presente trabajo se observó que ningún animal del grupo control recuperó esta función autónoma, y únicamente dos animales con PLA (11.76%) y dos con PLA+pPPy-I (9.1%) recuperaron la capacidad de evacuar la orina de forma autónoma, mediante el método planteado en <sup>231</sup>, basado en una puntuación asignada dependiendo de las características y la cantidad de orina eliminada ante la expresión manual de la vejiga.

La disfunción vesical es una de las principales consecuencias de la LME, consideradas por los pacientes de mayor importancia que la pérdida motora <sup>230,232</sup>. Esta función depende del control supra espinal del tracto urinario y la coordinación de músculos lisos en la vejiga <sup>233</sup>, por lo que debido a una LMESC esta función se pierde.

En este caso hay evidencia contradictoria ya que se ha reportado que las ratas con LME recuperan eventualmente la capacidad de micción autónoma <sup>46</sup>, aunque que en los modelos de LME incompleta o por contusión las ratas recuperan esta autonomía antes que las ratas con LMESC <sup>232,234</sup>. Por otro lado, no se reporta recuperación de la autonomía en la micción en los antecedentes de este trabajo, ni en LMESC <sup>73,115,124,226</sup> ni en LME por contusión <sup>74,75</sup>. Dada la relevancia de esta función, es importante estudiar la evolución de la recuperación de la micción autónoma, para lo cual el uso de jaulas metabólicas <sup>233,234</sup> u otras técnicas no invasivas <sup>230</sup> podrían dar información más precisa acerca de la recuperación de dicha función.

La RM es una técnica diagnóstica estándar, utilizada ampliamente en la clínica, dado que permite obtener información detallada de la estructura tisular *in vivo* y la toma de decisiones más acertadas

<sup>190</sup>. Las imágenes anatómicas por IRM demostraron que para la semana 4 de estudio los implantes fibrilares están cubiertos de tejido nervioso, sin embargo, la tractografía aumentó la sensibilidad de la técnica para obtener más información sobre la microestructura tisular. De esta forma se encontró que en el grupo de PLA+pPPy-I hubo una recuperación significativa de los tractos, mientras que en control y PLA hubo una reducción significativa de los tractos para la semana 4, reflejándose los efectos del daño secundario. Por lo tanto, la información del DTI complementa las imágenes de RM <sup>235</sup>, al proporcionar información estructural de mayor resolución espacial por medio de la difusión del agua en el tejido.

La difusión de las moléculas de agua proporciona información de la microestructura tisular <sup>191</sup>. FA mantiene valores cercanos a 1 en tejidos organizados linealmente, tal como en los tractos de la materia blanca. Debido a la lesión, FA se reduce, sin embargo, al formarse la cicatriz fibrótica los valores de MD y FA se ven alterados por la presencia de tejido conectivo. MD se mantuvo similar a los valores de los intactos en el EC, lo cual sugiere una restricción a la difusión del agua.

Aunque no se detectan diferencias entre la semana 4 y 8 en las imágenes anatómicas de RM, hubo cambios en la microestructura tisular, evidenciados por la recuperación de FA <sup>74,236,237</sup>. Además, mientras en los animales control se presentó una disminución significativa del volumen de los tractos, los animales implantados mostraron mejora microestructural, particularmente en PLA+pPPy-I, lo cual podría explicar la recuperación motora eficiente de los animales <sup>238-240</sup>. Tal como se ha demostrado previamente, DTI es una técnica que permite mejorar la sensibilidad de los estudios de RM, ofreciendo información cuantitativa con una mayor sensibilidad a la microarquitectura tisular <sup>190,212,241</sup>, además de estar relacionada con la funcionalidad tisular <sup>42,242</sup>.

El análisis de metabolitos fisiopatológicos *in vivo* reveló que los niveles de NAA/Cr, asociados al tejido nervioso funcional, se recuperaron para la semana 4 en PLA+pPPy-I, aunque sin mostrar diferencias significativas entre los grupos. Por otro lado, el incremento de Cho y ml se asocian con el metabolismo y descomposición de membranas celulares, gliosis y desmielinización, por lo que en la LME este efecto es esperable dada la proliferación de astrocitos reactivos como parte de la respuesta de la ME a la lesión en un intento de contener la propagación del daño, entre otros efectos <sup>243,244</sup>. Por ello, la relación entre NAA y Cho proporciona información acerca de la extensión del daño secundario respecto al tejido preservado.

La reorganización del tejido nervioso se activa desde la fase aguda y persiste en el tiempo. En este caso se observó que los implantes ofrecen un ambiente permisivo para la adhesión celular y crecimiento tisular, como se mostró en el análisis histológico. Los implantes fueron poblados por distintos tipos celulares que formaron lámina basal y estimularon la adaptación tisular para permitir una recuperación motora <sup>245,246</sup>. Sin embargo, en los grupos control y PLA, se desarrollaron cavidades quísticas en una proporción más grande del tejido, lo cual impacta la recuperación funcional. Por otro lado, la presencia de neuronas fue evidente por la marca de MAP2 en los andamios, a pesar de que la fluorescencia del pPPy-I se empalma con la señal de la marca de MAP2, por lo que se vuelve necesario probar con otras técnicas de identificación que no sean sensibles al efecto de la fluorescencia. Por ejemplo, se podrían efectuar análisis de microscopía electrónica en conjunto con la técnica de *immuno-gold* para la identificación específica de las estructuras tisulares <sup>247-249</sup>.

Los radicales libres forman parte del entorno hostil que se instala en la ME debido al daño secundario, lo cual produce un ambiente proinflamatorio en el epicentro de la lesión que colapsa los intentos de recuperación y regeneración del tejido nervioso<sup>33,51</sup>. Los polímeros conductores tales como PPy y PANI tienen propiedades antioxidantes, debido a la presencia de grupos amino (NH) en la cadena polimérica, lo que les permite neutralizar radicales libres, posiblemente por medio de pequeños cambios en las cadenas poliméricas tales como entrecruzamiento<sup>250,251</sup>. El área superficial es un factor importante en la capacidad de neutralización de radicales libres. En este caso, el pPPy-I se encuentra disponible en la superficie de las fibras, que se ve amplificada por su disposición en forma de andamio, por lo que el efecto sobre el ambiente tisular puede verse incrementado<sup>244,252</sup>.

Como se ha reportado previamente, la respuesta funcional al tratamiento con pPPy-I en modelos contusivos produce una recuperación motora significativamente superior que en modelos de LMESC<sup>74-76</sup>, dada la potencial presencia de fibras remanentes en el modelo contusivo que permiten procesos de reorganización de vías nerviosas y plasticidad, a su vez facilitadas por la modulación de la respuesta inflamatoria por parte del pPPy-I. En contraste, el modelo de LMESC elimina toda conexión entre los segmentos de la ME, por lo que la recuperación funcional detectada puede deberse a elongación neurítica a través del andamio y probable regeneración tisular por medio de procesos como diferenciación celular<sup>253,254</sup>.

La topografía del sustrato y la estimulación eléctrica se han estudiado como señales que facilitan la diferenciación de células madre hacia un linaje neuronal, que expresan marcadores específicos como MAP2 y Tuj1<sup>58,255</sup>. En la ME existen nichos neurogénicos dados por la diferenciación de células madre neuronales<sup>256-259</sup>, por lo que la estimulación de células madre endógenas inactivas es una estrategia potencial como tratamiento de la LME<sup>117</sup>. En este trabajo, la expresión de MAP2 se encontró sobre las fibras de los andamios, lo cual sugiere la extensión neurítica a través de los andamios, que podrían estar reconectando los segmentos de ME. Dado que el pPPy-I tiene propiedades electroconductoras en el ambiente fisiológico<sup>70,71</sup>, se podría facilitar la propagación de señales bioeléctricas sobre la superficie de las fibras cubiertas por pPPy-I, de manera que se promueva la diferenciación celular de células madre endógenas<sup>260,261</sup>.

## Conclusiones generales

La LMESC produce la desconexión de tractos nerviosos, hemorragia, inflamación y el desarrollo de daño secundario en animales control sin tratamiento. Los andamios fibrilares implantados constituyeron un sustrato para la adhesión e infiltración celular, modificando el desarrollo del daño secundario. El daño secundario se vio disminuido por el recubrimiento de las fibras con pPPy-I, en forma de menor cantidad de cavidades quísticas, al tiempo que proporciona un sustrato permisivo para el crecimiento de tejido nervioso.

Los andamios de PLA mostraron una respuesta heterogénea. Se detectó una reacción inflamatoria significativa hacia este implante desde la semana 4, que en algunos casos persiste hasta la semana 8. En algunos animales esta inflamación disminuye, favoreciendo la infiltración de microtúbulos neuronales hacia el andamio y favoreciendo la recuperación funcional motora.

Los andamios fibrilares fabricados mediante electrohilado son un sustrato que facilita la adhesión y viabilidad celular, además de que tienen la versatilidad para ser modificados en superficie con polímero sintetizado por plasma sin alterar la estructura fibrilar porosa. De esta forma, la estructura fibrilar presenta grupos funcionales tales como aminas, cadenas alifáticas, enlaces triples, ramificaciones y entrecruzamiento, amplificando las propiedades terapéuticas de las fibras de PLA mediante las propiedades del pPPy-I tales como neuroprotección, hidrofiliidad y electroconductividad.

El depósito de polímero de pirrol sintetizado por plasma sobre las fibras mejora las propiedades de los andamios de PLA, incrementando su hidrofiliidad e interacción con el medio biológico y las células y tejidos nerviosos. Este efecto se ve reflejado en un mejor desempeño funcional de los implantes compuestos, moderando los efectos del daño secundario tales como desarrollo de cavidades quísticas y destrucción tisular.

El análisis *in vivo* mostró rasgos estructurales de una mejora sustancial desde la 4ª semana de tratamiento con el compuesto de PLA+pPPy-I, acompañado de una recuperación significativa de la locomoción. El análisis de los potenciales evocados y el estudio de la inmunofluorescencia sugieren que esta recuperación funcional puede deberse a la transmisión de señales bioeléctricas desde centros superiores a través de los andamios y no solamente a la recuperación del segmento de la ME inferior a la lesión.

## Resumen de aportaciones

1. Propuesta y fabricación de andamios fibrilares para su implante como tratamiento de una LMESC en ratas, fabricados con PLA y recubiertos con pPPy-I.
2. Caracterización fisicoquímica, morfológica y biológica de los andamios fabricados y demostración de sus propiedades de interacción con el medio biológico por ángulo de contacto, ensayo de viabilidad por MTT y análisis de orientación de estructuras celulares en imágenes de microscopía electrónica de barrido.
3. Seguimiento *in vivo* de los efectos de la LMESC y los andamios de PLA y PLA+pPPy-I por medio de RM en un equipo 3T Phillips Achieva empleando la antena neurovascular en médula espinal de ratas de laboratorio, integrando a las técnicas convencionales T1 y T2 las técnicas avanzadas DTI y espectroscopía de RM, aportando efectos estructurales y metabólicos por cada animal en el tiempo.
4. Implementación de estudios de potenciales evocados motores y somatosensoriales en ratas utilizando los equipos BIOPAC acoplados a electrodos de aguja. Se evaluaron múltiples configuraciones de la instrumentación y se delimitaron sus alcances y limitaciones para la obtención de las respuestas evocadas.
5. Se analizaron los tejidos implantados con los andamios fabricados por técnicas estándar de histopatología y por inmunofluorescencia para determinar la presencia de neuronas en la zona de la lesión e implante.

## Limitaciones y perspectivas

El número de animales es limitado para obtener conclusiones definitivas de cada técnica de estudio. Es importante continuar con la implementación de las técnicas descritas en este trabajo, ya que no solamente contribuyen a esclarecer los efectos de la LMESC y mecanismos de recuperación funcional, sino que además constituyen técnicas que brindan información valiosa en la línea de investigación de la LMESC en ratas.

El espectro de RM como técnica no invasiva puede dar luz a los cambios agudos que ocurren debido al implante. En la rata son muy rápidos<sup>202</sup>, incluso durante las primeras horas después de la lesión, por lo que es importante en trabajos futuros considerar obtener un espectro dentro de las 24 h posteriores a la cirugía. Adicionalmente, para el espectro se recomienda aplicar bandas de saturación para limitar los artefactos asociados con el hueso y el LCR. Además, explorar la adquisición con tiempos de eco menores ( $TE < 50$  ms) para la detección de metabolitos como ml, o mayores ( $TE > 120$  ms), para la detección de Lac<sup>198,203</sup> puede dar información relevante y específica *in vivo* del desarrollo de la lesión y posible recuperación.

No se cuenta con evidencia que permita señalar la causa de la mortalidad debido a la cirugía o la aplicación de anestesia general y el estudio de RM. Para ello, se podría aplicar un protocolo de monitoreo de los signos vitales durante las primeras 24 h postoperatorias, en busca de signos o síntomas de shock neurogénico o cambios en los niveles de metabolitos en sangre, en busca de efectos adversos a nivel sistémico. Alternativamente se puede utilizar anestesia inhalada con monitoreo constante de la frecuencia cardíaca y respiratoria y control de la temperatura corporal del animal durante el estudio de RM, de manera que se puedan realizar maniobras de rescate y evitar la pérdida de los sujetos con bradicardia, bradipnea o hipotermia.

Los potenciales evocados como técnica para evaluar la funcionalidad de las motoras y sensoriales de forma cuantitativa y objetiva depende de la instrumentación. Por ello, aplicar metodologías e instrumentación eficientes que permitan evaluar las respuestas en tiempo real sería de gran utilidad práctica para evaluar el efecto de tratamientos. Asimismo, en la práctica quirúrgica esta técnica es aplicada en clínica y podría ser crucial para la aplicación de la estrategia de resección de la cicatriz fibrótica en modelos de lesión crónica, dejando intactos los circuitos nerviosos funcionales<sup>262</sup>.

La fluorescencia del pPPy-I se ubica entre 350 y 600 nm, posiblemente en el rojo y rojo lejano también<sup>133,224</sup>. Esta propiedad interfiere con la cuantificación de la marca de MAP2 y DAPI. Para futuros experimentos, se podría considerar el uso de fluoróforos en el espectro del violeta o azul cercano o el uso de negro sudan antes de realizar la inmunofluorescencia con el fin de limitar la fluorescencia del pPPy-I.

Los andamios fibrilares son sustratos versátiles que pueden complementarse de múltiples formas para mejorar su desempeño terapéutico. Una vez que el andamio se forma con la estructura deseada, las fibras pueden modificarse en su superficie con factores de crecimiento, estímulos de diferenciación o cultivo de células madre. También pueden modificarse los parámetros de

fabricación para modular la velocidad de degradación de acuerdo con el material empleado, o encapsular fármacos o acoplar exosomas en las fibras para liberación controlada.

Parte del modelo LMESC incluye la laminectomía y la abertura de las meninges para poder acceder a la médula y cortarla. Normalmente, al ejecutar este modelo se vuelven a unir las meninges utilizando un punto de sutura <sup>76,263,264</sup>, sin embargo, esta técnica no asegura una reparación completa de las meninges, ya que se pueden presentar complicaciones asociadas a la fisura del corte así como la generada al atravesar la aguja y la sutura para mantener el tejido unido, tales como el acceso de agentes infecciosos o pérdida de líquido cefalorraquídeo <sup>265,266</sup>. Por lo tanto, en este trabajo se propuso el uso de un apósito de PLA+pPPy-I para cubrir la incisión en las meninges con el fin de que el tejido cierre completamente, facilitado por el material.

Dado que la evaluación de la efectividad de este apósito no fue parte de los alcances de este trabajo, el apósito fue colocado en todos los sujetos experimentales de LMESC a partir de los resultados obtenidos en pruebas piloto en un número reducido de animales. Sin embargo, es importante demostrar la efectividad de este apósito, comparándolo con la técnica estándar. Mediante el análisis del tejido por técnicas histológicas se podría corroborar que el material facilita el cierre de las meninges sin producir adherencias, fibrosis o ingreso de agentes infecciosos a la ME.

## Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. (2013). *Lesiones medulares*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>
2. Kang, Y., Ding, H., Zhou, H., Wei, Z., Liu, L., Pan, D., & Feng, S. (2018). Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *Journal of Neurorestoration*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.2147/JN.S143236>
3. Bennett, J., Das, J., & Emmady, P. (2022). *Spinal Cord Injuries*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560721/>
4. Papa, S., Mauri, E., Rossi, F., Perale, G., & Veglianesi, P. (2020). Introduction to spinal cord injury as clinical pathology. En *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies* (pp. 1–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00001-6>
5. Organización Mundial de la Salud. (2014). *Lesiones de la Médula Espinal - Perspectivas Internacionales. Resumen*.
6. Kumar, R., Lim, J., Mekary, R. A., Rattani, A., Dewan, M. C., Sharif, S. Y., Osorio-Fonseca, E., & Park, K. B. (2018). Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurgery*, 113, e345–e363. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.02.033>
7. Estrada-Mondaca, S., Carreón-Rodríguez, A., Parra-Cid, M. del C., Ibarra-Ponce De León, C., Velasquillo-Martínez, C., Vacanti, C. A., & Belkind-Gerson, J. (2007). *Lesión de médula espinal y medicina regenerativa*. 49(6), 437–444.
8. Arora, P. (2020). Spinal Cord Injury. En *The Perioperative Medicine Consult Handbook* (pp. 259–265). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-19704-9\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19704-9_31)
9. Stanfield, C. L. (2013). *Principles of Human Physiology* (5th ed.). Pearson.
10. Sheerin, F. (2004). Spinal cord injury: anatomy and physiology of the spinal cord. *Emergency nurse: the journal of the RCN Accident and Emergency Nursing Association*, 12(8), 30–36. <https://doi.org/10.7748/en2004.12.12.8.30.c1178>
11. Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G., & Heise, C. (2009). Atlas of the Rat Spinal Cord. En *The Spinal Cord*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50019-5>
12. Ferrero, B., & Di Liberto, A. (2020). Spinal cord injury. En *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies* (pp. 13–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00002-8>
13. Snell, R. S. (2010). Clinical Neuroanatomy. En *Scoroot: A Dictionary of Scots Words and Phrases in Current Use* (7a ed.). <https://doi.org/10.5040/9781474284974.00588>
14. Nógrádi, A., & Vrbová, G. (2013). *Anatomy and Physiology of the Spinal Cord*. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6229/>
15. Hamilton, L. K., Truong, M. K. V., Bednarczyk, M. R., Aumont, A., & Fernandes, K. J. L. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*, 164(3), 1044–1056. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.006>
16. Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
17. Cheriyan, T., Ryan, D. J., Weinreb, J. H., Cheriyan, J., Paul, J. C., Lafage, V., Kirsch, T., & Errico, T. J. (2014). Spinal cord injury models: A review. *Spinal Cord*, 52(8), 588–595. <https://doi.org/10.1038/sc.2014.91>

18. Basso, M. D., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *Journal of neurotrauma*, 12(1), 1–21.
19. McDonough, A., Monterrubio, A., Ariza, J., & Martínez-Cerdeño, V. (2015). Calibrated forceps model of spinal cord compression injury. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(98), 1–6. <https://doi.org/10.3791/52318>
20. Ahmed, R. U., Alam, M., & Zheng, Y. P. (2019). Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*, 5(3), e01324. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01324>
21. Abdullahi, D., Annuar, A. A., Mohamad, M., Aziz, I., & Sanusi, J. (2017). Experimental spinal cord trauma: A review of mechanically induced spinal cord injury in rat models. *Reviews in the Neurosciences*, 28(1), 15–20. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0050>
22. Chen, J., Xu, Z. C., Xu, X. M., & Zhang, J. H. (Eds.). (2019). *Animal Models of Acute Neurological Injury* (2nd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16082-1>
23. Dolan, E. J., & Tator, C. H. (1979). A new method for testing the force of clips for aneurysms or experimental spinal cord compression. *Journal of Neurosurgery*, 51(2), 229–233. <https://doi.org/10.3171/jns.1979.51.2.0229>
24. Precision Systems & Instrumentation. (2012). *User's Manual PSI-IH Impactor* (pp. 1–27).
25. Wu, X., Zhang, Y. P., Qu, W., Shields, L. B. E., Shields, C. B., & Xu, X. M. (2017). A tissue displacement-based contusive spinal cord injury model in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 124, 1–6. <https://doi.org/10.3791/54988>
26. Krishna, V., Andrews, H., Jin, X., Yu, J., Varma, A., Wen, X., & Kindy, M. (2013). A contusion model of severe spinal cord injury in rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 78, 1–5. <https://doi.org/10.3791/50111>
27. Speidel, J., Mattucci, S., Liu, J., Kwon, B. K., Tetzlaff, W., & Oxland, T. R. (2020). Effect of Velocity and Duration of Residual Compression in a Rat Dislocation Spinal Cord Injury Model. *Journal of Neurotrauma*, neu.2019.6747. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6747>
28. Lam, C. J., Assinck, P., Liu, J., Tetzlaff, W., & Oxland, T. R. (2014). Impact Depth and the Interaction with Impact Speed Affect the Severity of Contusion Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma*, 31(24), 1985–1997. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3392>
29. Sparrey, C. J., Choo, A. M., Liu, J., Tetzlaff, W., & Oxland, T. R. (2008). The distribution of tissue damage in the spinal cord is influenced by the contusion velocity. *Spine*, 33(22), 812–819. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181894fd3>
30. Wang, N., Xiao, Z., Zhao, Y., Wang, B., Li, X., Li, J., & Dai, J. (2018). Collagen scaffold combined with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote functional recovery after scar resection in rats with chronic spinal cord injury. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), e1154–e1163. <https://doi.org/10.1002/term.2450>
31. Liu, D., Li, X., Xiao, Z., Yin, W., Zhao, Y., Tan, J., Chen, B., Jiang, X., & Dai, J. (2019). Different functional bio-scaffolds share similar neurological mechanism to promote locomotor recovery of canines with complete spinal cord injury. *Biomaterials*, 214, 119230. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119230>
32. Hodgetts, S. I., Plant, G. W., & Harvey, A. R. (2009). Spinal Cord Injury: experimental animal models and relation to human therapy. En *The Spinal Cord* (pp. 209–237). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50018-3>
33. Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic

- spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
34. Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1125–1137. <https://doi.org/10.1242/dmm.025833>
  35. O'Shea, T. M., Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
  36. Flack, J., Sharma, K., & Xie, J. (2022). Delving into the recent advancements of spinal cord injury treatment: A review of recent progress. *Neural Regeneration Research*, 17(2), 283–291. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.317961>
  37. Badhiwala, J. H., Ahuja, C. S., & Fehlings, M. G. (2019). Time is spine: A review of translational advances in spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 30(1), 1–18. <https://doi.org/10.3171/2018.9.SPINE18682>
  38. Shen, H., Fan, C., You, Z., Xiao, Z., Zhao, Y., & Dai, J. (2022). Advances in Biomaterial-Based Spinal Cord Injury Repair. *Advanced Functional Materials*, 32(13), 1–25. <https://doi.org/10.1002/adfm.202110628>
  39. Yang, C.-Y., Huang, W.-Y., Chen, L.-H., Liang, N.-W., Wang, H.-C., Lu, J., Wang, X., & Wang, T.-W. (2021). Neural tissue engineering: the influence of scaffold surface topography and extracellular matrix microenvironment. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(3), 567–584. <https://doi.org/10.1039/D0TB01605E>
  40. Doblado, L. R., Martínez-Ramos, C., & Pradas, M. M. (2021). Biomaterials for Neural Tissue Engineering. *Frontiers in Nanotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.643507>
  41. Papadimitriou, L., Manganas, P., Ranella, A., & Stratakis, E. (2020). Biofabrication for neural tissue engineering applications. *Materials Today Bio*, 6, 100043. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100043>
  42. Liu, X. Y., Liang, J., Wang, Y., Zhong, L., Zhao, C. Y., Wei, M. G., Wang, J. J., Sun, X. Z., Wang, K. Q., Duan, J. H., Chen, C., Tu, Y., Zhang, S., Ming, D., & Li, X. H. (2019). Diffusion tensor imaging predicting neurological repair of spinal cord injury with transplanting collagen/chitosan scaffold binding bFGF. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(11). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6322-y>
  43. Zhang, L., Fan, C., Hao, W., Zhuang, Y., Liu, X., Zhao, Y., Chen, B., Xiao, Z., Chen, Y., & Dai, J. (2021). NSCs Migration Promoted and Drug Delivered Exosomes-Collagen Scaffold via a Bio-Specific Peptide for One-Step Spinal Cord Injury Repair. *Advanced Healthcare Materials*, 10(8), 1–11. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001896>
  44. Li, X., Liu, D., Shu, M., Liu, W., Shen, Y., Long, G., Zhao, Y., Hou, X., Xiao, Z., & Dai, J. (2021). Binary scaffold facilitates in situ regeneration of axons and neurons for complete spinal cord injury repair. *Biomaterials Science*, 13–15. <https://doi.org/10.1039/d0bm02212h>
  45. Suzuki, H., Imajo, Y., Funaba, M., Ikeda, H., Nishida, N., & Sakai, T. (2023). Current Concepts of Biomaterial Scaffolds and Regenerative Therapy for Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2528. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2528>
  46. Hurtado, A., Cregg, J. M., Wang, H. B., Wendell, D. F., Oudega, M., Gilbert, R. J., & McDonald, J. W. (2011). Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-l-lactic acid microfibers. *Biomaterials*, 32(26), 6068–6079. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.006>
  47. Cnops, V., Chin, J. S., Milbreta, U., & Chew, S. Y. (2020). Biofunctional scaffolds with high packing density of aligned electrospun fibers support neural regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 108(12), 2473–2483. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36998>
  48. Cheng, Y., Zhang, Y., & Wu, H. (2022). Polymeric Fibers as Scaffolds for Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.807533>

49. Hanumantharao, S. N., & Rao, S. (2019). Multi-Functional Electrospun Nanofibers from Polymer Blends for Scaffold Tissue Engineering. *Fibers*, 7(66), 1–35. <https://doi.org/10.3390/fib707006>
50. Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y., & Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, 39(5), 862–890. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002>
51. Mutepfa, A. R., Hardy, J. G., & Adams, C. F. (2022). Electroactive Scaffolds to Improve Neural Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Frontiers in Medical Technology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2022.693438>
52. Manzari-Tavakoli, A., Tarasi, R., Sedghi, R., Moghimi, A., & Niknejad, H. (2020). Fabrication of nanochitosan incorporated polypyrrole/alginate conducting scaffold for neural tissue engineering. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78650-2>
53. Balint, R., Cassidy, N. J., & Cartmell, S. H. (2014). Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(6), 2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>
54. Gajendiran, M., Choi, J., Kim, S. J., Kim, K., Shin, H., Koo, H. J., & Kim, K. (2017). Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 51, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.02.031>
55. Rinoldi, C., Lanzi, M., Fiorelli, R., Nakielski, P., Zembrzycki, K., Kowalewski, T., Urbanek, O., Grippo, V., Jezierska-Woźniak, K., Maksymowicz, W., Camposeo, A., Bilewicz, R., Pisignano, D., Sanai, N., & Pierini, F. (2021). Three-Dimensional Printable Conductive Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogel for Neural Tissue Applications. *Biomacromolecules*, 22(7), 3084–3098. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00524>
56. Zarei, M., Samimi, A., Khorram, M., Abdi, M. M., & Golestaneh, S. I. (2021). Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.031>
57. Jafarkhani, M., Salehi, Z., & Nematian, T. (2018). Preparation and characterization of chitosan/graphene oxide composite hydrogels for nerve tissue Engineering. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15620–15628. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.04.171>
58. Garrudo, F. F. F., Mikael, P. E., Rodrigues, C. A. V., Udangawa, R. W., Paradiso, P., Chapman, C. A., Hoffman, P., Colaço, R., Cabral, J. M. S., Morgado, J., Linhardt, R. J., & Ferreira, F. C. (2021). Polyaniline-polycaprolactone fibers for neural applications: Electroconductivity enhanced by pseudo-doping. *Materials Science and Engineering C*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111680>
59. Shafiee, A., Kehtari, M., Zarei, Z., Soleimani, M., Varshochian, R., Ahmadi, A., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2021). An in situ hydrogel-forming scaffold loaded by PLGA microspheres containing carbon nanotube as a suitable niche for neural differentiation. *Materials Science and Engineering C*, 120, 111739. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111739>
60. Shu, B., Sun, X., Liu, R., Jiang, F., Yu, H., Xu, N., & An, Y. (2019). Restoring electrical connection using a conductive biomaterial provides a new therapeutic strategy for rats with spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 692, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.031>
61. Raynald, R., Shu, B., Liu, X. Bin, Zhou, J. F., Huang, H., Wang, J. Y., Sun, X. D., Qin, C., & An, Y. H. (2019). Polypyrrole/polylactic acid nanofibrous scaffold cotransplanted with bone marrow stromal cells promotes the functional recovery of spinal cord injury in rats. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(9), 951–964. <https://doi.org/10.1111/cns.13135>

62. Flores-Sánchez, M. G., Raya-Rivera, A. M., Esquiliano-Rendon, D. R., Ontiveros-Nevarés, P. G., Islas-Arteaga, N. C., Morales-Corona, J., & Olayo, R. (2018). 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*, *67*(7), 427–437. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1342249>
63. Cruz, Y., Muñoz, E., Gomez-Pachón, E. Y., Morales-Corona, J., Olayo-Lortia, J., Olayo, R., & Olayo-Valles, R. (2019). Electrospun PCL-protein scaffolds coated by pyrrole plasma polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *30*(10), 832–845. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1603338>
64. Zuñiga-Aguilar, E. S., Olayo, R., Ramírez-Fernández, O., Morales, J., & Godínez, R. (2014). Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *25*(7), 729–747. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.898124>
65. Islas-Arteaga, N. C., Raya Rivera, A., Esquiliano Rendon, D. R., Morales-Corona, J., Ontiveros-Nevarés, P. G., Flores Sánchez, M. G., Mojica-Cardoso, C., & Olayo, R. (2019). Electrospun scaffolds with surfaces modified by plasma for regeneration of articular cartilage tissue: a pilot study in rabbit. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *68*(18), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1534109>
66. Ruiz-Velasco, G., Martínez-Flores, F., Morales-Corona, J., Olayo-Valles, R., & Olayo, R. (2017). Polymeric Scaffolds For Skin. *Macromolecular Symposia*, *374*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1002/masy.201600133>
67. Cortés-Ortiz, E., Olayo-Valles, R., Rodríguez-Talavera, R., González-Torres, M., Vargas-Muñoz, S., Olayo, R., Godínez-Fernández, R., Uribe Juárez, O. E., & Morales-Corona, J. (2021). Plasma Functionalized Scaffolds of Polyhydroxybutyrate Electrospun Fibers for Pancreatic Beta Cell Cultures. *Frontiers in Materials*, *8*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.600738>
68. Uribe-Juárez, O., Godínez, R., Morales-Corona, J., Velasco, M., Olayo-Valles, R., Acosta-García, M. C., Alvarado, E. J., Miguel-Alavez, L., Carrillo-González, O. J., Flores-Sánchez, M. G., & Olayo, R. (2021). Application of plasma polymerized pyrrole nanoparticles to prevent or reduce de-differentiation of adult rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*(9). <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06595-7>
69. Flores-Sánchez, M. G., Islas-Arteaga, N. C., Raya-Rivera, A. M., Esquiliano-Rendon, D. R., Morales-Corona, J., Uribe-Juarez, O. E., Vivar-Velázquez, F. I., Ortiz-Vázquez, G. P., & Olayo, R. (2021). Effect of a plasma synthesized polypyrrole coverage on polylactic acid/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A, March*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37205>
70. Colín, E., Olayo, M. G., Cruz, G. J., Carapia, L., Morales, J., & Olayo, R. (2009). Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body. *Progress in Organic Coatings*, *64*(2–3), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.08.033>
71. Cruz, G. J., Morales, J., & Olayo, R. (1999). Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films*, *342*(1), 119–126. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(98\)01450-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(98)01450-3)
72. Álvarez-Mejía, L., Salgado-Ceballos, H., Olayo, R., Cruz, G. J., Olayo, M. G., Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Mondragón-Lozano, R., Morales-Guadarrama, A., Sánchez-Torres, S., & Morales, J. (2015). Effect of Pyrrole Implants Synthesized by Different Methods on Spinal Cord Injuries of Rats. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, *36*(1), 7–21. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-95322015000100001&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/rmib/v36n1/v36n1a1.pdf](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322015000100001&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/rmib/v36n1/v36n1a1.pdf)
73. Olayo, R., Ríos, C., Salgado-Ceballos, H., Cruz, G. J., Morales, J., Olayo, M. G., Alcaraz-Zubeldia, M., Alvarez, A. L., Mondragon, R., Morales, A., & Diaz-Ruiz, A. (2008). Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of Materials Science:*

74. Mondragon-Lozano, R., Ríos, C., Roldan-Valadez, E., Cruz, G. J., Olayo, M. G., Olayo, R., Salgado-Ceballos, H., Morales, J., Mendez-Armenta, M., Alvarez-Mejia, L., Fabela, O., Morales-Guadarrama, A., Sánchez-Torres, S., & Diaz-Ruiz, A. (2017). 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. *Spine Journal*, 17(4), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2016.02.012>
75. Fabela-Sánchez, O., Salgado-Ceballos, H., Medina-Torres, L., Álvarez-Mejía, L., Sánchez-Torres, S., Mondragón-Lozano, R., Morales-Guadarrama, A., Díaz-Ruiz, A., Olayo, M.-G., Cruz, G. J., Morales, J., Ríos, C., & Olayo, R. (2018). 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*, 29(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6016-2>
76. Cruz, G. J., Mondragón-Lozano, R., Diaz-Ruiz, A., Manjarrez, J., Olayo, R., Salgado-Ceballos, H., Olayo, M. G., Morales, J., Alvarez-Mejía, L., Morales, A., Méndez-Armenta, M., Plascencia, N., Del Carmen Fernandez, M., & Ríos, C. (2012). Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(10), 2583–2592. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4715-2>
77. Morales-Guadarrama, A., Salgado-Ceballos, H., Grijalva, I., Morales, J., Ríos, C., Cruz, G. J., Diaz-Ruiz, A., Olayo, M.-G., Alvarez-Mejia, L., Mondragón-Lozano, R., Ibáñez-Contreras, A., Hernández-Godínez, B., & Olayo, R. (2015). Spinal Cord Injury of Rhesus Monkey Implanted with PPy/I Plasma Polymer, MRI Study. En *IFMBE Proceedings* (Vol. 49, pp. 174–177). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7\\_46](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7_46)
78. Álvarez-Mejía, L., Morales, J., Cruz, G. J., Olayo, M.-G., Olayo, R., Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Mondragón-Lozano, R., Sánchez-Torres, S., Morales-Guadarrama, A., Fabela-Sánchez, O., & Salgado-Ceballos, H. (2015). Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 26(7), 209. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5541-0>
79. Morales-Guadarrama, A., Salgado-Ceballos, H., Grijalva, I., Morales-Corona, J., Hernández-Godínez, B., Ibáñez-Contreras, A., Ríos, C., Diaz-Ruiz, A., Cruz, G. J., Olayo, M. G., Sánchez-Torres, S., Mondragón-Lozano, R., Alvarez-Mejia, L., Fabela-Sánchez, O., & Olayo, R. (2022). Evolution of Spinal Cord Transection of Rhesus Monkey Implanted with Polymer Synthesized by Plasma Evaluated by Diffusion Tensor Imaging. *Polymers*, 14(5), 962. <https://doi.org/10.3390/polym14050962>
80. Sánchez-Torres, S., Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Olayo, M. G., Cruz, G. J., Olayo, R., Morales, J., Mondragón-Lozano, R., Fabela-Sánchez, O., Orozco-Barríos, C., Coyoy-Salgado, A., Orozco-Suárez, S., González-Ruiz, C., Álvarez-Mejía, L., Morales-Guadarrama, A., Buzoianu-Anguiano, V., Damián-Matsumura, P., & Salgado-Ceballos, H. (2020). Recovery of motor function after traumatic spinal cord injury by using plasma-synthesized polypyrrole/iodine application in combination with a mixed rehabilitation scheme. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(7). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06395-5>
81. Serratos, I. N., Olayo, R., Millán-Pacheco, C., Morales-Corona, J., Vicente-Escobar, J. O., Soto-Estrada, A. M., Córdoba-Herrera, J. G., Uribe, O., Gómez-Quintero, T., Arroyo-Ornelas, M. Á., & Godínez-Fernández, R. (2019). Modeling integrin and plasma-polymerized pyrrole interactions: chemical diversity relevance for cell regeneration. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43286-4>
82. Zuñiga-Aguilar, E. S. (2014). *Crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y motoneuronas de ratón en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
83. Osorio-Londoño, D. M., Godínez-Fernández, J. R., Acosta-García, M. C., Morales-Corona, J., Olayo-

- González, R., & Morales-Guadarrama, A. (2021). Pyrrole plasma polymer-coated electrospun scaffolds for neural tissue engineering. *Polymers*, *13*(22). <https://doi.org/10.3390/polym13223876>
84. Coyoy-Salgado, A., Orozco-Barríos, C., Sánchez-Torres, S., Olayo, M. G., Cruz, G. J., Morales-Corona, J., Olayo, R., Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Alvarez-Mejía, L., Mondragón-Lozano, R., Morales-Guadarrama, A., Alonso-García, A. L., Fabela-Sánchez, O., & Salgado-Ceballos, H. (2023). Gene expression and locomotor recovery in adult rats with spinal cord injury and plasma-synthesized polypyrrole/iodine application combined with a mixed rehabilitation scheme. *Frontiers in Neurology*, *14*, 1124245. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1124245>
  85. Benech, C. A., Tomatis, A., Perez, R., & Boido, B. (2020). Conventional treatments and surgical margins of maneuvering for spinal cord injury management. En *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies* (pp. 39–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00003-X>
  86. Cizkova, D., Murgoci, A. N., Cubinkova, V., Humenik, F., Mojzisova, Z., Maloveska, M., Cizek, M., Fournier, I., & Salzet, M. (2020). Spinal Cord Injury: Animal Models, Imaging Tools and the Treatment Strategies. *Neurochemical Research*, *45*(1), 134–143. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02800-w>
  87. Luo, S., Xu, H., Zuo, Y., Liu, X., & All, A. H. (2020). A Review of Functional Electrical Stimulation Treatment in Spinal Cord Injury. *NeuroMolecular Medicine*, 447–463. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08589-9>
  88. Vargas, M. E., & Barres, B. A. (2007). Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow? *Annual Review of Neuroscience*, *30*(1), 153–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094354>
  89. Papa, S., Vismara, I., & Veglianesi, P. (2020). Paracrine effects for spinal cord injury regeneration. En *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies* (pp. 203–221). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00011-9>
  90. Yiu, G., & He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(8), 617–627. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>
  91. Zhang, Q., Shi, B., Ding, J., Yan, L., Thawani, J. P., Fu, C., & Chen, X. (2019). Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. *Acta Biomaterialia*, *88*, 57–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.056>
  92. Koffler, J., Zhu, W., Qu, X., Platoshyn, O., Dulin, J. N., Brock, J., Graham, L., Lu, P., Sakamoto, J., Marsala, M., Chen, S., & Tuszynski, M. H. (2019). Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature Medicine*, *25*(2), 263–269. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0296-z>
  93. Theodore, N., Hlubek, R., Danielson, J., Neff, K., Vaickus, L., Ulich, T. R., & Ropper, A. E. (2016). First human implantation of a bioresorbable polymer scaffold for acute traumatic spinal cord injury: A clinical pilot study for safety and feasibility. *Neurosurgery*, *79*(2), E305–E312. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001283>
  94. Kim, K. D., Lee, K. S., Coric, D., Harrop, J. S., Theodore, N., & Toselli, R. M. (2022). Acute Implantation of a Bioresorbable Polymer Scaffold in Patients With Complete Thoracic Spinal Cord Injury: 24-Month Follow-up From the INSPIRE Study. *Neurosurgery*, *90*(6), 668–675. <https://doi.org/10.1227/neu.0000000000001932>
  95. Pertici, G. (2020). Elements of material science and polymeric biomaterials. En *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies* (pp. 77–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00006-5>
  96. Kubinová, Š. (2020). Biomaterials and Magnetic Stem Cell Delivery in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Neurochemical Research*, *45*(1), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02808-2>
  97. Guest, J. D., Moore, S. W., Aimetti, A. A., Kutikov, A. B., Santamaria, A. J., Hofstetter, C. P., Ropper, A. E., Theodore, N., Ulich, T. R., & Layer, R. T. (2018). Internal decompression of the acutely contused spinal cord: Differential effects of irrigation only versus biodegradable scaffold implantation. *Biomaterials*,

185, 284–300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.025>

98. Osorio-Londoño, D. M. (2019). *Desarrollo de un composito para reparación y regeneración de nervio periférico* [Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Maestría en Ingeniería Biomédica]. <https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/pk02c9813>
99. Osorio-Londoño, D., Godínez-Fernández, J. R., Acosta-García, M. C., Morales-Corona, J., & Olayo-González, R. (2020). Morphology and Viability of Nerve Cells Cultured on Plasma Polymerized Polypyrrole-Coated Scaffolds. En *IFMBE Proceedings* (Vol. 75, pp. 652–655). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30648-9\\_86](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30648-9_86)
100. Van der Meulen, A. (2014). *The effects of switching light-dark regime on the behavior of Wistar rats*. <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/289443>
101. Roedel, A., Storch, C., Holsboer, F., & Ohl, F. (2006). Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Laboratory Animals*, 40(4), 371–381. <https://doi.org/10.1258/002367706778476343>
102. Bertoglio, L. J., & Carobrez, A. P. (2002). Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*, 132(2), 135–143. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00396-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00396-5)
103. Vargas Miranda, B., Ambriz García, D., Navarro Maldonado, M. del C., Trejo Córdova, A., Rodríguez Esquivel, G., & González Vieira, M. del R. (2020). Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I. En *Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>
104. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999 1 (1999).
105. Kosenko, P. O., Smolikov, A. B., Voynov, V. B., Shaposhnikov, P. D., Saevskiy, A. I., & Kirov, V. N. (2020). Effect of xylazine–tiletamine–zolazepam on the local field potential of the rat olfactory bulb. *Comparative Medicine*, 70(6), 492–498. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-20-990015>
106. Sykes, M., Matheson, N. A., Brownjohn, P. W., Tang, A. D., Rodger, J., Shemmeii, J. B. H., & Reynolds, J. N. J. (2016). Differences in motor evoked potentials induced in rats by transcranial magnetic stimulation under two separate anesthetics: Implications for plasticity studies. *Frontiers in Neural Circuits*, 10(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00080>
107. RAT Research Animal Training. (2022). *Administration of Substances*. Training resources for animal research. <https://researchanimaltraining.com/article-categories/administration-of-substances/>
108. JoVE Science Education Database. (2022). *Compound Administration*. <https://www.jove.com/es/v/10198/compound-administration-i>
109. Waynforth, H. B., & Flecknell, P. A. (1992). *Experimental and Surgical Techniques in the Rat* (A. Press (Ed.); 2a ed.).
110. Ramsey, J. B. G., Ramer, L. M., Inskip, J. A., Alan, N., Ramer, M. S., & Krassioukov, A. V. (2010). Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 27(9), 1709–1722. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1382>
111. Carter, M. W., Johnson, K. M., Lee, J. Y., Hulsebosch, C. E., & Gwak, Y. S. (2016). Comparison of mechanical allodynia and recovery of locomotion and bladder function by different parameters of low thoracic spinal contusion injury in rats. *Korean Journal of Pain*, 29(2), 86–95. <https://doi.org/10.3344/kjp.2016.29.2.86>
112. Li, R., Huang, Z. C., Cui, H. Y., Huang, Z. P., Liu, J. H., Zhu, Q. A., & Hu, Y. (2021). Utility of somatosensory and motor-evoked potentials in reflecting gross and fine motor functions after unilateral cervical spinal

- cord contusion injury. *Neural Regeneration Research*, 16(7), 1323–1330. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301486>
113. Redondo-Castro, E., Navarro, X., & García-Alías, G. (2016). Longitudinal Evaluation of Residual Cortical and Subcortical Motor Evoked Potentials in Spinal Cord Injured Rats. *Journal of Neurotrauma*, 33(10), 907–916. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4140>
114. Cloud, B. A., Ball, B. G., Chen, B. K., Knight, A. M., Hakim, J. S., Ortiz, A. M., & Windebank, A. J. (2012). Hemisection spinal cord injury in rat: The value of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.08.024>
115. Lukovic, D., Moreno-Manzano, V., Lopez-Mocholi, E., Rodriguez-Jiménez, F. J., Jendelova, P., Sykova, E., Oria, M., Stojkovic, M., & Erceg, S. (2015). Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation. *Scientific Reports*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep09640>
116. Fehlings, M. G., Tator, C. H., Linden, R. D., & Piper, I. R. (1988). Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 69(1), 65–78. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(88\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(88)90036-3)
117. Fan, C., Li, X., Xiao, Z., Zhao, Y., Liang, H., Wang, B., Han, S., Li, X., Xu, B., Wang, N., Liu, S., Xue, W., & Dai, J. (2017). A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair. *Acta Biomaterialia*, 51, 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.009>
118. Diaz-Ruiz, A., Roldan-Valadez, E., Ortiz-Plata, A., Mondragón-Lozano, R., Heras-Romero, Y., Mendez-Armenta, M., Osorio-Rico, L., Nava-Ruiz, C., & Ríos, C. (2016). Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance image after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Brain Research*, 1646, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.023>
119. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. En *National Research Council* (8a ed.). National Academies Press (US). [https://doi.org/10.1163/1573-3912\\_islam\\_DUM\\_3825](https://doi.org/10.1163/1573-3912_islam_DUM_3825)
120. INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. (2013). *ICLAS Ethical Guideline for Researchers*. <https://iclas.org/guidelines-for-researchers/>
121. Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., & Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>
122. Talbot, S. R., Biernot, S., Bleich, A., van Dijk, R. M., Ernst, L., Häger, C., Helgers, S. O. A., Koegel, B., Koska, I., Kuhla, A., Miljanovic, N., Müller-Graff, F. T., Schwabe, K., Tolba, R., Vollmar, B., Weegh, N., Wölk, T., Wolf, F., Wree, A., ... Zechner, D. (2020). Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Laboratory Animals*, 54(1), 99–110. <https://doi.org/10.1177/0023677219883319>
123. Sharif-Alhoseini, M., Khormali, M., Rezaei, M., Safdarian, M., Hajighadery, A., Khalatbari, M. M., Safdarian, M., Meknatkhah, S., Rezvan, M., Chalangari, M., Derakhshan, P., & Rahimi-Movaghar, V. (2017). Animal models of spinal cord injury: A systematic review. *Spinal Cord*, 55(8), 714–721. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.187>
124. Lilley, E., Andrews, M. R., Bradbury, E. J., Elliott, H., Hawkins, P., Ichiyama, R. M., Keeley, J., Michael-Titus, A. T., Moon, L. D. F., Pluchino, S., Riddell, J., Ryder, K., & Yip, P. K. (2020). Refining rodent models of spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 328, 113273. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113273>

125. RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. [www.rstudio.com/](http://www.rstudio.com/)
126. Keshvardoostchokami, M., Majidi, S. S., Huo, P., Ramachandran, R., Chen, M., & Liu, B. (2021). Electrospun nanofibers of natural and synthetic polymers as artificial extracellular matrix for tissue engineering. *Nanomaterials*, *11*(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano11010021>
127. Saini, P., Arora, M., & Kumar, M. N. V. R. (2016). Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *107*, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>
128. Imani, F., Karimi-Soflou, R., Shabani, I., & Karkhaneh, A. (2021). PLA electrospun nanofibers modified with polypyrrole-grafted gelatin as bioactive electroconductive scaffold. *Polymer*, *218*, 123487. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123487>
129. Alves, C. M., Yang, Y., Marton, D., Carnes, D. L., Ong, J. L., Sylvia, V. L., Dean, D. D., Reis, R. L., & Agrawal, C. M. (2008). Plasma surface modification of poly(D,L-lactic acid) as a tool to enhance protein adsorption and the attachment of different cell types. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *87*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31068>
130. Baji, A., Mai, Y. W., Wong, S. C., Abtahi, M., & Chen, P. (2010). Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, *70*(5), 703–718. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.01.010>
131. Tanzi, M. C. (2017). Characterization of thermal properties and crystallinity of polymer biomaterials. *En Characterization of Polymeric Biomaterials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2012.05.151>
132. Wu, Y., Li, L., Chen, S., Qin, J., Chen, X., Zhou, D., & Wu, H. (2020). Synthesis, characterization, and crystallization behaviors of poly(D-lactic acid)-based triblock copolymer. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60458-9>
133. Vasquez-Ortega, M., Ortega, M., Morales, J., Olayo, M. G., Cruz, G. J., & Olayo, R. (2014). Core-shell polypyrrole nanoparticles obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. *Polymer International*, *63*(12), 2023–2029. <https://doi.org/10.1002/pi.4756>
134. Morales, J., Olayo, M. G., Cruz, G. J., & Olayo, R. (2002). Plasma polymerization of random polyaniline-polypyrrole-iodine copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, *85*(2), 263–270. <https://doi.org/10.1002/app.10565>
135. Jia, L., Zhang, W. C., Tong, B., & Yang, R. J. (2018). Crystallization, Mechanical and Flame-retardant Properties of Poly(lactic acid) Composites with DOPO and DOPO-POSS. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, *36*(7), 871–879. <https://doi.org/10.1007/s10118-018-2098-7>
136. Hara, S., Watanabe, S., Takahashi, K., Shimizu, S., & Ikake, H. (2018). Preparation of crystallites for oriented poly(Lactic Acid) films using a casting method under a magnetic field. *Polymers*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/polym10101083>
137. Qin, L., Qiu, J., Liu, M., Ding, S., Shao, L., Lü, S., Zhang, G., Zhao, Y., & Fu, X. (2011). Mechanical and thermal properties of poly(lactic acid) composites with rice straw fiber modified by poly(butyl acrylate). *Chemical Engineering Journal*, *166*(2), 772–778. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.039>
138. Zhou, C., Li, H., Zhang, W., Li, J., Huang, S., Meng, Y., De Claville Christiansen, J., Yu, D., Wu, Z., & Jiang, S. (2016). Thermal strain-induced cold crystallization of amorphous poly(lactic acid). *CrystEngComm*, *18*(18), 3237–3246. <https://doi.org/10.1039/c6ce00464d>
139. Zhang, J., Tashiro, K., Tsuji, H., & Domb, A. J. (2008). Disorder-to-order phase transition and multiple melting behavior of poly(L-lactide) investigated by simultaneous measurements of WAXD and DSC. *Macromolecules*, *41*(4), 1352–1357. <https://doi.org/10.1021/ma0706071>

140. Lins, L. C., Wianny, F., Livi, S., Dehay, C., Duchet-Rumeau, J., & Gérard, J. F. (2017). Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(8), 2376–2393. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33778>
141. Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*, 12(5), 1197–1211. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1197>
142. Sakthi Kumar, D., Nakamura, K., Nishiyama, S., Ishii, S., Noguchi, H., Kashiwagi, K., & Yoshida, Y. (2003). Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films. *Journal of Applied Physics*, 93(5), 2705–2711. <https://doi.org/10.1063/1.1542692>
143. Martín-Pat, G. E., Rodríguez-Fuentes, N., Cervantes-Uc, J. M., Rosales-Ibáñez, R., Carrillo-Escalante, H. J., Ku-Gonzalez, A. F., Avila-Ortega, A., & Hernandez-Sanchez, F. (2020). Effect of different exposure times on physicochemical, mechanical and biological properties of PGS scaffolds treated with plasma of iodine-doped polypyrrole. *Journal of Biomaterials Applications*, 35(4–5), 485–499. <https://doi.org/10.1177/0885328220941466>
144. Hamprecht, B. (1977). Structural, Electrophysiological, Biochemical, and Pharmacological Properties of Neuroblastoma-Glioma Cell Hybrids in Cell Culture. En *International Review of Cytology* (Vol. 49, Número C, pp. 99–170). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61948-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61948-8)
145. Israël, M., Lesbats, B., Synguelakis, M., & Joliot, A. (1994). Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15, glioma and neuroblastoma cells-role of a 16 kDa membrane protein in release. *Neurochemistry International*, 25(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)90029-9)
146. Molnar, P., & Hickman, J. J. (2014). Modeling of action potential generation in NG108-15 cells. *Methods in Molecular Biology*, 1183, 253–261. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0_16)
147. Tojima, T., Yamane, Y., Takahashi, M., & Ito, E. (2000). Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. *Neuroscience Research*, 37(2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00110-3)
148. Rezakhaniha, R., Aghianniotis, A., Schrauwen, J. T. C., Griffa, A., Sage, D., Bouten, C. V. C., Van De Vosse, F. N., Unser, M., & Stergiopoulos, N. (2012). Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(3–4), 461–473. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0325-z>
149. Sage, D. (s/f). *OrientationJ: A series of ImageJ plugins for directional image analysis*. Recuperado el 7 de mayo de 2023, de <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>
150. Stoddart, M. J. (Ed.). (2011). *Mammalian Cell Viability* (Vol. 740). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
151. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
152. Wickman, G. R., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., Zander, S. Al, Mleczak, A., Sumpton, D., Morrice, N., Bienvenut, W. V., & Olson, M. F. (2013). Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death and Differentiation*, 20(10), 1293–1305. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.69>
153. Tixeira, R., Caruso, S., Paone, S., Baxter, A. A., Atkin-Smith, G. K., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2017). Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis*, 22(3), 475–477. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1345-7>

154. KarbalaieMahdi, A., Shahrousvand, M., Javadi, H. R., Ghollasi, M., Norouz, F., Kamali, M., & Salimi, A. (2017). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells on polycaprolactone/gelatin bi-electrospun nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, *78*, 1195–1202. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.083>
155. Kubickova, J., Hudecova, S., Csaderova, L., Soltysova, A., Lichvarova, L., Lencesova, L., Babula, P., & Krizanova, O. (2016). Slow sulfide donor GYY4137 differentiates NG108-15 neuronal cells through different intracellular transporters than dbcAMP. *Neuroscience*, *325*, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.057>
156. Assoian, R. K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *Journal of Cell Biology*, *136*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.1.1>
157. Delcroix, G. J. R., Schiller, P. C., Benoit, J. P., & Montero-Menei, C. N. (2010). Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*, *31*(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.084>
158. Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, *110*(6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
159. Daud, M. F. B., Pawar, K. C., Claeysens, F., Ryan, A. J., & Haycock, J. W. (2012). An aligned 3D neuronal-glia co-culture model for peripheral nerve studies. *Biomaterials*, *33*(25), 5901–5913. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.008>
160. Chandra, J., Sheerin, F., Lopez De Heredia, L., Meagher, T., King, D., Belci, M., & Hughes, R. J. (2012). MRI in acute and subacute post-traumatic spinal cord injury: Pictorial review. *Spinal Cord*, *50*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1038/sc.2011.107>
161. De Winter, F., Oudega, M., Lankhorst, A. J., Hamers, F. P., Blits, B., Ruitenberg, M. J., Pasterkamp, R. J., Gispén, W. H., & Verhaagen, J. (2002). Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, *175*(1), 61–75. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7884>
162. Zhao, Y., Tang, F., Xiao, Z., Han, G., Wang, N., Yin, N., Chen, B., Jiang, X., Yun, C., Han, W., Zhao, C., Cheng, S., Zhang, S., & Dai, J. (2017). Clinical Study of NeuroRegen Scaffold Combined with Human Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Chronic Complete Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, *26*(5), 891–900. <https://doi.org/10.3727/096368917X695038>
163. Zhao, C., Rao, J. S., Duan, H., Hao, P., Shang, J., Fan, Y., Zhao, W., Gao, Y., Yang, Z., Sun, Y. E., & Li, X. (2022). Chronic spinal cord injury repair by NT3-chitosan only occurs after clearance of the lesion scar. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01010-1>
164. Estrada, V., Brazda, N., Schmitz, C., Heller, S., Blazyca, H., Martini, R., & Müller, H. W. (2014). Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation. *Neurobiology of Disease*, *67*, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.018>
165. Mondragón, R., Díaz, A., García, T., Salgado, H., Olayo, R., Morales, J., Cruz, G., Olayo, G., Alvarez, L., Morales, A., Escalona, A., Manjarrez, J., Mendez, M., & Ríos, C. (2007). Evaluación electrofisiológica del efecto de tres implantes poliméricos en la función nerviosa en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas. *IFMBE Proceedings*, *18*, 654–658. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74471-9\\_152](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74471-9_152)
166. Brazda, N., Estrada, V., Voss, C., Seide, K., Trieu, H. K., & Müller, H. W. (2016). Experimental Strategies to Bridge Large Tissue Gaps in the Injured Spinal Cord after Acute and Chronic Lesion. *Journal of Visualized Experiments*, *110*, 1–9. <https://doi.org/10.3791/53331>
167. Buzoianu-Anguiano, V., Rivera-Osorio, J., Orozco-Suárez, S., Vega-García, A., García-Vences, E., Sánchez-

- Torres, S., Jiménez-Estrada, I., Guizar-Sahagún, G., Mondragon-Caso, J., Fernández-Valverde, F., Madrazo, I., & Grijalva, I. (2020). Single vs. Combined Therapeutic Approaches in Rats With Chronic Spinal Cord Injury. *Frontiers in Neurology*, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00136>
168. Antri, M., Orsal, D., & Barthe, J. Y. (2002). Locomotor recovery in the chronic spinal rat: Effects of long-term treatment with a 5-HT<sub>2</sub> agonist. *European Journal of Neuroscience*, *16*(3), 467–476. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x>
169. Brown, A. R., & Martinez, M. (2019). Thoracic spinal cord hemisection surgery and open-field locomotor assessment in the rat. *Journal of Visualized Experiments*, *2019*(148), 2–7. <https://doi.org/10.3791/59738>
170. Jacobs, B. Y., Lakes, E. H., Reiter, A. J., Lake, S. P., Ham, T. R., Leipzig, N. D., Porvasnik, S. L., Schmidt, C. E., Wachs, R. A., & Allen, K. D. (2018). The Open Source GAITOR Suite for Rodent Gait Analysis. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28134-1>
171. Grabovskaya, S. V., & Salyha, Y. T. (2014). Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? *Neurophysiology*, *46*(4), 376–380. <https://doi.org/10.1007/s11062-014-9458-x>
172. Han, Q., Jin, W., Xiao, Z., Ni, H., Wang, J., Kong, J., Wu, J., Liang, W., Chen, L., Zhao, Y., Chen, B., & Dai, J. (2010). The promotion of neural regeneration in an extreme rat spinal cord injury model using a collagen scaffold containing a collagen binding neuroprotective protein and an EGFR neutralizing antibody. *Biomaterials*, *31*(35), 9212–9220. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.040>
173. All, A. H., Al Nashash, H., Mir, H., Luo, S., & Liu, X. (2020). Characterization of transection spinal cord injuries by monitoring somatosensory evoked potentials and motor behavior. *Brain Research Bulletin*, *156*, 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.12.012>
174. Iyer, S., Maybhate, A., Presacco, A., & All, A. H. (2010). Multi-limb acquisition of motor evoked potentials and its application in spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Methods*, *193*(2), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.017>
175. Bertels, H., Vicente-Ortiz, G., El Kanbi, K., & Takeoka, A. (2022). Neurotransmitter phenotype switching by spinal excitatory interneurons regulates locomotor recovery after spinal cord injury. *Nature Neuroscience*, *25*(5), 617–629. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01067-9>
176. Hamming, N., & Lovely, D. F. (2007). Influence of recording instrumentation on the stimulus artifact tail in the surface acquisition of somatosensory evoked potentials. *Medical Engineering and Physics*, *29*(1), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2005.12.004>
177. Liu, J., Li, S., Li, X., Klein, C., Rymer, W. Z., & Zhou, P. (2014). Suppression of stimulus artifact contaminating electrically evoked electromyography. *NeuroRehabilitation*, *34*(2), 381–389. <https://doi.org/10.3233/NRE-131045>
178. Nikolov, P., Hassan, S. S., Schnitzler, A., & Groiss, S. J. (2021). Influence of High Pass Filter Settings on Motor Evoked Potentials. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.665258>
179. Toleikis, J. R. (2005). Intraoperative monitoring using somatosensory evoked potentials. A position statement by the American Society of Neurophysiological Monitoring. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, *19*(3), 241–258. <https://doi.org/10.1007/s10877-005-4397-0>
180. Barbosa, M. O., Cristante, A. F., dos Santos, G. B., Ferreira, R., Marcon, R. M., & de Barros Filho, T. E. P. (2014). Neuroprotective effect of epidural hypothermia after spinal cord lesion in rats. *Clinics*, *69*(8), 559–564. [https://doi.org/10.6061/clinics/2014\(08\)10](https://doi.org/10.6061/clinics/2014(08)10)
181. Wang, H., Sorenson, E. J., Spinner, R. J., & Windebank, A. J. (2008). Electrophysiologic findings and grip strength after nerve injuries in the rat forelimb. *Muscle and Nerve*, *38*(4), 1254–1265. <https://doi.org/10.1002/mus.20971>

182. Hayton, S. M., Kriss, A., & Muller, D. P. R. (1999). Comparison of the effects of four anaesthetic agents on somatosensory evoked potentials in the rat. *Laboratory Animals*, 33(3), 243–251. <https://doi.org/10.1258/002367799780578219>
183. Huang, Z., Li, R., Liu, J., Huang, Z., Hu, Y., Wu, X., & Zhu, Q. (2018). Longitudinal electrophysiological changes after cervical hemi-contusion spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters*, 664, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.019>
184. Bazley, F. A., Hu, C., Maybhate, A., Pourmorteza, A., Pashai, N., Thakor, N. V., Kerr, C. L., & All, A. H. (2012). Electrophysiological evaluation of sensory and motor pathways after incomplete unilateral spinal cord contusion: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 16(4), 414–423. <https://doi.org/10.3171/2012.1.SPINE11684>
185. Nijhuis, T. H. J., de Boer, S. A. S., Wahegaonkar, A. L., Bishop, A. T., Shin, A. Y., Hovius, S. E. R., & Selles, R. W. (2013). A New Approach to Assess the Gastrocnemius Muscle Volume in Rodents Using Ultrasound; Comparison with the Gastrocnemius Muscle Index. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054041>
186. Li, R., Hettlinger, P. C., Machol, J. A., Liu, X., Stephenson, J. B., Pawela, C. P., Yan, J. G., Matloub, H. S., & Hyde, J. S. (2013). Cortical plasticity induced by different degrees of peripheral nerve injuries: A rat functional magnetic resonance imaging study under 9.4 Tesla. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1749-7221-8-4>
187. Hua, Y., Lovely, D. F., & Doraiswami, R. (2006). Factors affecting the stimulus artifact tail in surface-recorded somatosensory-evoked potentials. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 44(3), 226–241. <https://doi.org/10.1007/s11517-006-0034-4>
188. Webb, A. (2003). *Introduction to Biomedical Imaging*. Wiley & Sons. <https://intro-biomedical-imaging.weebly.com/episode-3---ultrasound.html>
189. Zimny, A., Neska-Matuszewska, M., Bladowska, J., & Szażadek, M. J. (2015). Intracranial lesions with low signal intensity on T2-weighted MR images - review of pathologies. *Polish Journal of Radiology*, 80(1), 40–50. <https://doi.org/10.12659/PJR.892146>
190. Martin, A. R., Aleksanderek, I., Cohen-Adad, J., Tarmohamed, Z., Tetreault, L., Smith, N., Cadotte, D. W., Crawley, A., Ginsberg, H., Mikulis, D. J., & Fehlings, M. G. (2016). Translating state-of-the-art spinal cord MRI techniques to clinical use: A systematic review of clinical studies utilizing DTI, MT, MWF, MRS, and fMRI. *NeuroImage: Clinical*, 10, 192–238. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.11.019>
191. Hendrix, P., Griessenauer, C. J., Cohen-Adad, J., Rajasekaran, S., Cauley, K. A., Shoja, M. M., Pezeshk, P., & Tubbs, R. S. (2015). Spinal diffusion tensor imaging: A comprehensive review with emphasis on spinal cord anatomy and clinical applications. *Clinical Anatomy*, 28(1), 88–95. <https://doi.org/10.1002/ca.22349>
192. Morales-Guadarrama, A., Salgado-Ceballos, H., Morales, J., Ríos, C., Cruz, G. J., Diaz-Ruiz, A., Olayo, M. G., Alvarez-Mejia, L., Mondragón-Lozano, R., & Olayo, R. (2013). CAT and MRI studies of spinal cord injured rats implanted with PPy/I. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 34(2), 145–155.
193. Mukherjee, P., Berman, J. I., Chung, S. W., Hess, C. P., & Henry, R. G. (2008). Diffusion tensor MR imaging and fiber tractography: Theoretic underpinnings. *American Journal of Neuroradiology*, 29(4), 632–641. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1051>
194. Qian, J., Herrera, J. J., & Narayana, P. A. (2010). Neuronal and axonal degeneration in experimental spinal cord injury: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy and histology. *Journal of Neurotrauma*, 27(3), 599–610. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1145>
195. Londoño, A., Arbeláez, A., & Ascencio, J. L. (2006). Aplicación de la espectroscopia por resonancia

- magnética en el estudio de las enfermedades del sistema nervioso central. *Acta Neurolo Colomb*, 22(1), 42–54.
196. de Graaf, R. A. (2007). In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques. En *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques: 2nd Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780470512968>
  197. Faghihi, R., Zeinali-Rafsanjani, B., Mosleh-Shirazi, M. A., Saeedi-Moghadam, M., Lotfi, M., Jalli, R., & Irvani, V. (2017). Magnetic Resonance Spectroscopy and its Clinical Applications: A Review. *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences*, 48(3), 233–253. <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2017.06.004>
  198. Cecil, K. M. (2013). Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Technique for the Neuroradiologist. *Neuroimaging Clinics of North America*, 23(3), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2012.10.003>
  199. Bell, T., Boudes, E. S., Loo, R. S., Barker, G. J., Lythgoe, D. J., Edden, R. A. E., Lebel, R. M., Wilson, M., & Harris, A. D. (2021). In vivo Glx and Glu measurements from GABA-edited MRS at 3 T. *NMR in Biomedicine*, 34(5), 139–148. <https://doi.org/10.1002/nbm.4245>
  200. Moffett, J., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C., & Namboodiri, A. (2007). N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in Neurobiology*, 81(2), 89–131. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.12.003>
  201. Guo, J., Yao, C., Chen, H., Zhuang, D., Tang, W., Ren, G., Wang, Y., Wu, J., Huang, F., & Zhou, L. (2012). The relationship between Cho/NAA and glioma metabolism: Implementation for margin delineation of cerebral gliomas. *Acta Neurochirurgica*, 154(8), 1361–1370. <https://doi.org/10.1007/s00701-012-1418-x>
  202. Erschbamer, M., Öberg, J., Westman, E., Sitnikov, R., Olson, L., & Spenger, C. (2011). 1H-MRS in spinal cord injury: Acute and chronic metabolite alterations in rat brain and lumbar spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 33(4), 678–688. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07562.x>
  203. Cianfoni, A., Law, M., Re, T. J., Dubowitz, D. J., Rumboldt, Z., & Imbesi, S. G. (2011). Clinical pitfalls related to short and long echo times in cerebral MR spectroscopy. *Journal of Neuroradiology*, 38(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2010.10.001>
  204. Yeh, F.-C., Verstynen, T. D., Wang, Y., Fernández-Miranda, J. C., & Tseng, W.-Y. I. (2013). Deterministic Diffusion Fiber Tracking Improved by Quantitative Anisotropy. *PLoS ONE*, 8(11), e80713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080713>
  205. Yeh, F. C., Panesar, S., Barrios, J., Fernandes, D., Abhinav, K., Meola, A., & Fernandez-Miranda, J. C. (2019). Automatic Removal of False Connections in Diffusion MRI Tractography Using Topology-Informed Pruning (TIP). *Neurotherapeutics*, 16(1), 52–58. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0663-y>
  206. Koh, D. M., & Thoeny, H. C. (Eds.). (2010). *Diffusion-Weighted MR Imaging*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78576-7>
  207. Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*, 4(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
  208. Figley, C. R., Uddin, M. N., Wong, K., Kornelsen, J., Puig, J., & Figley, T. D. (2022). Potential Pitfalls of Using Fractional Anisotropy, Axial Diffusivity, and Radial Diffusivity as Biomarkers of Cerebral White Matter Microstructure. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 799576. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.799576>
  209. Henning, A., Schär, M., Kollias, S. S., Boesiger, P., & Dydak, U. (2008). Quantitative magnetic resonance spectroscopy in the entire human cervical spinal cord and beyond at 3T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 59(6), 1250–1258. <https://doi.org/10.1002/mrm.21578>
  210. Ciccarelli, O., Wheeler-Kingshott, C. A., McLean, M. A., Cercignani, M., Wimpey, K., Miller, D. H., & Thompson, A. J. (2007). Spinal cord spectroscopy and diffusion-based tractography to assess acute

- disability in multiple sclerosis. *Brain*, 130(8), 2220–2231. <https://doi.org/10.1093/brain/awm152>
211. Marliani, A. F., Clementi, V., Albini-Riccioli, L., Agati, R., & Leonardi, M. (2007). Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the human cervical spinal cord at 3 tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*, 57(1), 160–163. <https://doi.org/10.1002/mrm.21113>
  212. Banaszek, A., Bladowska, J., Szewczyk, P., Podgórski, P., & Sąsiadek, M. (2014). Usefulness of diffusion tensor MR imaging in the assessment of intramedullary changes of the cervical spinal cord in different stages of degenerative spine disease. *European Spine Journal*, 23(7), 1523–1530. <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3323-x>
  213. Kendall, G. S., Melbourne, A., Johnson, S., Price, D., Bainbridge, A., Gunny, R., Huertas-Ceballos, A., Cady, E. B., Ourselin, S., Marlow, N., & Robertson, N. J. (2014). White matter NAA/Cho and Cho/Cr ratios at MR spectroscopy are predictive of motor outcome in preterm infants. *Radiology*, 271(1), 230–238. <https://doi.org/10.1148/radiol.13122679>
  214. Cui, Y., Zeng, W., Jiang, H., Ren, X., Lin, S., Fan, Y., Liu, Y., & Zhao, J. (2020). Higher Cho/NAA Ratio in Postoperative Peritumoral Edema Zone Is Associated With Earlier Recurrence of Glioblastoma. *Frontiers in Neurology*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.592155>
  215. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2002). *Texto Atlas de Histología* (2a ed., Vol. 4, Número 1). McGraw-Hill Interamericana.
  216. De Biase, D., & Paciello, O. (2015). Essential and current methods for a practical approach to comparative neuropathology. *Folia Morphologica (Poland)*, 74(2), 137–149. <https://doi.org/10.5603/FM.2015.0024>
  217. Sun, G. dong, Chen, Y., Zhou, Z. gang, Yang, S. xian, Zhong, C., & Li, Z. zhong. (2017). A progressive compression model of thoracic spinal cord injury in mice: Function assessment and pathological changes in spinal cord. *Neural Regeneration Research*, 12(8), 1365–1374. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.213693>
  218. NCBI (NIH). (2023). *MAP2 microtubule associated protein 2*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4133>
  219. Heras-Romero, Y., Morales-Guadarrama, A., Santana-Martínez, R., Ponce, I., Rincón-Heredia, R., Poot-Hernández, A. C., Martínez-Moreno, A., Urrieta, E., Bernal-Vicente, B. N., Campero-Romero, A. N., Moreno-Castilla, P., Greig, N. H., Escobar, M. L., Concha, L., & Tovar-y-Romo, L. B. (2021). Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles. *Molecular Therapy*, 30(2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>
  220. Amemori, T., Ruzicka, J., Romanyuk, N., Jhanwar-Uniyal, M., Sykova, E., & Jendelova, P. (2015). Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0255-2>
  221. Zink, D., Sadoni, N., & Stelzer, E. (2003). Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*, 29(1), 42–50. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00289-X)
  222. Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
  223. Fedorova, J., Kelleroval, E., Bimbova, K., & Pavel, J. (2022). The Histopathology of Severe Graded Compression in Lower Thoracic Spinal Cord Segment of Rat, Evaluated at Late Post-injury Phase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(1), 173–193. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01139-7>
  224. Yang, P., Zhang, J., & Guo, Y. (2009). Synthesis of intrinsic fluorescent polypyrrole nanoparticles by atmospheric pressure plasma polymerization. *Applied Surface Science*, 255(15), 6924–6929. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.03.016>

225. Hou, S., & Rabchevsky, A. G. (2014). Autonomic consequences of spinal cord injury. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1419–1453. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130045>
226. Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1996). Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight-Drop Device versus Transection. *Experimental Neurology*, 139(2), 244–256. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0098>
227. Rowald, A., Komi, S., Demesmaeker, R., Baaklini, E., Hernandez-Charpak, S. D., Paoles, E., Montanaro, H., Cassara, A., Becce, F., Lloyd, B., Newton, T., Ravier, J., Kinany, N., D’Ercole, M., Paley, A., Hankov, N., Varescon, C., McCracken, L., Vat, M., ... Courtine, G. (2022). Activity-dependent spinal cord neuromodulation rapidly restores trunk and leg motor functions after complete paralysis. *Nature Medicine*, 28(2), 260–271. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01663-5>
228. Estrada, V., Krebbers, J., Voss, C., Brazda, N., Blazycza, H., Illgen, J., Seide, K., Jürgens, C., Müller, J., Martini, R., Trieu, H. K., & Müller, H. W. (2018). Low-pressure micro-mechanical re-adaptation device sustainably and effectively improves locomotor recovery from complete spinal cord injury. *Communications Biology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0210-8>
229. Krassioukov, A., & Elliott, S. (2017). Neural control and physiology of sexual function: Effect of spinal cord injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1310/sci2301-1>
230. Keirstead, H. S., Fedulov, V., Cloutier, F., Steward, O., & Duel, B. P. (2005). A noninvasive ultrasonographic method to evaluate bladder function recovery in spinal cord injured rats. *Experimental Neurology*, 194(1), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.027>
231. Wirth, F., Schempf, G., Stein, G., Wellmann, K., Manthou, M., Scholl, C., Sidorenko, M., Semler, O., Eisel, L., Harrach, R., Angelova, S., Jaminet, P., Ankerne, J., Ashrafi, M., Ozsoy, O., Ozsoy, U., Schubert, H., Abdulla, D., Dunlop, S. A., ... Schönau, E. (2013). Whole-body vibration improves functional recovery in spinal cord injured rats. *Journal of Neurotrauma*, 30(6), 453–468. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2653>
232. Leung, P. Y., Johnson, C. S., & Wrathall, J. R. (2007). Comparison of the effects of complete and incomplete spinal cord injury on lower urinary tract function as evaluated in unanesthetized rats. *Experimental Neurology*, 208(1), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.07.013>
233. Lee, Y. S., Lin, C. Y., Jiang, H. H., Depaul, M., Lin, V. W., & Silver, J. (2013). Nerve regeneration restores supraspinal control of bladder function after complete spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10591–10606. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1116-12.2013>
234. Breyer, B. N., Fandel, T. M., Alwaal, A., Osterberg, E. C., Shindel, A. W., Lin, G., Tanagho, E. A., & Lue, T. F. (2017). Comparison of spinal cord contusion and transection: functional and histological changes in the rat urinary bladder. *BJU International*, 119(2), 333–341. <https://doi.org/10.1111/bju.13591>
235. Vedantam, A., Jirjis, M. B., Schmit, B. D., Wang, M. C., Ulmer, J. L., & Kurpad, S. N. (2014). Diffusion Tensor Imaging of the Spinal Cord: Insights From Animal and Human Studies. *Neurosurgery*, 74(1), 1–8. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000171>
236. Elshafiey, I., Bilgen, M., He, R., & Narayana, P. A. (2002). In vivo diffusion tensor imaging of rat spinal cord at 7 T. *Magnetic Resonance Imaging*, 20(3), 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(02\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(02)00493-9)
237. Mondragon-Lozano, R., Diaz-Ruiz, A., Ríos, C., Olayo Gonzalez, R., Favila, R., Salgado-Ceballos, H., & Roldan-Valadez, E. (2013). Feasibility of in vivo quantitative magnetic resonance imaging with diffusion weighted imaging, T2-weighted relaxometry, and diffusion tensor imaging in a clinical 3 tesla magnetic resonance scanner for the acute traumatic spinal cord injury of rats. *Spine*, 38(20), E1242-9. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31829ef69c>
238. Auriat, A. M., Borich, M. R., Snow, N. J., Wadden, K. P., & Boyd, L. A. (2015). Comparing a diffusion tensor

and non-tensor approach to white matter fiber tractography in chronic stroke. *NeuroImage: Clinical*, 7, 771–781. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.03.007>

239. De Groot, M., Ikram, M. A., Akoudad, S., Krestin, G. P., Hofman, A., Van Der Lugt, A., Niessen, W. J., & Vernooij, M. W. (2015). Tract-specific white matter degeneration in aging: The Rotterdam Study. *Alzheimer's and Dementia*, 11(3), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.011>
240. Kang, X., Coetzee, J. P., Main, K. L., Seenivasan, S., Zhu, K., & Adamson, M. M. (2021). Fiber tract integrity in patients with brain injury and chronic health symptoms. *Neuroimage: Reports*, 1(4), 100047. <https://doi.org/10.1016/j.ynirp.2021.100047>
241. Rajasekaran, S., Kanna, R. M., Shetty, A. P., & Ilyaraja, V. (2012). Efficacy of diffusion tensor anisotropy indices and tractography in assessing the extent of severity of spinal cord injury: An in vitro analytical study in calf spinal cords. *Spine Journal*, 12(12), 1147–1153. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.10.032>
242. Zhao, C., Rao, J. S., Pei, X. J., Lei, J. F., Wang, Z. J., Zhao, W., Wei, R. H., Yang, Z. Y., & Li, X. G. (2018). Diffusion tensor imaging of spinal cord parenchyma lesion in rat with chronic spinal cord injury. *Magnetic Resonance Imaging*, 47, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2017.11.009>
243. Yang, T., Dai, Y. J., Chen, G., & Cui, S. Sen. (2020). Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00078>
244. Yu, G. L., Zhang, Y., & Ning, B. (2021). Reactive Astrocytes in Central Nervous System Injury: Subgroup and Potential Therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.792764>
245. Vipin, A., Thow, X. Y., Mir, H., Kortelainen, J., Manivannan, J., Al-Nashash, H., & All, A. H. (2016). Natural Progression of Spinal Cord Transection Injury and Reorganization of Neural Pathways. *Journal of Neurotrauma*, 33(24), 2191–2201. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4383>
246. Aguilar, J., Humanes-Valera, D., Alonso-Calviño, E., Yague, J. G., Moxon, K. A., Oliviero, A., & Foffani, G. (2010). Spinal cord injury immediately changes the state of the brain. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7528–7537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-10.2010>
247. Tao-Cheng, J. H., Crocker, V., Moreira, S. L., & Azzam, R. (2021). Optimization of protocols for pre-embedding immunogold electron microscopy of neurons in cell cultures and brains. *Molecular Brain*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00799-2>
248. Murtey, M. Das. (2016). Immunogold Techniques in Electron Microscopy. En *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences* (p. 19). InTech. <https://doi.org/10.5772/61719>
249. High-Resolution Imaging of Cellular Proteins. (2016). En S. D. Schwartzbach, O. Skalli, & T. Schikorski (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1474). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2>
250. Zare, E. N., Agarwal, T., Zarepour, A., Pinelli, F., Zarrabi, A., Rossi, F., Ashrafizadeh, M., Maleki, A., Shahbazi, M. A., Maiti, T. K., Varma, R. S., Tay, F. R., Hamblin, M. R., Mattoli, V., & Makvandi, P. (2021). Electroconductive multi-functional polypyrrole composites for biomedical applications. *Applied Materials Today*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101117>
251. Hsu, C. F., Peng, H., Basle, C., Travas-Sejdic, J., & Kilmartin, P. A. (2011). ABTS•+ scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Polymer International*, 60(1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/pi.2912>
252. Abbas, W. A., Ibrahim, M. E., El-Naggar, M., Abass, W. A., Abdullah, I. H., Awad, B. I., & Allam, N. K. (2020). Recent Advances in the Regenerative Approaches for Traumatic Spinal Cord Injury: Materials

- Perspective. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(12), 6490–6509. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c01074>
253. Nishiyama, A., Suzuki, R., & Zhu, X. (2014). NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00133>
254. Tai, W., Wu, W., Wang, L. L., Ni, H., Chen, C., Yang, J., Zang, T., Zou, Y., Xu, X. M., & Zhang, C. L. (2021). In vivo reprogramming of NG2 glia enables adult neurogenesis and functional recovery following spinal cord injury. *Cell Stem Cell*, 28(5), 923–937.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.009>
255. Du, B. L., Zeng, C. G., Zhang, W., Quan, D. P., Ling, E. A., & Zeng, Y. S. (2014). A comparative study of gelatin sponge scaffolds and PLGA scaffolds transplanted to completely transected spinal cord of rat. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(6), 1715–1725. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34835>
256. Li, X., Liu, D., Xiao, Z., Zhao, Y., Han, S., Chen, B., & Dai, J. (2019). Scaffold-facilitated locomotor improvement post complete spinal cord injury: Motor axon regeneration versus endogenous neuronal relay formation. *Biomaterials*, 197, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.012>
257. Wang, Y., & Yuan, H. (2022). Research progress of endogenous neural stem cells in spinal cord injury. *Ibrain*, 8(2), 199–209. <https://doi.org/10.1002/ibra.12048>
258. Decimo, I., Bifari, F., Rodriguez, F. J., Malpeli, G., Dolci, S., Lavarini, V., Pretto, S., Vasquez, S., Sciancalepore, M., Montalbano, A., Berton, V., Krampera, M., & Fumagalli, G. (2011). Nestin-and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction. *Stem Cells*, 29(12), 2062–2076. <https://doi.org/10.1002/stem.766>
259. Hayakawa, K., Snyder, E. Y., & Lo, E. H. (2021). Meningeal Multipotent Cells: A Hidden Target for CNS Repair? *NeuroMolecular Medicine*, 23(3), 339–343. <https://doi.org/10.1007/s12017-021-08663-1>
260. Velmurugan, B. K., Bharathi Priya, L., Poornima, P., Lee, L. J., & Baskaran, R. (2019). Biomaterial aided differentiation and maturation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8443–8454. <https://doi.org/10.1002/jcp.27769>
261. Tomaskovic-Crook, E., Gu, Q., Rahim, S. N. A., Wallace, G. G., & Crook, J. M. (2020). Conducting Polymer Mediated Electrical Stimulation Induces Multilineage Differentiation with Robust Neuronal Fate Determination of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, 9(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells9030658>
262. Costa, P., Bruno, A., Bonzanino, M., Massaro, F., Caruso, L., Vincenzo, I., Ciaramitaro, P., & Montalenti, E. (2007). Somatosensory- and motor-evoked potential monitoring during spine and spinal cord surgery. *Spinal Cord*, 45(1), 86–91. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101934>
263. Vogelaar, C. F., & Estrada, V. (2016). Experimental Spinal Cord Injury Models in Rodents: Anatomical Correlations and Assessment of Motor Recovery. *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*, 3–36. <https://doi.org/10.5772/62947>
264. Xu, X. M. (1999). Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 11(5), 1723–1740. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00591.x>
265. Kim, K. D., & Wright, N. M. (2011). Polyethylene glycol hydrogel spinal sealant (DuraSeal spinal sealant) as an adjunct to sutured dural repair in the spine: Results of a prospective, multicenter, randomized controlled study. *Spine*, 36(23), 1906–1912. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181fdb4db>
266. Kinaci, A., Algra, A., Heuts, S., O'Donnell, D., van der Zwan, A., & van Doormaal, T. (2018). Effectiveness of Dural Sealants in Prevention of Cerebrospinal Fluid Leakage After Craniotomy: A Systematic Review. *World Neurosurgery*, 118, 368–376.e1. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.06.196>

## Anexos

### Escala BBB para la evaluación de la locomoción en ratas

Tabla 5. Escala de Basso, Beattie, Bresnahan: 21 puntos con definiciones operativas de categorías y atributos para evaluar la locomoción de las ratas <sup>18</sup>.

0	No se observan movimientos de las patas posteriores (PP)
1	Movimiento leve de una o dos articulaciones
2	Movimiento amplio de una articulación o Movimiento amplio de una articulación y movimiento leve de otra
3	Movimiento amplio de dos articulaciones
4	Movimiento leve de las tres articulaciones de la PP
5	Movimiento leve de dos articulaciones y movimiento amplio de la tercera
6	Movimiento amplio de dos articulaciones y movimiento leve de la tercera
7	Movimiento amplio de las tres articulaciones de la PP
8	Barrido sin soporte del peso corporal o Posicionamiento plantar de la pata sin soporte del peso corporal
9	Posicionamiento plantar de la pata con soporte del peso corporal en estacionario Pasos dorsales con soporte del peso corporal ocasionales, frecuentes o consistentes, sin apoyo de la planta
10	Pasos plantares con soporte del peso corporal ocasionales, sin coordinación de patas delanteras (PD) y PP
11	Pasos plantares con soporte del peso corporal frecuentes a consistentes, sin coordinación de PD y PP
12	Pasos plantares con soporte del peso corporal frecuentes a consistentes, con coordinación ocasional de PD y PP
13	Pasos plantares con soporte del peso corporal frecuentes a consistentes, con coordinación frecuente de PD y PP
14	Pasos plantares con soporte del peso corporal consistentes, coordinación consistente de PD y PP y posición de la pata es predominantemente rotada (interna o externa) cuando hace contacto inicial con la superficie y antes de levantarla o Pasos plantares frecuentes, coordinación de PD y PP consistente y pasos dorsales ocasionales
15	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP sin separación de los dedos o separación de dedos ocasional mientras avanza; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial
16	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos frecuente mientras avanza; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial y rotada al levantarla
17	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos frecuente mientras avanza; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial y al levantarla

18	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos consistente mientras avanza; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial y rotada al levantarla
19	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos consistente mientras avanza; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial y al levantarla; la cola está abajo parte o todo el tiempo
20	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos consistente; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial y al levantarla; cola levantada consistentemente, inestabilidad del tronco
21	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente de PD y PP, separación de los dedos consistente; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo; cola levantada consistentemente, estabilidad del tronco consistente

**Ocasional** ≤50%, **Frecuente** 51-94%, **Consistente** 95-100%.

**Sin soporte del peso corporal:** los músculos extensores de la pata trasera no se contraen durante el posicionamiento plantar; o no hay elevación de los cuartos traseros.

**Soporte del peso corporal:** contracción de los músculos extensores de la pata trasera durante el posicionamiento plantar, o elevación de los cuartos traseros.

**Barrido:** movimiento rítmico de la pata trasera donde las tres articulaciones están extendidas, luego totalmente flexionadas y extendidas nuevamente; el animal está usualmente recostado de lado, la planta de la pata puede o no hacer contacto con el suelo; sin evidencia de soporte del peso por la pata trasera.

**Pisada plantar:** la planta de la pata está en contacto con el suelo con soporte del peso, luego la pata avanza y se reestablece el contacto plantar con soporte del peso.

**Pisada dorsal:** el peso esta soportado por el dorso de la pata en algún punto de la pisada.

**Coordinación FL-HL:** entre las patas frontales y traseras; implica que, para cada paso de la frontal, realiza uno de la trasera y alternando.

**Inestabilidad del tronco:** cambios de peso laterales que causan balanceo de lado a lado al caminar o un colapso parcial del tronco.

## Parámetros adicionales de las secuencias de RM

FOV: field of view (campo de visión). Espacio físico de adquisición de las imágenes.

SNR: signal to noise ratio (relación señal a ruido). Medida de la proporción de la potencia de la señal deseada respecto al ruido.

TE y TR: tiempo de eco y tiempo de repetición. Tiempos que transcurren entre aplicaciones de pulsos de RF.

Gap: espacio entre rebanadas.

SAR: specific absorption rate (tasa de absorción específica). Medida de la potencia del campo de radiofrecuencia que se deposita en determinado tejido.

PNS: peripheral nerve stimulation (estimulación de nervios periféricos). Efecto asociado a la aplicación de los gradientes.

### **T1W 3D TFE\_ref: Secuencia *Turbo Field Echo*, ponderada en T1, 3D basada en coronal.**

Coronal		FH(freq)	AP(phase)	RL
Duración 16:03min	FOV	246	x 246	mm x 56 mm
SNR 1	Voxel	0.8	x 0.8	mm x 0.8 mm
TE 4.6 ms	Matriz	384	x 384	x 140 cortes
TR 9.9 ms				Gap -0.4 mm
SAR 0.0 W/Kg	NSA	7		
PNS 48%				

### **T2W\_TSE: *Turbo Spin Echo* ponderada en T2.**

Sagital		FH(freq)	AP(fase)	RL
Duración 10:06 min	FOV	230	x 230	mm x 48 mm
SNR 1	Voxel	0.6	x 0.6	mm x 2 mm
TE 80 ms	Matriz	512	x 512	x 24 cortes
TR 3000 ms				Gap 0 mm
SAR <0.1 W/Kg	NSA	4		
PNS 20%				

### DTI high iso 32chS

Transversal			FH(freq)		AP(fase)		RL
Duración	13:40 min	FOV	224	x	224	mm x	30 mm
SNR	0.99	Voxel	1.5	x	1.5	mm x	1.5 mm
TE	84 ms	Matriz	160	x	160	x	20 cortes
TR	2521ms					Gap	0 mm
SAR	<0.1 W/Kg	NSA	9				
PNS	66%						

### PRESS: Secuencia Point-resolved spectroscopy

Transversal			FH(freq)		AP(fase)		RL
Duración	5:44 min	FOV	5	x	5	mm x	5 mm
NSA	32	Voxel	5	x	1	mm x	5 mm
TE	144 ms						
TR	2000 ms						

## Preparación de soluciones para perfusión e inmunofluorescencia

Esta técnica se realizó gracias a la colaboración con la Dra. Yessica Heras y la Quim. Cristina Aranda, en los laboratorios del departamento de Neuropatología molecular del Instituto de Fisiología Celular - UNAM.

### Materiales y reactivos

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>	<b>Instrumental</b>
1. Agua destilada/desionizada	1. Campana de extracción	1. 2 moscas magnéticas
2. Fosfato de sodio monobásico monohidratado (PB)	2. Refrigerador 4°C	2. Matraz aforado 1 L
3. Fosfato de sodio dibásico heptahidratado o fosfato de sodio dibásico anhidro (PB)	3. Agitador magnético con parrilla de calor	3. Probeta 1 L
4. PFA	4. Báscula	4. Vasos vidrio de 1 L
5. Sacarosa	5. Microondas	5. Termómetro
6. NaCl		6. Envases con tapa
7. Tiras reactivas pH (PFA)		
8. Lentejas de NaOH (PFA)		
9. Tris base (TBS)		
10. HCl (TBS)		
11. PBS (inmuno)		

### Metodología

#### *PFA 4%*

##### **Preparación 1 L PFA 4%**

1. Pesar 40g PFA
2. Calentar 500 ml de agua destilada (60°C máx.)
3. En la campana de extracción, agregar el PFA al agua y mezclar magnéticamente
4. Agregar un cuarto de lenteja de NaOH, e ir agregando poco a poco de ser necesario hasta que la solución se vuelva transparente. Es importante no exceder la cantidad para no aumentar el pH.
5. Agregar 500ml PB 0.2M
6. Medir el pH con tiras reactivas, debe ser entre 7-8
7. Envasar, etiquetar y dejar a 4°C.

#### *PB 0.2M*

##### **Preparación para 1L**

1. Pesar 6.62g Fosfato de sodio mono básico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y 40.72g Fosfato de sodio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) o 21.57g de fosfato de sodio dibásico anhidro.
2. Agregar las sales en 500ml de agua y agitar magnéticamente.
3. Una vez disueltas las sales, aforar a 1 litro con agua destilada.

#### *Solución salina 0.9%*

1. Agregar 9g de NaCl en suficiente agua desionizada
2. Mezclar con agitación magnética
3. Aforar en 1L

#### *Sacarosa 30%*

##### **Preparación Sacarosa 30% en PB 0.1M**

1. Agregar 30g de sacarosa en 50ml de PB 0.1M en un vaso
2. Disolver con calor en agitación magnética
3. Aforar a 100ml con PB 0.1M
4. Envasar, etiquetar y almacenar a 4°C

#### *TBS*

##### **Preparación de 1L de TBS 10x, pH 7.5**

1. Disolver 24.2 g Tris base y 80 g NaCl en aproximadamente 800ml de agua desionizada
2. Ajustar el pH a 7.5 con HCl 1M
3. Aforar con agua desionizada a 1L
4. Almacenar a 4°C

#### *PBS*

##### **Preparación de 500 ml de PBS 10X:**

1. Pesar 40g de NaCl, 1g de KCl, 7.2g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 1.2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pasarlos a un vaso de precipitados.
2. Agregar aprox. 400ml de agua desionizada y disolver las sales con agitación magnética (y calor si se desea acelerar).
3. Pasar la solución a un matraz volumétrico de 500 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.
4. Transferir la solución a un frasco limpio y debidamente etiquetado.

\*Para obtener PBS 1X aforar 50 ml de PBS 10X a 500ml con agua desionizada.

## Perfusión trans cardiaca

Esta técnica se realizó gracias a la colaboración y asesoría de la Dra. Yessica Heras y la infraestructura de los laboratorios del departamento de Neuropatología molecular del Instituto de Fisiología Celular - UNAM.

### Materiales

#### Reactivos

1. PFA 4% frío
2. Sacarosa al 30%
3. Solución salina NaCl 0.9% fría

#### Equipos

1. Bomba peristáltica
2. Refrigerador 4°C

#### Instrumental

1. Tarja con agua corriente
2. Rejilla para colocar animales
3. Instrumental quirúrgico:
  - a. Tijeras
  - b. Pinzas
  - c. Alicatas

#### Insumos

1. Hielo
2. Tubos Falcon de 50ml con 10 ml de PFA 4% frío
3. Parafilm
4. Guantes de nitrilo
5. Jeringas de 1ml
6. Anestésico pentobarbital
7. Recipiente y envase para desecho químico (PFA)

### Metodología

Las soluciones preparadas un día antes se colocan junto a la bomba peristáltica en un contenedor con hielo para mantenerlas frías (Figura 71). Las mangueras de la bomba se conectan a un par de agujas en un extremo, y el otro se introduce en las soluciones. Antes de iniciar la perfusión, las mangueras se purgan para eliminar el aire y se dejan preparadas junto al espacio donde se ubicará el animal.

Los animales son anestesiados con 1ml de pentobarbital. Una vez que el animal no responde a ningún estímulo y se asegura la anestesia profunda, el animal se coloca sobre la rejilla ubicada sobre la tarja. Utilizando instrumental quirúrgico, se accede a la cavidad torácica. El corazón se sujeta firme pero suavemente para insertar la aguja conectada a la solución de NaCl 0.9% al ventrículo izquierdo, en el ápice del corazón. Rápidamente, se corta la aurícula derecha para permitir el flujo de la sangre fuera del animal. Una vez perfundidos los 250 ml de NaCl 0.9%, se inserta la manguera con PFA. El desecho con PFA se debe recoger en un recipiente específico etiquetado como desecho tóxico, este fluido no se debe desechar a las tuberías.

Una vez fijados los tejidos, se extrae la médula cuidadosamente, para evitar artefactos en la evaluación posterior. Se encontró que debido a la lesión la ME presentó adherencias en el sitio de la lesión, por lo que la extracción con flujo a presión no fue viable. En este caso se recomienda utilizar instrumental quirúrgico de precisión para separar cuidadosamente la ME del canal vertebral.

Los tejidos extraídos se almacenan en recipientes con PFA a 4°C durante 24h. Posteriormente, se cambian a sacarosa al 30% y se cambian de sacarosa tras 48h. Los tejidos se cambian a PB para su corte longitudinal y tinción.

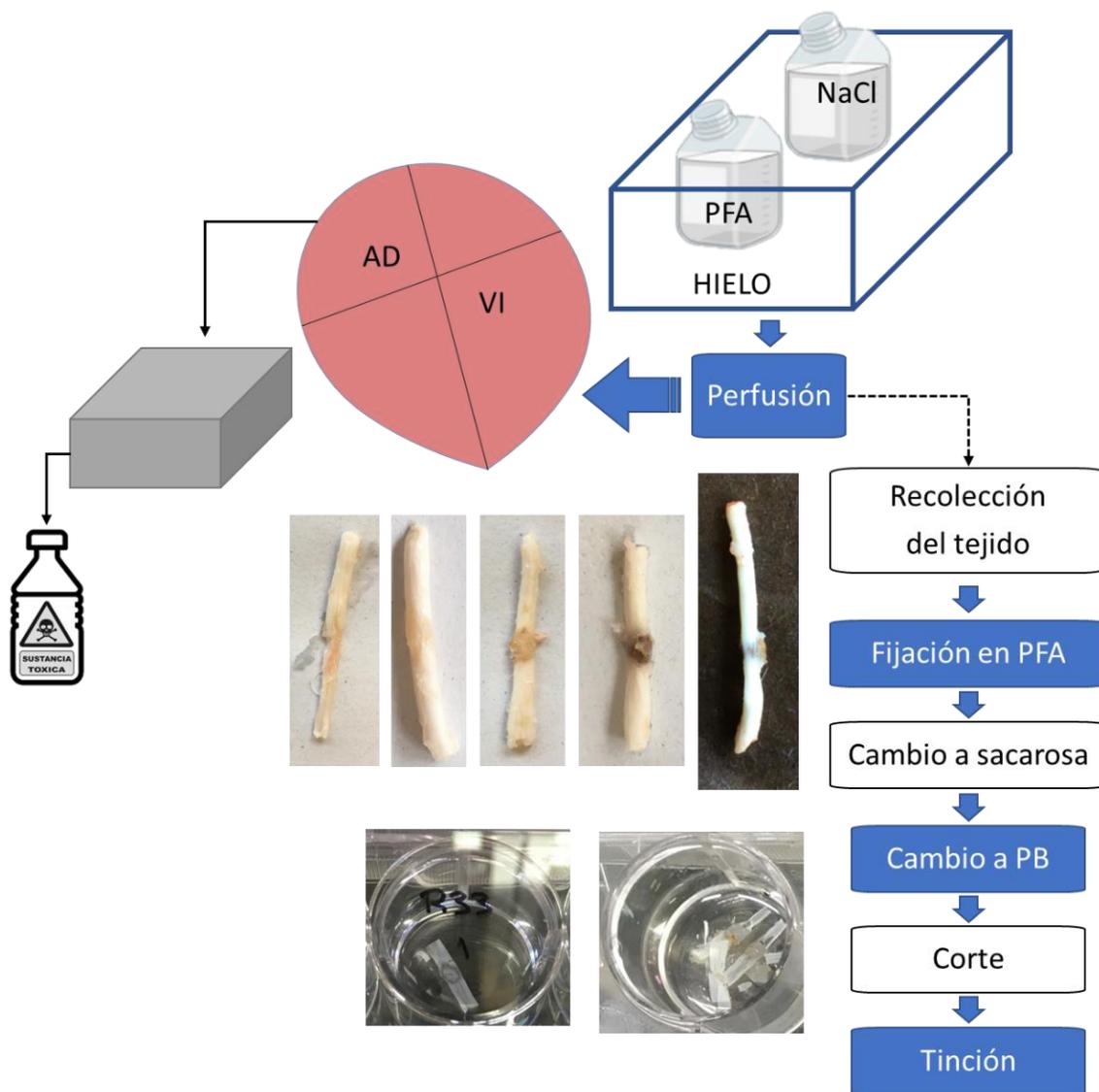


Figura 71. Perfusión trans cardiaca y extracción de muestras para análisis histológico.

## Inmunofluorescencia

Esta técnica se realizó gracias a la colaboración y asesoría de la Dra. Yessica Heras y la Quim. Cristina Aranda, en los laboratorios del departamento de Neuropatología molecular del Instituto de Fisiología Celular - UNAM.

Una vez que se tienen los cortes de la médula, el proceso para la inmunofluorescencia se lleva a cabo en dos días.

### Materiales y reactivos

#### Reactivos

- PB 0.1M
- TBS
- Tritón
- Albumina
- DAPI
- Anticuerpos primarios y secundarios
- PBS
- Extran
- Agua destilada

#### Materiales

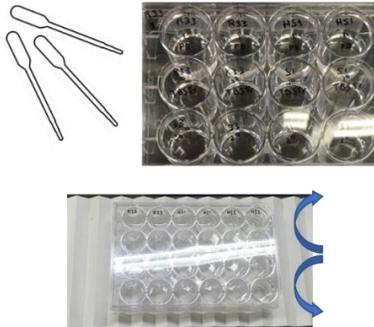
- Cajas de 24 pozos
- Pipetas plásticas
- Cubreobjetos
- Portaobjetos adecuados
- Pinceles suaves
- Gancho fino de vidrio

#### Equipos

- Balancín
- Cuarto frío (4°C)

### Metodología

Día 1: Aplicación del anticuerpo primario.

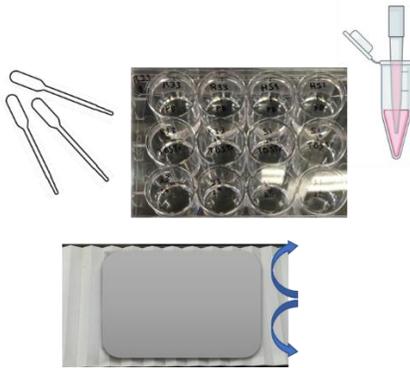


1. Hidratar los cortes en PB 0.1M (10 min).
2. Lavar con TBS Tritón 0.5% (TBSTn) 3 veces por 10 min cada lavado.
3. Bloquear<sup>3</sup> con albúmina 5% en TBSTn por 30 min en agitación lenta (balancín).
4. Aplicar el anticuerpo primario 1:300 (en la solución de albúmina) y se deja en agitación leve (balancín) a 4°C toda la noche a 24 h.

---

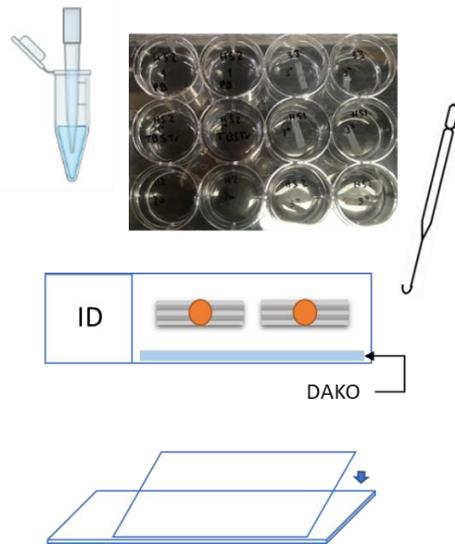
<sup>3</sup> El bloqueo con albumina de suero bovino (BSA), consiste en bloquear todos los sitios de unión no específicos en la muestra de tejido que podrían unirse a los anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia, para evitar la reacción de los anticuerpos con otra estructura que no es el antígeno de interés que puedan presentarse por factores como pueden ser la interacción entre cargas o absorción inespecífica.

Día 2: Aplicación del anticuerpo secundario y montaje.



1. Lavar con TBS Tritón 0.5% (TBSTn) 3 veces por 10 min cada lavado.
2. Aplicar el anticuerpo secundario 1:300 en TBSTn en oscuridad, tapar con papel aluminio e incubar 2 horas a temperatura ambiente en agitación lenta (balancín). Mientras tanto, lavar los cubreobjetos con etanol y agua destilada.
3. Lavar con TBSTn 3 veces por 10 min cada lavado.

4. Colocar 300  $\mu$ l de DAPI (1:10,000) en PBS 1x (por pozo) por 10 min a temperatura ambiente, en oscuridad.
5. Lavar 2 veces en PBS por 5 min cada lavado y pasar a PBS fresco para el montaje.
6. Aplicar 100  $\mu$ l de PBS sobre el portaobjetos.
7. Extender el corte dentro del pozo y pasarlo al portaobjetos, dejándolo extendido (hacerlo delicadamente con pinces suaves).
8. Colocar una tira de DAKO con una pipeta a lo largo del portaobjetos.
9. Colocar el borde del cubreobjetos sobre el DAKO y dejarlo caer lentamente, de modo que cubra los cortes sin generar burbujas.
10. Dejar los cubreobjetos con las muestras toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente.
11. Pasar las muestras montadas a 4°C en un recipiente cerrado y que no permita el paso de luz a las muestras.



# Pyrrole Plasma Polymer-Coated Fibrillar Scaffold Implant: Pilot Study in Rat Spinal Cord Transection with MRI

Diana M. Osorio-Londoño, Gloria S. Sánchez-Morales, Gustavo García-García, Axayácatl Morales-Guadarrama, Roberto Olayo-González.

**Abstract**— Despite extensive research on spinal cord injury (SCI) therapies for the recovery of motor, sensory and autonomic function, currently there are no effective treatments to completely restore tissue structure and function. In this work, a polylactic acid (PLA) fibrillar scaffold coated with pyrrole plasma polymer doped with iodine (pPPy/I), was studied as therapeutic strategy in a SCI transection model. Magnetic resonance imaging (MRI) was used to evaluate tissue response to the implant. Behavioral analysis using the BBB open-field testing was conducted to evaluate functional response. MRI analysis showed the SCI model completely disrupted tissue continuity, and diffusion indices were altered at the injury site. The animals had completely paralyzed hindlimbs and bladder control loss after injury. After 8 weeks of treatment, in contrast to control and PLA-implanted animals, PLA+pPPy/I-implanted animal had regained bladder control autonomy and frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional coordination between forelimbs and hindlimbs. These results suggest fibrillar scaffolds coated with pPPy/I constitute a promising therapy for SCI.

## I. INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) severely affects motor, sensory and autonomic function, and is associated to the disconnection of neural circuits and failure of neural tissue regeneration. After a SCI, complex processes take place at the injury epicenter, including hemorrhage, inflammation, ischemia and reactive glia migration, resulting in the formation of a glial scar at chronic stages [1]. Recent studies have demonstrated that a combinatorial strategy including biomaterials, stem cells, rehabilitation and stimulation, improves functional and histoarchitectural outcomes [2].

Neural tissue engineering as a strategy for nervous tissue reconstitution and ultimately functional recovery, comprises the use of biocompatible materials designed to structurally mimic the nervous tissue environment to promote cell adhesion, migration, differentiation, and survival [3]. Fibrillar scaffolds constitute a platform with a porous microstructure that promotes cell and nutrient migration, fabricated with biomaterials which facilitate cell-surface interactions to promote tissue-sparing and regeneration [4].

Plasma synthesized polypyrrole doped with iodine (pPPy/I) is a biocompatible material which has been studied as an implant, in the form of particles in suspension in contusion SCI models, and as tablets in transection models [5]–[9]. These studies demonstrated the pPPy/I implant results in motor recovery and neuroprotection of the spinal cord at the injury site, reducing inflammation and lesion effects, and

maintaining histoarchitecture. Although contusion may better model the most common injuries documented at the clinic level, transection models are eligible in regeneration studies since this model completely disrupts tissue continuity and differences between spared and neo-tissue can be clearly stated [10].

In this work, polylactic acid (PLA) was electrospun to fabricate porous fibrillar scaffolds which were coated with pPPy/I (PLA+pPPy/I) as a combined treatment strategy in a SCI transection model, adding an architectural component to pPPy/I.

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Implant fabrication

Scaffolds were prepared by electrospinning a 15% v/v solution of PLA (Ingeo 3251D) in chloroform and dimethylformamide (9:1), using a 20kV electric field between a 0.6 mm internal diameter stainless-steel needle and a grounded collector plate. The distance between the plate and the needle was adjusted to 22 cm. PLA solution was pumped at a 2ml/h flow rate through the needle. The scaffold was then maintained in a vacuum oven for 4 days for residual solvent evaporation.

Implants were prepared by cutting a 4x3 mm section of scaffold, folded twice, and coated with pyrrole plasma polymer doped with iodine (pPPy/I) synthesized in a glass reactor as described previously [11]. Briefly, the PLA implants were fixed to the reactor between stainless steel electrodes connected to a 13.5 MHz RF generator, placed 10 cm apart. The plasma polymer synthesis was conducted for 30 minutes at  $1\pm 0.1$  Torr, 30W. Resulting implant constructs are shown in Fig. 1.

### B. Surgical procedure

PLA and PLA+pPPy/I implants were sterilized under UV radiation for 30 minutes before implantation. Animal handling procedures were consistent with national and international regulations. Adult female Wistar rats (N=3) were anesthetized with a 0.1ml IM injection of xylazine before a 0.04 ml IP injection of Zoletil 50. The spinal cord was transected with micro scissors after laminectomy at T9 level and a longitudinal incision of the meninges. Implants were adjusted to 3x3mm sections and placed between the severed segments of the spinal cord. The rat used as control received no implant. A 5x3mm patch of a single sheet of electrospun PLA coated with pPPy/I was placed over the incision of the meninges of all the animals.

Authors are with the Metropolitan Autonomous University, México City, México (e-mail: oagr@xanum.uam.mx).

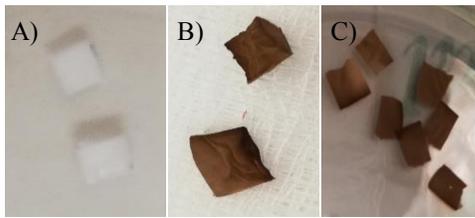


Figure 1. Fabricated constructs. For surgical implantation, the constructs were adjusted to a 3x3x1mm rectangular shape implants. A) PLA implants, B) PLA+pPPy/I implants, C) PLA+pPPy/I patches for meninges incision repair.

Finally, muscles and skin were sutured in layers, and the animals received postoperative care.

### C. Implant assessment

The 2nd and 4th week of treatment, structural development of the injury site was evaluated with Magnetic Resonance Imaging (MRI), using a 3T Philips Achieva MR system, coupled to a neurovascular array coil. T1-weighted, T2-weighted, and diffusion tensor (DTI) sequences were performed and analyzed in Weasis Medical Viewer 3.6.2 to assess structural changes in neural tissue.

DTI and tractography analysis were conducted in DSI Studio [12]. A total of 32 diffusion sampling directions were acquired to calculate the DTI, with a b-value of 800 s/mm<sup>2</sup>. Resulting in-plane resolution was 1.4 mm and slice thickness was 1.5 mm. The diffusion tensor was calculated and a deterministic fiber tracking algorithm was used to estimate axon fibers trajectories along regions placed over the spinal cord [12]. Using thoracic intact fibers (craniocaudal blue-color coded) as reference, the injury site was identified and 3 adjacent regions in rostral and caudal direction studied for tract-tracing. The anisotropy and angular thresholds were 0.2 and 20 degrees, respectively. The step size was 0.2 mm. The fiber trajectories were smoothed by averaging the propagation direction with 50% of the previous direction. Tracks with length shorter than 1 or longer than 300 mm were discarded. A total of 5000 tracts were calculated.

Motor recovery was assessed with the BBB rating scale in an open-field environment before injury and weekly up to 8 weeks of treatment [13]. A total of 4 minutes of free movement were recorded and analyzed each session.

## III. RESULTS AND DISCUSSION

MRI on the 2<sup>nd</sup> week post-surgery showed SCI procedure resulted in the complete transection of the tissue, and a visible gap of 0.6 - 0.9 mm between stumps, as shown in Fig. 2. In contrast to contusion SCI models, in which possible remaining tracts may survive primary damage, transection models eliminate any connection between the brain and the spinal cord below injury site, thus preventing transmission of any bioelectrical and biochemical signals, leading to motor and sensory loss [14].

Fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD) and tract-tracing (tractography) from regions adjacent to and at injury site of the of the control, PLA- and PLA+pPPy/I-

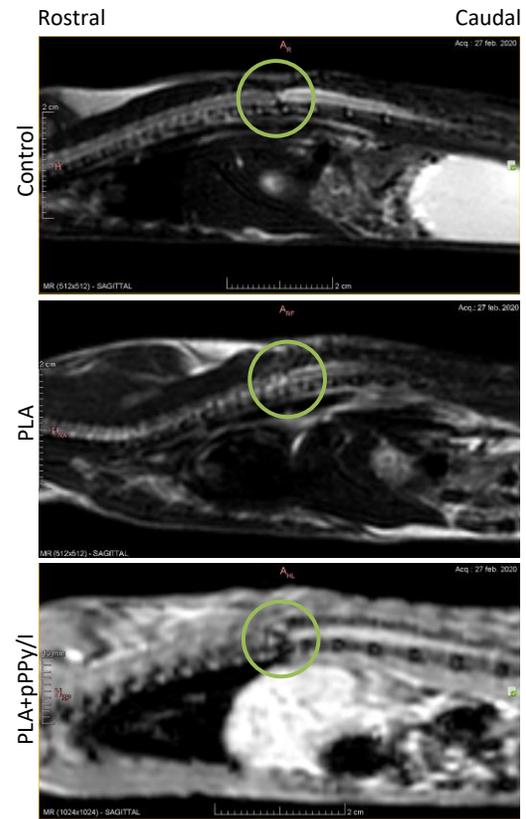


Figure 2. MRI analysis on the 2<sup>nd</sup> week. T2W (control and PLA) and T1W (PLA+pPPy/I) sagittal view images showing the injury site.

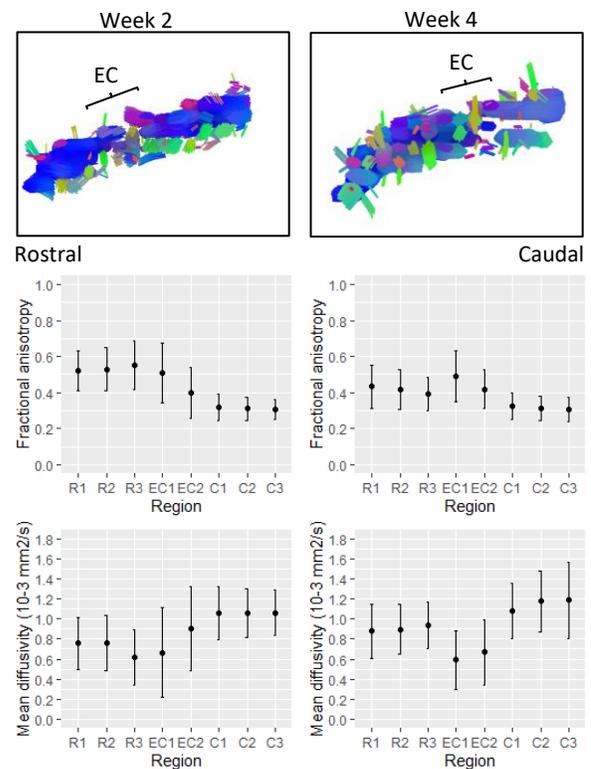


Figure 3. Tractography and DTI indices FA and MD of control animal at week 2 and 4 (mean±SD). C = caudal direction, EC = epicenter of the lesion, R = rostral direction.

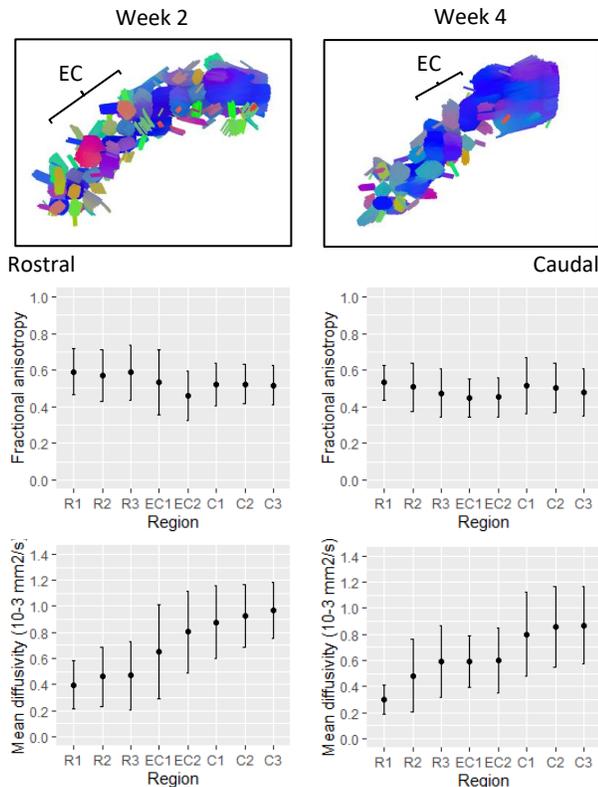


Figure 4. Tractography and DTI indices FA and MD of PLA-implanted animal at week 2 and 4 (mean±SD). C = caudal direction, EC = epicenter of the lesion, R = rostral direction.

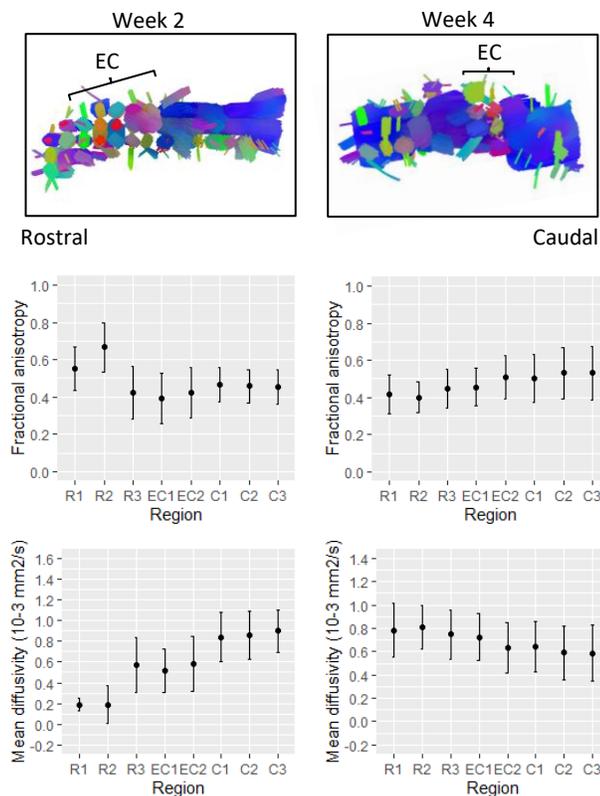


Figure 5. Tractography and DTI indices FA and MD of PLA+pPPy/I-implanted animal at week 2 and 4 (mean±SD). C = caudal direction, EC = epicenter of the lesion, R = rostral direction.

implanted animals are shown in Figures 3, 4 and 5, respectively. FA reflects structure directionality of the tissue, FA=0 isotropic diffusion and FA=1, anisotropic diffusion. MD (equivalent to apparent diffusion coefficient, ADC), reflects the average diffusivity. High MD values reflect isotropic diffusivity, which is associated to inflammation, cysts, and loss of fiber structure in general [14].

Since effective signal transmission through the spinal cord from the brain to peripheral nerves is associated to integrity of white matter tracts and myelinated fibers, spinal cord should display high FA values and low MD values [14].

As shown in Fig. 3, low values of FA and high MD values suggest inflammation, hemorrhage, or cerebrospinal fluid (CSF) leak at the caudal side of the injury site due to the transection procedure [15]. These values have an opposite trend at the rostral side, due to the tissue being mainly anisotropic toward cervical regions. At the 4<sup>th</sup> week, FA values at the rostral side show a decrease with respect to the 2<sup>nd</sup> week, suggesting retrograde tissue loss, possibly necrosis and cyst formation at and adjacent to the injury site. These results are in accordance with MD values, tractography and T2W images, where hyperintense caudal regions are related to FA and MD values.

In contrast, Figures 4 and 5 show that PLA- and PLA+pPPy/I-implanted animals presented lower levels of inflammation, but a clear loss of structure due to transection and implant, which casts no diffusion signal. No significant changes in FA or MD values were identified from week 2 to week 4.

Locomotion test results are shown in Fig. 6. After injury, all animals displayed a complete lack of movement of the hindlimbs, and bladder dysfunction. Throughout the 8 weeks of study, control and PLA-implanted animals showed minimal joint movement, whereas the PLA+pPPy/I-implanted regained autonomous bladder control after the second week of treatment, accompanied by a score of 7 (extensive movement of hips, knees, and ankles). By the 8<sup>th</sup>

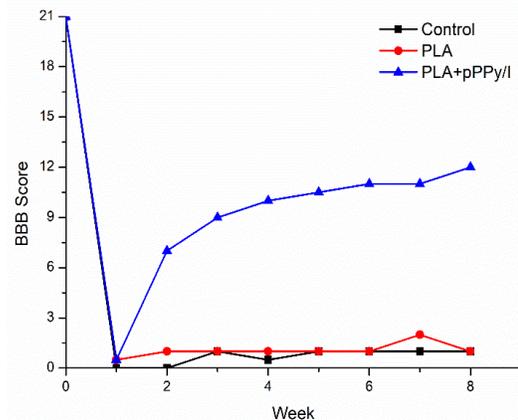


Figure 6. BBB open-field locomotion test results. Control and PLA-implanted animals achieved movement of one or two joints (hip and knee). PLA-implanted rat showed slight movement of the ankles at the 7<sup>th</sup> week. PLA+pPPy/I-implanted rat achieved a score of 7 at the 2<sup>nd</sup> week (extensive movement of hips, knees, and ankles). By 8<sup>th</sup> week it scored 12 (frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional coordination between forelimbs and hindlimbs).

week it scored 12 (frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional coordination between forelimbs and hindlimbs).

MRI anatomical images at the 4th week, are shown in Fig. 7, where control and PLA-implanted animals still display a clear gap between stumps and a slight reduction in tissue diameter at the lesion epicenter. In contrast, PLA+pPPy/I-implanted animal shows no retraction at the injury epicenter, suggesting that the implant provided neuroprotection and prevented further tissue damage, by the use of pPPy/I. In addition, two possibilities may further explain the functional recovery of the PLA+pPPy/I-implanted animal: a) the implant provided a bridge between the spinal cord stumps, which may be promoting connection through the injury site, facilitated by the pPPy/I coating; b) regenerating axons supported by the implant may be present but are not yet visible with the imaging techniques used in this work.

In any case, further evaluation of the tissue at the injury site is required, providing higher resolution of histoarchitecture, along with more experiments to draw conclusions. In addition to MRI studies, these experiments should include histology of the injury site and the use of biomarkers to search for spared tissue, neurite elongation through the scaffold, glial cell infiltration and colocalization with neural tissue [5], [16].

#### IV. CONCLUSION

A fibrillar scaffold coated with pPPy/I was implanted as a treatment strategy for a spinal cord transection injury model. Although it is necessary for more experiments and for a larger

number of animal subjects, preliminary results presented in this paper show that the implant design and materials are a promising treatment strategy for the spinal cord injury as severe as the transection model. These preliminary results show that the PLA+pPPy/I implant promoted a notable improvement of the motor function and the recovery of autonomous bladder control after the second week.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Diana Laura Aguilar Carmona for her support in animal experiments. This research was financially supported by CONACyT.

#### REFERENCES

- [1] S. Papa, E. Mauri, F. Rossi, G. Perale, and P. Veglianesi, "Introduction to spinal cord injury as clinical pathology," in *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies*, Elsevier, 2020, pp. 1–12.
- [2] B. Yang *et al.*, "Strategies and prospects of effective neural circuits reconstruction after spinal cord injury," *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 6, 2020.
- [3] C.-Y. Yang *et al.*, "Neural tissue engineering: the influence of scaffold surface topography and extracellular matrix microenvironment," *J. Mater. Chem. B*, 2021.
- [4] Z. Xiao, Y. Zhao, B. Chen, and J. Dai, *Scaffolds for spinal cord injury repair: from proof of concept to first in-human studies and clinical trials*. INC, 2020.
- [5] S. Sánchez-Torres *et al.*, "Recovery of motor function after traumatic spinal cord injury by using plasma-synthesized polypyrrole/iodine application in combination with a mixed rehabilitation scheme," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, no. 7, 2020.
- [6] G. J. Cruz *et al.*, "Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 10, pp. 2583–2592, 2012.
- [7] R. Mondragon-Lozano *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," *Spine J.*, vol. 17, no. 4, pp. 562–573, 2017.
- [8] A. Morales-Guadarrama *et al.*, "CAT and MRI studies of spinal cord injured rats implanted with PPy/I," *Rev. Mex. Ing. Biomed.*, vol. 34, no. 2, pp. 145–155, 2013.
- [9] L. Álvarez-Mejía *et al.*, "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 7, p. 209, 2015.
- [10] M. Sharif-Alhoseini *et al.*, "Animal models of spinal cord injury: A systematic review," *Spinal Cord*, vol. 55, no. 8, pp. 714–721, 2017.
- [11] G. J. Cruz, J. Morales, and R. Olayo, "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole," *Thin Solid Films*, vol. 342, no. 1, pp. 119–126, 1999.
- [12] F.-C. Yeh, T. D. Verstynen, Y. Wang, J. C. Fernández-Miranda, and W.-Y. I. Tseng, "Deterministic Diffusion Fiber Tracking Improved by Quantitative Anisotropy," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e80713, Nov. 2013.
- [13] M. D. Basso, M. S. Beattie, and J. C. Bresnahan, "A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats," *J. Neurotrauma*, vol. 12, no. 1, pp. 1–21, 1995.
- [14] R. U. Ahmed, M. Alam, and Y. P. Zheng, "Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats," *Heliyon*, vol. 5, no. 3, p. e01324, 2019.
- [15] A. Vedantam, M. B. Jirjis, B. D. Schmit, M. C. Wang, J. L. Ulmer, and S. N. Kurpad, "Diffusion Tensor Imaging of the Spinal Cord: Insights From Animal and Human Studies," *Neurosurgery*, vol. 74, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2014.
- [16] C. Fan *et al.*, "A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair," *Acta Biomater.*, vol. 51, pp. 304–316, 2017.

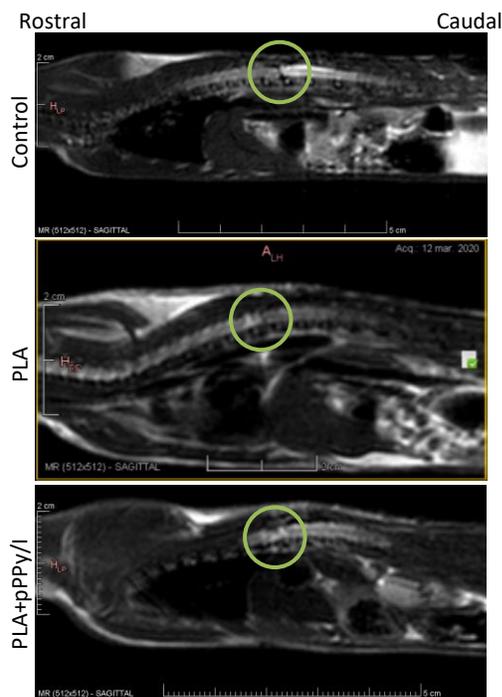


Figure 7. T2W images at week 4, showing the injury site with persistent disconnection of the spinal cord stumps in control and PLA-implanted animals. PLA+pPPy/I-implanted animal showing no tissue retraction at the injury site.

## Article

# Pyrrrole Plasma Polymer-Coated Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering

Diana María Osorio-Londoño <sup>1,2,3</sup>, José Rafael Godínez-Fernández <sup>2</sup>, Ma. Cristina Acosta-García <sup>4</sup> , Juan Morales-Corona <sup>5</sup>, Roberto Olayo-González <sup>5</sup> and Axayácatl Morales-Guadarrama <sup>2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Biomedical Engineering Postgraduate Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; dmlol@xanum.uam.mx

<sup>2</sup> Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; gfrj@xanum.uam.mx

<sup>3</sup> Medical Imaging and Instrumentation Research National Center, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

<sup>4</sup> Reproduction Biology Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; crisbzag@gmail.com

<sup>5</sup> Physics Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; jmor@xanum.uam.mx (J.M.-C.); oagr@xanum.uam.mx (R.O.-G.)

\* Correspondence: amorales@ci3m.mx



**Citation:** Osorio-Londoño, D.M.; Godínez-Fernández, J.R.; Acosta-García, M.C.; Morales-Corona, J.; Olayo-González, R.; Morales-Guadarrama, A. Pyrrrole Plasma Polymer-Coated Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering. *Polymers* **2021**, *13*, 3876. <https://doi.org/10.3390/polym13223876>

Academic Editor: Khalil Abdelrazek Khalil

Received: 27 August 2021

Accepted: 4 October 2021

Published: 10 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Promising strategies for neural tissue engineering are based on the use of three-dimensional substrates for cell anchorage and tissue development. In this work, fibrillar scaffolds composed of electrospun randomly- and aligned-oriented fibers coated with plasma synthesized pyrrole polymer, doped and undoped with iodine, were fabricated and characterized. Infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, and X-ray diffraction analysis revealed the functional groups and molecular integration of each scaffold, as well as the effect of plasma polymer synthesis on crystallinity. Scanning microscopy imaging demonstrated the porous fibrillar micrometric structure of the scaffolds, which afforded adhesion, infiltration, and survival for the neural cells. Orientation analysis of electron microscope images confirmed the elongation of neurite-like cell structures elicited by undoped plasma pyrrole polymer-coated aligned scaffolds, without any biochemical stimuli. The MTT colorimetric assay validated the biocompatibility of the fabricated composite materials, and further evidenced plasma pyrrole polymer-coated aligned scaffolds as permissive substrates for the support of neural cells. These results suggest plasma synthesized pyrrole polymer-coated aligned scaffolds are promising materials for tissue engineering applications.

**Keywords:** plasma polymerization; pyrrole; electrospun scaffolds; 3D cell culture

## 1. Introduction

The nervous system, composed of the peripheral and central nervous systems, has limited self-regenerative capacity. The field of tissue engineering has made efforts to provide strategies to restore tissue structure and functionality. Biomimetic scaffolds have been designed as a strategy towards tissue regeneration, as the resultant neotissue may integrate to the host with the optimal structure for functional restoration and without rejection from the immune system. Since nerve tissue has a complex and organized structure, scaffolds comprising aligned structures for glia and neuron adhesion and migration are often used for the repair and regeneration of the nervous system [1,2].

Electrospinning is a versatile technique for the fabrication of fibrillar scaffolds [3]. Based on a relatively simple setup, nano- and micrometric fibers are prepared by electrospinning, having the capacity to support adhesion, differentiation, proliferation, and migration of cells towards nerve tissue regeneration [4]. Fibers prepared by electrospinning and its variations, such as solution blowing [5], needleless electrospinning [6,7], and in situ electrospinning [8] (among others [3,9]) have a high surface to volume ratio and

endow scaffolds with pores as the fibers are deposited on the collector, which allow for cell infiltration to the scaffolds' inner fibers [4].

The use of biodegradable and biocompatible materials is often sought for in tissue engineering, as these materials are metabolized by the host once neotissue has formed. Polylactic acid (PLA), polycaprolactone (PCL), collagen, and laminin are some examples of materials used for scaffolds in tissue engineering [4,10,11]. In particular, PLA is a biodegradable polymer which has ease of use with different fabrication techniques (like electrospinning and 3D printing) and has been used in many biomedical applications [12–18]. However, the interaction of PLA with biological medium is limited due to its hydrophobicity and restrictive surface for cell adhesion [15,19]. Hydrophilicity is an important property of tissue engineering scaffolds in general, as it promotes suitable interactions with culture media and tissues *in vivo*. Various techniques are used to enhance the hydrophilicity of scaffolds, such as plasma treatment [15,20], polymer blends [3,16] and hydrophilic material grafting [19,21], to name a few. Hence, PLA is usually complemented with other materials in order to increase tissue response.

Conducting polymers are appealing candidates in neural tissue engineering for their electrical properties, since neurons, as excitable cells, respond to electrical stimuli. Nevertheless, limitations of conductive materials include nondegradability, inappropriate mechanical properties, and their potential cytotoxicity and immunogenicity, associated with the oxidant agents used in their synthesis process [22–25]. These challenges are usually addressed by combining conductive polymers with suitable materials to form biocompatible composites while maintaining the electrical properties, such as natural polymers [22,26], hydrogels [25,27], and biodegradable polymers [11,28], among others.

Biomaterials are used as a platforms for cell support in neural tissue engineering for the treatment of traumatic and nontraumatic disease [29]. Plasma synthesized pyrrole polymer has been studied doped (pPPy/I) and undoped (pPPy) with iodine for its interactions with biological tissue, such as bone tissue [30,31], cartilage [32], pancreatic cells [33], fibroblasts [34], and neurons [35]. Moreover, pPPy/I has been thoroughly studied for its potential to protect neural tissue after damage [36–42]. pPPy/I has been studied as an implant in rats for the treatment of contusion and transection models of spinal cord injury (SCI), providing functional and histoarchitectural recovery for the animals after its implant. In contusion models, pPPy/I has been implanted as particles of the polymer in suspension through an injection at the injury site [36–39]. In transection models of SCI, pPPy/I has been implanted as a tablet at the transection site [40–42], yet other forms of implant as a treatment for traumatic and nontraumatic disease in the nervous system remain unexplored.

Plasma polymerization is a synthesis method for the fabrication of polymer films without any chemical oxidant compounds [43,44]. Plasma pyrrole polymers differ from chemically and electrochemically synthesized polypyrroles; the first consists of networked crosslinked structures, whereas the latter have a linear molecular structure. These characteristics endow plasma pyrrole polymers with appealing properties for tissue engineering applications [45]. As a result of the complex molecular structure of plasma pyrrole polymers, their electrical properties differ from chemically and electrochemically synthesized polypyrroles [43,46].

As reported by Cruz et al., the electric conductivity of the plasma pyrrole polymer (pPPy) varies between  $10^{-9}$  to  $10^{-12}$  S/cm. When the relative humidity (RH) of the samples increases to 90%, the conductivity increases by three orders of magnitude. A plasma pyrrole polymer doped with iodine (pPPy/I) exhibited conductivity around  $10^{-10}$  S/cm in 30% RH and increased to  $10^{-6}$  S/cm in 90% RH. Furthermore, in 92% RH the conductivity increased to  $10^{-3}$  S/cm, and thus pPPy/I may be considered as a semiconductor [44].

In the present study, we designed, fabricated, and characterized electrospun scaffolds based on PLA (randomly- and aligned-oriented) coated with pPPy and pPPy/I to test their viability for neural tissue engineering applications.

## 2. Materials and Methods

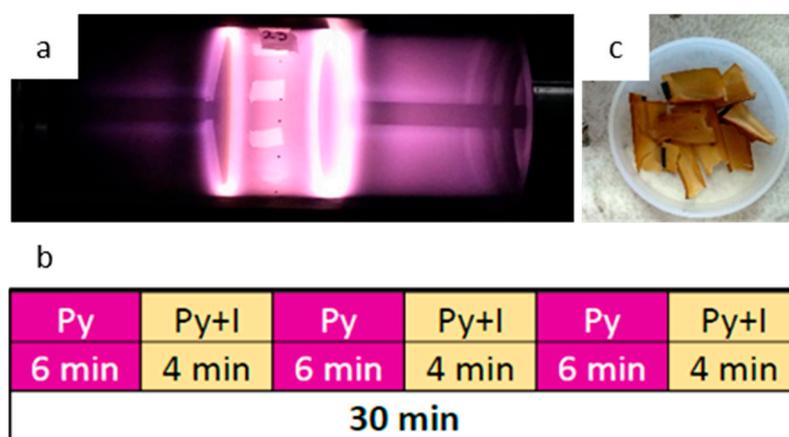
### 2.1. Fabrication of Fibrous Composite Scaffolds

#### 2.1.1. Electrospinning

A solution of PLA (15% *w/v*) was prepared by dissolving PLA (Ingeo 3251D, Minnetonka, MN, USA) pellets in chloroform (J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., Radnor, PA, USA) and dimethylformamide (DMF, J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., PA, USA), using a ratio of 9:1. The pellets were dissolved overnight in the chloroform portion at room temperature, and the DMF was added before the electrospinning process, once the pellets were dissolved. The complete solution was homogenized using a vortex for 1 minute. The PLA solution was electrospun through a 0.6 mm internal diameter stainless steel needle and a flow rate of 2 mL/h in a TL Electrospinning and Spray Unit (TL-01 TONG LI TECH, Shenzhen, China). A high voltage power supply was used to generate an electric field of 20 kV between a collector and the needle, which were placed 22 cm apart. Aligned-fibrillar scaffolds were fabricated using a drum collector ( $D = 76$  mm,  $L = 235$  mm) at 2500 rpm. Random-fiber scaffolds were obtained using a plate collector. Finally, the scaffolds were dried in a vacuum oven for 4 days to remove any residual solvent.

#### 2.1.2. Pyrrole Plasma Polymer Coating

PLA scaffolds were coated with plasma synthesized pyrrole polymer in a reactor as described previously [44,47]. Briefly, the scaffolds were fixed to the center of a glass cylinder, closed at both sides with stainless steel flanges coupled to electrodes fixed 10 cm apart, as shown in Figure 1. Using a vacuum pump, a pressure of  $1 \pm 0.1$  Torr was maintained inside the reactor chamber. The glow discharges were initiated between the electrodes connected to a radiofrequency generator (Dressler Cesar 136, China) of 13.5 MHz at 30 W. Pyrrole (Py) and iodine (I) from Sigma-Aldrich vapors were supplied into the reactor chamber through connectors coupled to vessels containing the monomer and dopant. The synthesis was carried out for 30 min. For pPPy-I coating, pyrrole was kept constant while the iodine was supplied for 4 min after 6 min of pyrrole supply, as shown in Figure 1b. For pPPy coating, only Py was supplied into the chamber. Once the synthesis was completed, samples were extracted carefully from the reactor for characterization. Resulting samples are shown in Figure 1c.



**Figure 1.** Pyrrole plasma polymer synthesis. Reactor chamber containing electrospun samples (a); monomer/dopant supply scheme (b) and resulting coated scaffolds (c).

### 2.2. Characterization of the Scaffolds

#### 2.2.1. Physicochemical Characterization

Physicochemical characterization was conducted by infrared spectroscopy, coupled to an attenuated total reflectance accessory (IR-ATR) in a Spectrum GX System (Perkin

Elmer-DuraSamplIR II, USA), 16 scans were taken in a range of 650–4000  $\text{cm}^{-1}$ . Thermogravimetric analysis was performed in a PerkinElmer Pyris 1 TGA system, in a nitrogen atmosphere at 20.0 mL/min flowrate. A heating ramp from 30.00 °C to 600.00 °C at 10.00 °C/min was used.

Crystallinity of the scaffolds was tested by X-ray diffractometry in a BRUKER D8 ADVANCE ECO X-ray diffractometer. The degree of crystallinity was calculated using the ratio of the area under the peaks to the total area ( $A_T$ ) under the XRD pattern [48,49], which is the sum of the crystalline diffraction peak area ( $A_c$ ) and the amorphous diffraction component ( $A_a$ ) of the pattern ( $A_T = A_c + A_a$ ).

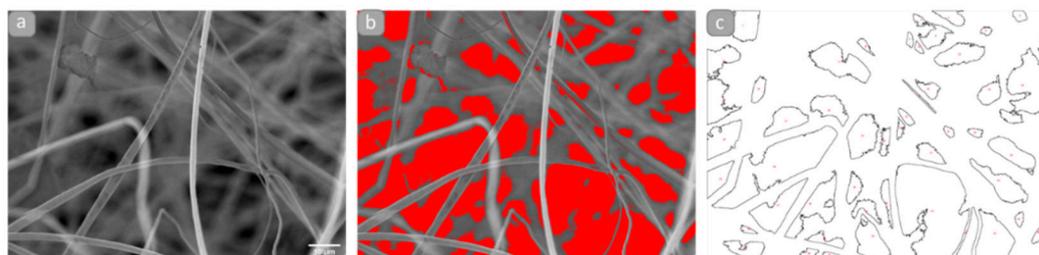
Differential scanning calorimetry (DSC) tests were carried out in a TA Instruments DSC-2920 system. Between 6–8 mg of each sample were scanned at a rate of 10 °C/min, using a heating/cooling/heating program, from 30 to 230 °C. The first heating was used to erase the thermal history, and the thermal properties were obtained from the second heating.

The wettability of the fabricated scaffolds was evaluated by measuring the contact angle of a 20  $\mu\text{L}$  drop of distilled water on each sample ( $n = 6$ ).

### 2.2.2. Morphology and Microstructure

SEM images of the as-fabricated scaffolds were obtained in a Jeol JSM-7600F scanning electron microscope. Diameter distributions of the fibers were determined taking 200 measurements per scaffold from three different frames, using ImageJ/Fiji (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA).

Apparent porosity and pore dimensions were studied at the bidimensional projection from the SEM images using ImageJ/Fiji (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA). At least three different frames were analyzed, first by applying a contrast-based threshold where the darkest areas correspond to the pore spaces and then the particle analysis plugin. By this process, the bidimensional pore space is obtained as shown in Figure 2.



**Figure 2.** SEM images processed for bidimensional pore space segmentation. Representative images of rPLA scaffold, in (a) original image, (b) applied threshold, (c) detected pores.

### 2.2.3. Biological Characterization

Three dimensional cultures were conducted using the NG108-15 cell line (ATCC, HB-12317™). The NG108-15 cell line is a hybrid somatic cell type, which express properties observed in neurons and thus is used as a neuron model to study the nervous system processes such as memory, synapse, differentiation, intercellular communication, neuron membranes, trophic behavior, cellular movement, drugs, and biomaterials, among others [50–53].

The cells were cultured in standard conditions as previously reported [54]. Briefly, 10% ( $v/v$ ) fetal bovine serum (FBS), 2% ( $v/v$ ) HAT, and 1% ( $v/v$ ) penicillin and streptomycin (100 units/mL) in DMEM were used as culture media. Cells were thawed, cultured until confluency, detached mechanically via pipetting, and counted in a hemocytometer. Cells were cultured onto the scaffolds, previously UV-sterilized, conducting a microculture method. A drop of counted cells solution was carefully deposited on each scaffold and incubated for 2 h. Culture media was then completed until the scaffolds were entirely covered. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere incubator at 37 °C (5%  $\text{CO}_2$ /95% air).

For scanning microscopy imaging,  $2 \times 10^4$  cells were cultured on each scaffold and maintained for 15 days in standard conditions. As previously reported [54], samples were then fixed in 3.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB at 4 °C, washed with 7.4 pH PB at 4 °C, postfixed in  $\text{OsO}_4$ , dehydrated by immersion in ascending concentrations of ethanol in water (30–100%), and critical-point dried. Samples were mounted on SEM holders using conductive carbon tape and graphite paint, coated with gold, and visualized in a JEOL JSM-5900LV scanning electron microscope. Cell morphology and orientation of cell structures analysis was conducted in ImageJ/Fiji (NIH, Bethesda, MD, USA), with the OrientationJ plugin [55,56].

For cell viability studies,  $1.65 \times 10^4$  cells were cultured on each scaffold ( $n = 6$ ) and maintained for 5 days. As reported previously [54], samples and controls (scaffolds without cells) were then transferred to a 96-well microplate, washed in PBS, and 0.5 mg/mL MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA, M 5655) in PBS solution was added. After incubating for 2 h, DMSO (Sigma) was added and left at room temperature for 2 h in the dark. Absorbance from samples and controls was recorded in an Epoch Microplate Spectrophotometer at 580 nm and 720 nm as reference. Measurement of metabolic activity of cells on each scaffold was obtained by subtracting the absorbance at 720 nm from the corresponding absorbance at 580 nm. Since viable cells reduce MTT through metabolic activity, the absorption from dissolved MTT reduction product, which is proportional to the number of viable cells [57], was used to estimate cell viability.

#### 2.2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in RStudio [58] and GraphPad Prism 9. Shapiro–Wilk Normality test and Kolmogorov–Smirnov test were used to explore the data. For normal data sets, ANOVA, and a Tukey HSD posthoc tests were conducted to compare the scaffolds. To compare nonnormal data, Kruskal–Wallis Rank Sum test and Dunn’s Kruskal–Wallis Multiple Comparisons posthoc test were used.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Physicochemical Characterization

Six types of scaffolds were fabricated and characterized: randomly oriented PLA (rPLA), aligned PLA (aPLA), pyrrole plasma polymer-coated scaffolds, random and aligned (rPLA+pPPy and aPLA+pPPy, respectively), and pyrrole plasma polymer doped with iodine-coated scaffolds (rPLA+pPPy/I and aPLA+pPPy/I).

Functional groups and chemical bonds present on the molecular structure of the fibers were studied by IR-ATR. PLA, PLA+pPPy and PLA+pPPy/I spectra are shown in Figure 3. In PLA, the  $3000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1740\text{--}1760\text{ cm}^{-1}$ ,  $1180\text{ cm}^{-1}$ , and  $1250\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$  characteristic group of bands, correspond to esters ( $-\text{COOH}$ ), the carbonyl group ( $\text{C} = \text{O}$ ),  $\text{C} - \text{O}$ , and  $\text{C} - \text{O} - \text{C}$  respective bonds of the polymer backbone [59,60].

In contrast, PLA+pPPy spectrum shows the  $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$  stretching vibration bands of primary and secondary amines ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}$ );  $2960\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  bands characteristic of aliphatic carbons,  $2260\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$  triple bonds ( $\text{C} \equiv \text{N}$  and  $\text{C} \equiv \text{C}$ ),  $1660\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$   $-\text{C} = \text{C}-$  bonds and  $730\text{--}675\text{ cm}^{-1}$  alkenes, formed from broken rings, branching, and crosslinking during the plasma synthesis. The  $1250\text{--}1315\text{ cm}^{-1}$  band is probably due to the interaction of the material with air. PLA+pPPyI spectrum shows the same characteristic bands of the pyrrole plasma polymer, with less transmittance, suggesting less pPPy/I deposit than pPPy on the PLA fibers.

As shown by the TG analysis, PLA scaffold decomposition occurs in a single step, the material losses 97% of its mass between 275 °C and 370 °C (Figure 4). Coated scaffold decompositions display a 3-step process, as shown in DTG plots (Figure 4). In pPPy-coated scaffolds, a gradual mass loss begins from 155 °C and continues until the temperature reaches 290 °C. At this point, 12% of the initial mass is lost from the sample. Between 290 °C–395 °C, a 41% of mass loss takes place. Thereafter, it continues to decompose in the same gradual manner as the initial step. pPPy/I-coated scaffolds display a 17%

mass loss between 217 °C and 290 °C, as clearly shown by DTG plots (Figure 4). This can be attributed to the loss of ionic iodine, not bonded covalently to the pyrrole polymer, but rather immersed in the crosslinked plasma polymerized structure [61]. Between 320 °C and 427 °C occurs the 55% mass loss of the sample. Gradual decomposition of the pyrrole polymer chains continues after 600 °C. This behavior suggests that the coating pyrrole plasma polymer starts degrading first, shifts the core PLA degradation to a higher temperature, and continues to degrade gradually thereafter, affording the fibers a higher thermal stability [34,44,62].

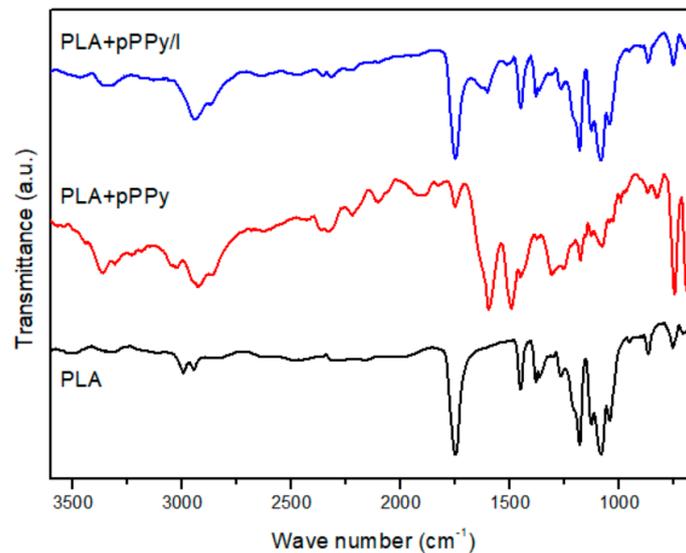


Figure 3. IR-ATR spectra for PLA, PLA+pPPy, and PLA+pPPy/I.

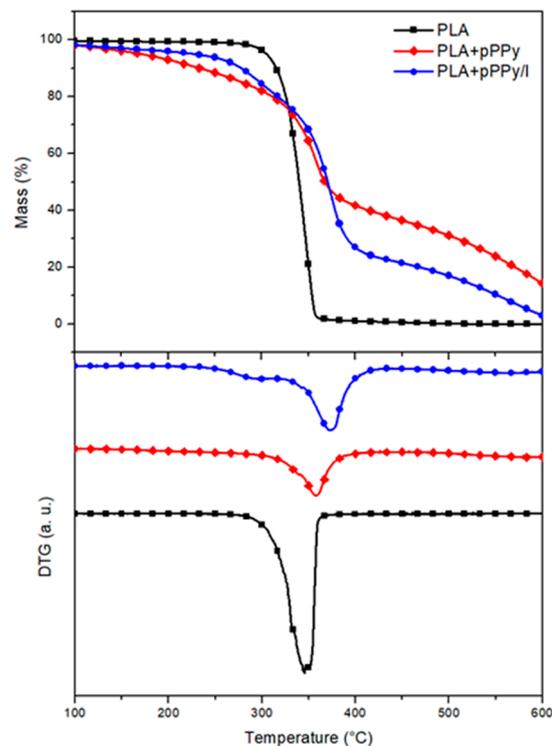


Figure 4. TG-DTG plots of PLA, PLA+pPPy, and PLA+pPPy/I. Thermogravimetric plots (top) and derivative thermogravimetry plots (DTG, bottom).

XRD patterns of uncoated scaffolds display an amorphous structure in both randomly and aligned- oriented fibers (Figure 5). Coated scaffolds depict two diffraction peaks (a sharp one at  $16.7^\circ$  and at  $19^\circ$  one with less intensity), shown by the pPPy/I-coated scaffolds and aligned pPPy-coated scaffold, which correspond to (200)/(110) and (203) planes of PLA in its  $\alpha$ -form [63–65]. As the process of plasma polymerization produces a crosslinked and branched structure, the patterns suggest the crystallization of PLA chains.

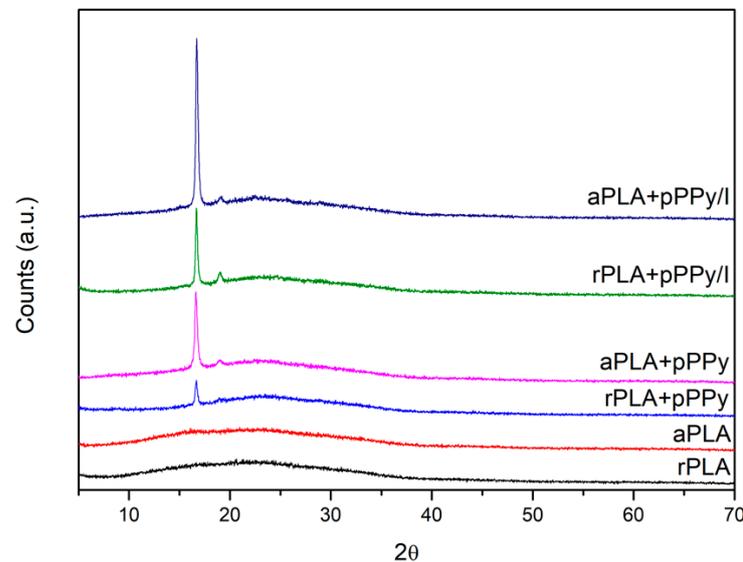


Figure 5. X-ray diffraction patterns of fabricated scaffolds.

The degree of crystallinity was calculated from the area under the curve, using the ratio  $A_c/(A_c + A_a)$ . Calculated values, as well as the intensity of the peaks (with respect to the baseline) are shown in Table 1.

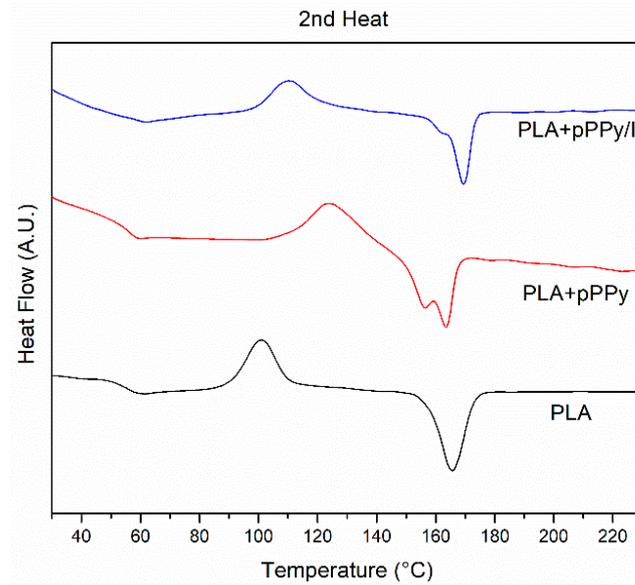
Table 1. Characteristic peak intensity and degree of crystallinity of fabricated scaffolds.

Scaffold	16.7° Peak Intensity	19° Peak Intensity	Degree of Crystallinity
rPLA	-	-	0.07
aPLA	-	-	0.14
rPLA+pPPy	629	-	0.06
aPLA+pPPy	1821	401	0.18
rPLA+pPPy/I	1669	411	0.16
aPLA+pPPy/I	3728	410	0.19

Aligned scaffolds display a higher degree of crystallinity in general, as well as higher intensity of the (200)/(110) diffraction plane in coated scaffolds, suggesting that the mechanical and electrical forces during the electrospinning process contributed to a predisposition toward alignment of the PLA chains. The plasma polymerization process promoted PLA crystallization since the material was submitted to a temperature increment inside the reactor of  $90^\circ\text{C}$  on average [44].

DSC analysis was carried out to study the thermal properties of the fabricated scaffolds (Figure 6). The glass transition and melting temperatures are summarized in Table 2. No differences in thermal behavior were found between random and aligned fiber configurations since the DSC test reflects changes in the thermal properties of the materials. PLA displays a cold crystallization peak around  $87^\circ\text{C}$  ( $T_{cc}$ ), which is common for PLA [66]. The cold crystallization peak shifts to higher temperatures in coated scaffolds at  $121.04^\circ\text{C}$  and  $113.08^\circ\text{C}$  for PLA+pPPy and PLA+pPPy/I, respectively. This increase in  $T_{cc}$  suggests that the presence of plasma polymer hinders cold crystallization. During plasma polymer-

ization, the PLA samples are subjected to temperatures around 90 °C inside the plasma reactor [44], which might be promoting cold crystallization of the polymer chains, and thus reflecting an increase in the degree of crystallinity and the peak displayed in XRD of coated samples [67], as shown in Figure 5.



**Figure 6.** DSC curves of PLA, PLA+pPPy and PLA+pPPy/I.

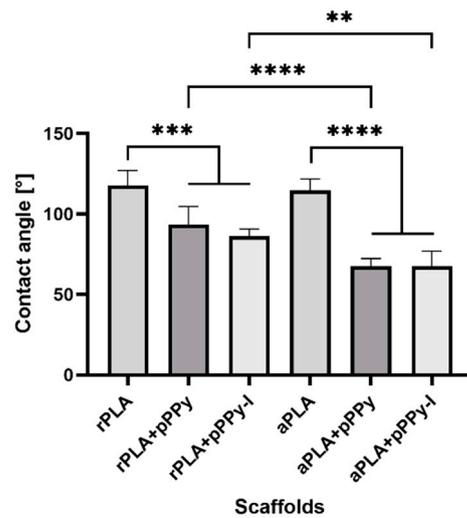
**Table 2.** Thermal properties of fabricated scaffolds.

Scaffolds	PLA	PLA+pPPy	PLA+pPPy/I
T <sub>g</sub> (°C)	60	56.5	60
T <sub>cc</sub> (°C)	87.44	121.04	106.73
T <sub>m</sub> (°C)	167.58	159.47	163.25
T <sub>m1</sub> (°C)	-	153.65	158

T<sub>g</sub>, glass transition temperature; T<sub>cc</sub>, cold crystallization temperature; T<sub>m</sub>, melting temperature; T<sub>m1</sub>, temperature of lower melting peak.

Melting endotherms show variations in the materials. In contrast to PLA, which displays a single melting peak, PLA+pPPy shows two peaks and PLA+pPPy/I shows a shoulder at the melting peak. This behavior might be associated to a crystalline phase transition in the structure of PLA [66,68].

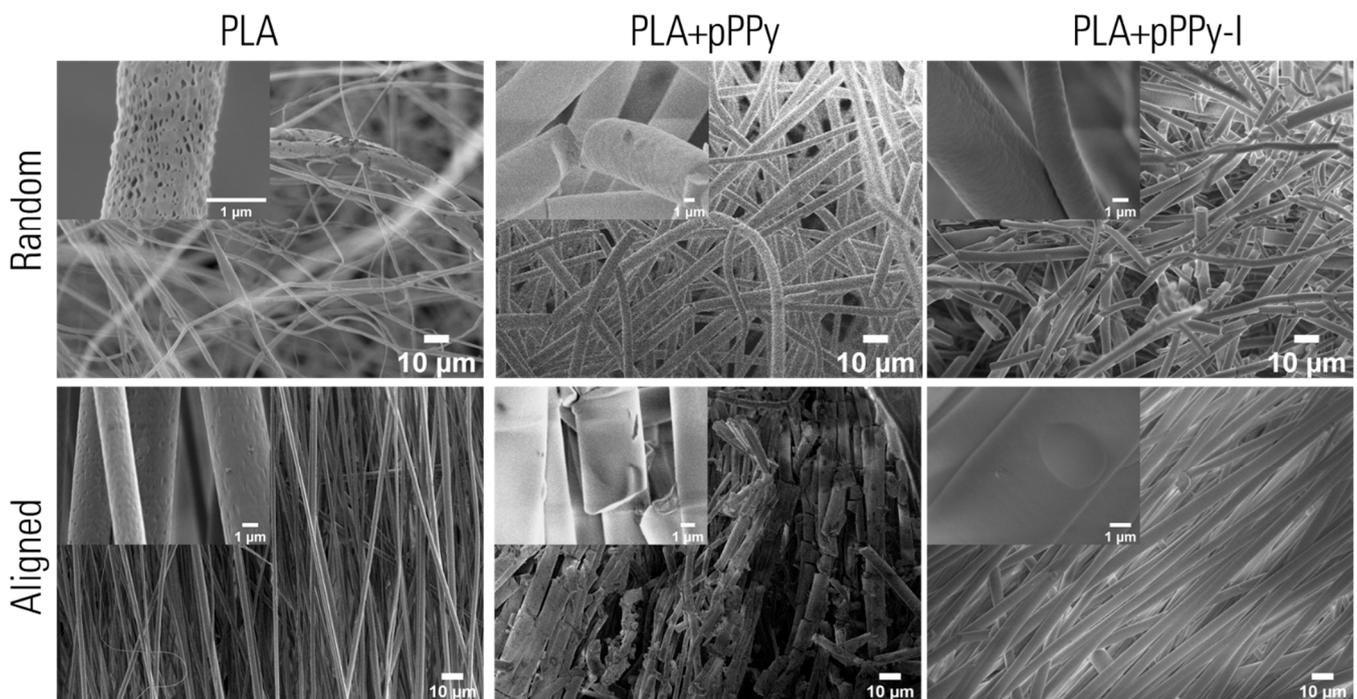
Figure 7 shows the contact angle measure results. As expected, PLA displays a contact angle above 100°, due to its hydrophobic nature. Coated scaffolds display lower contact angles, reflecting the fact that the plasma polymer coating promotes hydrophilicity of the scaffolds. In addition, aligned fibers contributed to lower contact angles than random fibers of coated scaffolds, suggesting that the aligned configuration facilitates the interaction between water and the inner fibers of the scaffold.



**Figure 7.** Contact angle of water on the scaffolds. Results are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.2. Morphological Characterization

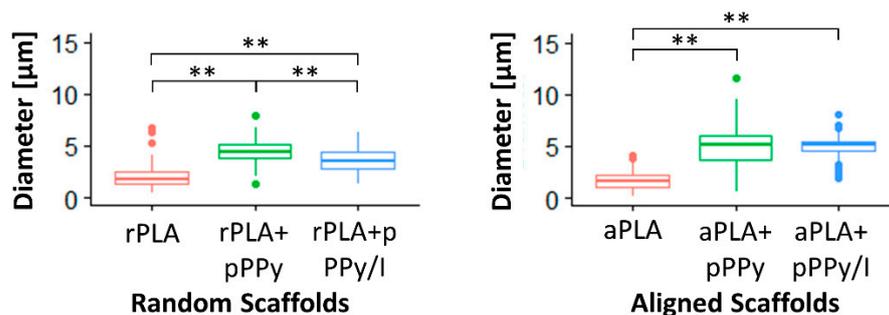
SEM images of the fabricated scaffolds showed the microstructure and morphology of the fibers (Figure 8). Uniform fibers free of beads or defects are observed in all samples. This is due to the polymer solution characteristics and electrospinning process conditions used, as the conductivity of the polymer solution dissipates charges resulting in the fiber elongation [69,70].



**Figure 8.** SEM images of fabricated scaffolds. Fiber microstructure shows a porous surface on PLA scaffolds whereas coated scaffolds have smooth surface fibers. Aligned scaffolds fibers display fibers oriented in a preferential direction, in contrast to randomly-oriented fibers on random scaffolds.

PLA-based fibers display a porous surface, whereas the coated scaffolds' surfaces are smoothed by the pyrrole plasma polymer coating. The plasma coating was smoother in pPPy/I-coated scaffolds than in pPPy-coated scaffolds, where various fissures are present along the fibers, nevertheless, plasma polymer coating appears homogenous.

Statistical differences ( $p < 0.01$ ) were found between fiber diameters, except between aPLA+pPPy and aPLA+pPPy/I scaffolds ( $p > 0.05$ ), as shown in Figure 9. Only rPLA+pPPy displays a diameter normal distribution, whereas the other groups are log-normally distributed. The mean fiber diameters are  $1.95 \pm 0.950 \mu\text{m}$  in rPLA,  $4.45 \pm 1.08 \mu\text{m}$  in rPLA+pPPy,  $3.61 \pm 1.13 \mu\text{m}$  in rPLA+pPPy/I,  $1.62 \pm 0.741 \mu\text{m}$  in aPLA,  $4.97 \pm 1.64 \mu\text{m}$  in aPLA+pPPy, and  $5.06 \pm 0.876 \mu\text{m}$  in aPLA+pPPy/I. Average thickness of plasma polymer deposit on the PLA fibers was  $2.5 \mu\text{m}$  in rPLA+pPPy,  $1.66 \mu\text{m}$  in rPLA+pPPy-I,  $3.35 \mu\text{m}$  in aPLA+pPPy and  $3.44 \mu\text{m}$  in aPLA+pPPy-I scaffolds.



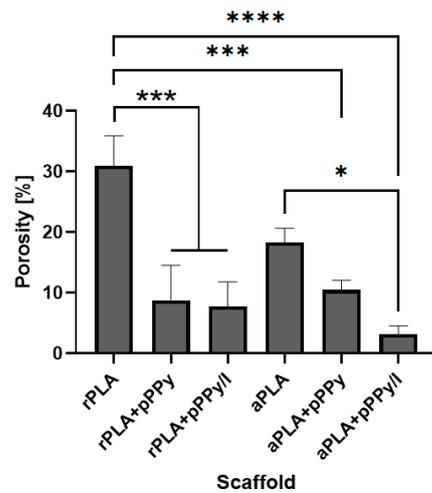
**Figure 9.** Boxplot of fiber diameter distribution. Statistical differences with the Dunn (1964) Kruskal–Wallis multiple comparison test, \*\*  $p < 0.01$ .

In PLA scaffolds, diameters tend to lower values with some larger diameter fibers. In coated scaffolds, as the plasma polymer formed over the fibers, adjacent fibers could become a single thick fiber. This was more frequent in aligned scaffolds and explains the widening of the diameter distribution. The presence of iodine during synthesis resulted in the destruction of smaller fibers, as shown in the distribution shift towards higher diameter values. Iodine also contributes to the formation of a more packed polymer structure [46], resulting in a smaller thickness of the polymer deposit of pPPy/I than pPPy.

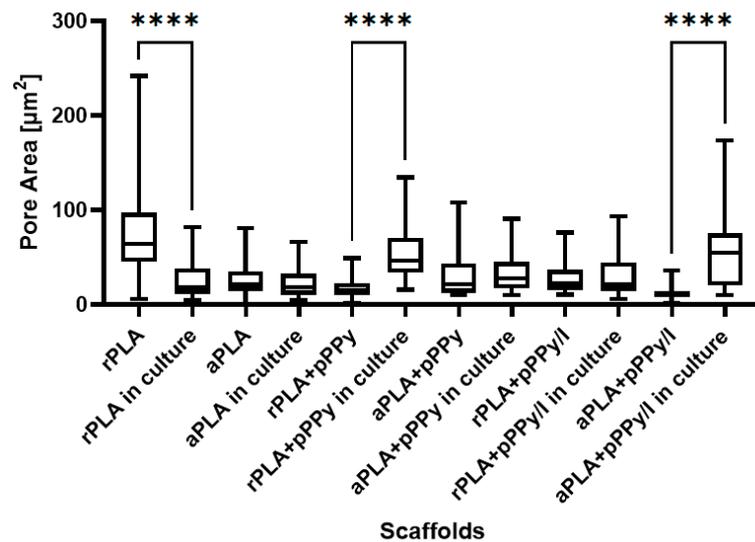
In addition, statistical differences were found between random and aligned scaffolds, except between rPLA and aPLA scaffolds and rPLA+pPPy and aPLA+pPPy scaffolds (not shown), suggesting that fiber diameter is not affected by fiber orientation, but rather by plasma polymer deposition in the presence of iodine.

The porous microstructure of the scaffolds was maintained after the plasma polymer coating. Apparent porosity from SEM images analysis showed statistical differences between scaffolds, as shown in Figure 10. Average apparent porosity (AAP) was significantly higher in PLA scaffolds than in coated scaffolds as-fabricated. Between the PLA scaffolds no significant difference was found, suggesting that fiber orientation in this case does not influence porosity. With the plasma coating, APP is reduced due to the polymer coating over the fibers reducing the pore space in the scaffolds. No significant differences were found between coated scaffolds, suggesting once more that the plasma coating is deposited homogeneously.

Statistical analysis of pore size showed differences between the scaffolds as-fabricated and in culture, as shown in Figure 11. Pore size significantly increased in rPLA+pPPy and aPLA+pPPy/I scaffolds in culture, suggesting that these scaffolds are expanding the porous space while interacting with cells and culture media. Since pPPy and pPPy/I surfaces are hydrophilic [45,71], scaffolds may be swelling from the media water uptake, explaining the increment in pore size in culture. However, aPLA+pPPy and rPLA+pPPy/I showed no significant differences between pore size as-fabricated and in culture, as cells proliferated mainly over the surface of the scaffolds in aPLA+pPPy scaffolds. In rPLA+pPPy/I scaffolds, although the pore size distribution shifted towards higher values in culture, the bidimensional porous space maintained the mean size in culture. However, an apparent swelling was observed on the cell culture SEM images, suggesting an increment of pore space three dimensionally.



**Figure 10.** Porosity of scaffolds as-fabricated. Results presented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences with the ANOVA and Tukey multiple comparisons of means test, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

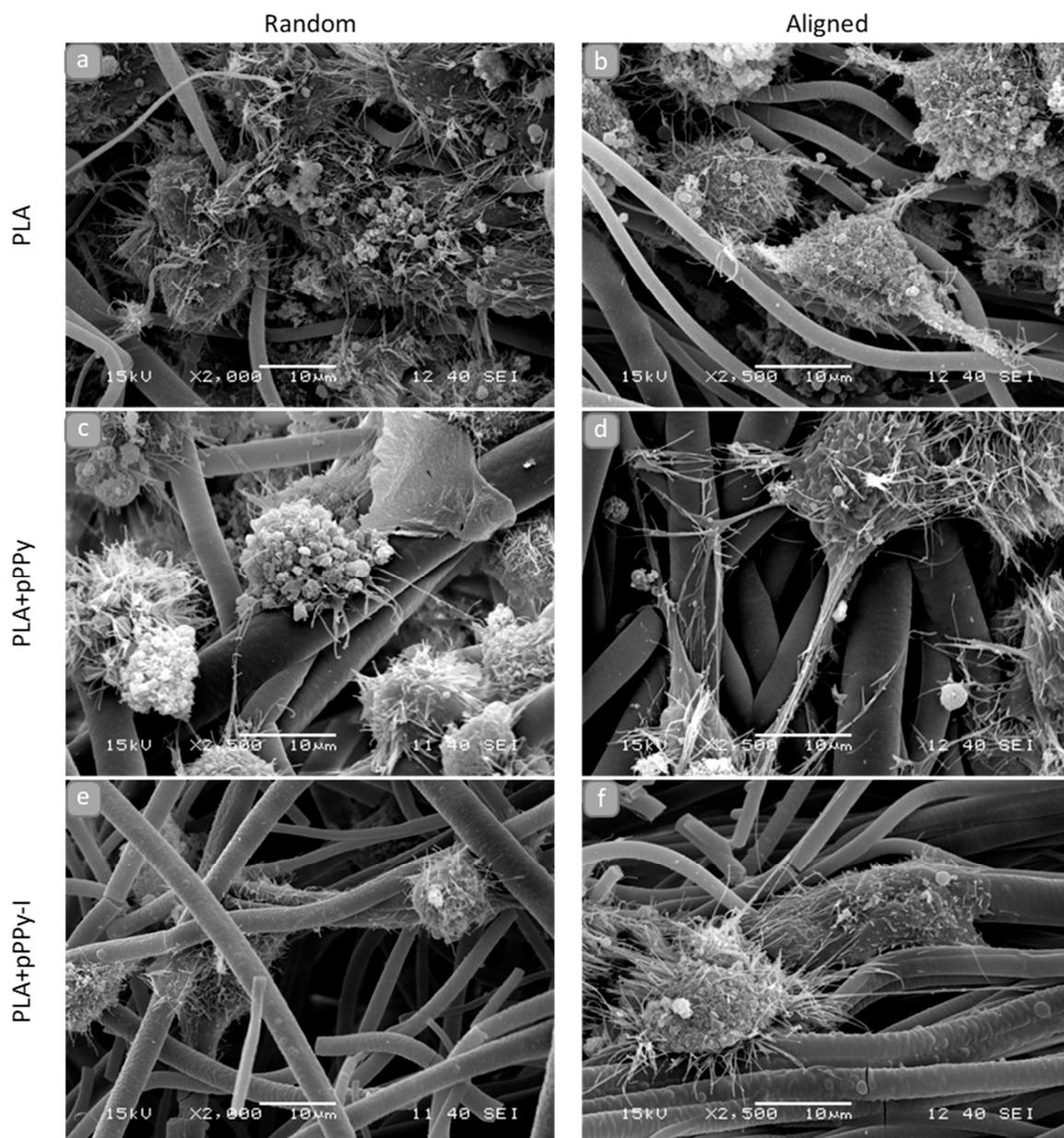


**Figure 11.** Pore area distributions of scaffolds as-fabricated and in culture, presented as box plots. Statistical differences with the Kruskal–Wallis test and Dunn multiple comparison test, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Considering that PLA is hydrophobic [72,73], whereas pPPy and pPPy/I are hydrophilic [45,71], these results suggest that uncoated scaffolds maintained their pore size in culture and the cells occupied available pores, thus reflecting a decrement in pore size. On the other hand, an increment of pore size in coated scaffolds suggests a good interaction of the material within a biologic medium, which in culture absorbs water and swells producing an increase in porosity, allowing cells and nutrients to migrate throughout the porous structure.

### 3.3. Biological Characterization

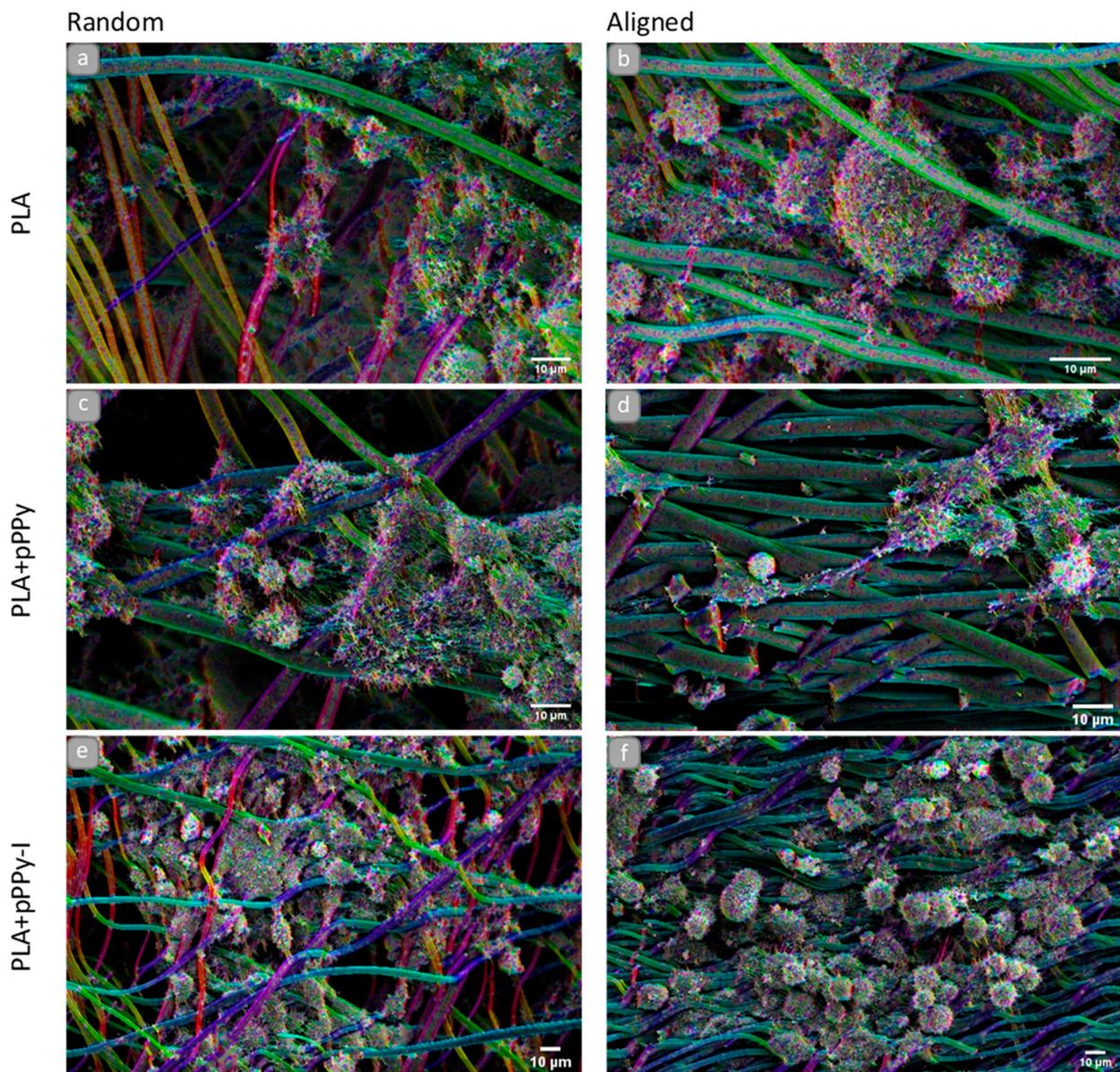
NG108-15 cells were found anchored to all the scaffolds in general, as shown in SEM images of 3D cultures (Figures 12 and 13). Randomly oriented scaffolds induced migration of the cells to inner fibers through the pores formed, as fibers were arbitrarily deposited during the electrospinning process. By contrast, aligned-oriented scaffolds afford elongated pores, which together with the organized fibers constitute a more packed 3D structure, eliciting cell growth over the surface of the scaffolds.



**Figure 12.** SEM images of NG108-15 cells after 15 days of culture on the scaffolds, (a) rPLA, (b) aPLA, (c) rPLA+pPPy, (d) aPLA+pPPy, (e) rPLA+pPPy/I, (f) aPLA+pPPy/I. Bar = 10  $\mu$ m.

However, morphological differences characterized cell response to the material and the structure of the scaffolds. On rPLA, aPLA and rPLA+pPPy scaffolds (Figure 12a–c), cells with blebbing plasma membranes, rounded shapes without filopodia or retracting filopodia were found. Plasma membrane features in the form of filopodia and lamellipodia retraction and bleb formation are a distinct characteristic of cell death processes such as apoptosis and necrosis [74–76]. Although these processes are considered normal, they may be triggered by noxious stimuli from an unfavorable environment [74].

By contrast, cells cultured on aPLA+pPPy, rPLA+pPPy/I and aPLA+pPPy/I scaffolds (Figure 12d–f) show adequate plasma membranes, extending filopodia and forming adhesion sites on the fibers. Furthermore, neurite-like projections from cells cultured on aPLA+pPPy scaffolds, suggesting the potential of aligned pPPy-coated scaffolds for nerve cell guidance and differentiation support.



**Figure 13.** SEM images, color coded for directionality, of NG108-15 cell line on the scaffolds, bar = 10  $\mu\text{m}$ . Orientation] Fiji plugin, gaussian window  $\sigma = 0.7$ , min. Coherency = 2%, min. Energy = 2%. (a) rPLA, (b) aPLA, (c) rPLA+pPPy, (d) aPLA+pPPy, (e) rPLA+pPPy/I, (f) aPLA+pPPy/I.

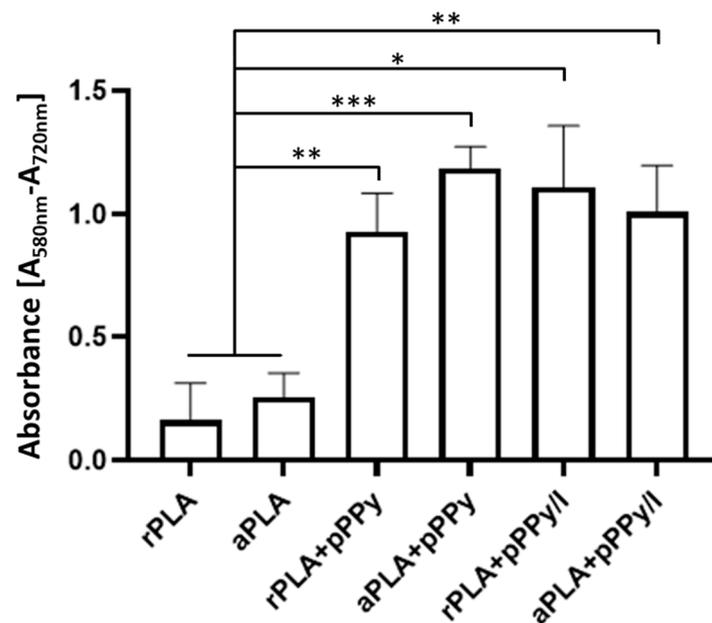
Orientation analysis on cell culture SEM images showed the orientation of cell structures over the fibers (such as filopodia projection direction and plasma membrane morphology response to the surface topography), as shown in Figure 13. Although the filopodia was projected towards adjacent cells and fibers in general, aPLA+pPPy scaffolds promoted the elongation of neurite-like structures in the direction of the fibers (Figure 13d).

Additionally, longer projections and flatter cell morphologies were identified on aPLA+pPPy scaffolds, suggesting a permissive surface for focal adhesion sites and cell attachment. Computational studies of the pyrrole plasma polymer interactions with cell membrane integrins demonstrated that the amine and hydroxy groups on the surface of the polymer have high affinity to the integrins of the cellular membrane [77], which promotes cell attachment to the coated scaffolds. Since detached cells stop proliferation processes [78], by affording cell adhesion sites, the plasma polymer coating thus promotes cell proliferation.

NG108-15 cells are rounded in shape, adherent type, extending filopodia throughout the plasma membrane surface. These filopodia have integrin adhesion receptors which bind to the extracellular matrix and move the cell [79,80]. SEM images in this work show that these cells are responding to aPLA+pPPy scaffolds, without any differentiation chemical stimulus.

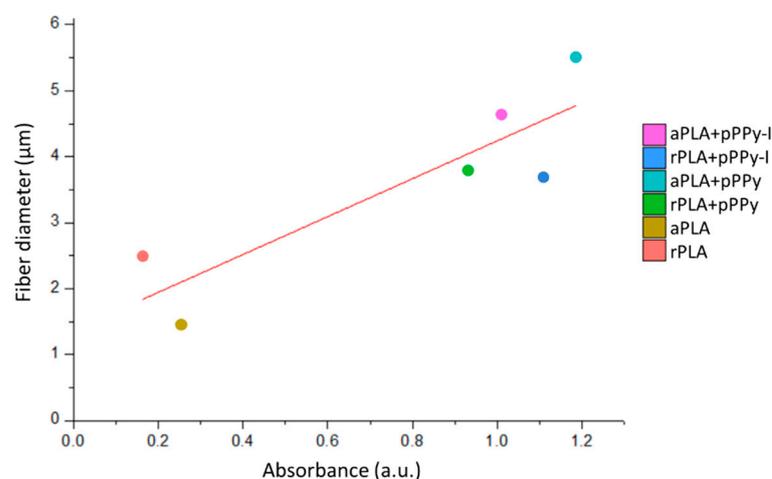
Furthermore, by the implementation of the orientation analysis, slight dispersion of aligned fibers becomes evident in culture, demonstrating good mechanical response from the scaffolds to the culture conditions, such as flexibility and support for cells, while maintaining structural properties of the fibers. These features suggest pPPy- and pPPy/I-coated scaffolds have the potential to be used as implants for peripheral nerves and spinal cord regeneration, cell guidance in aligned structures, and cell therapy applications for neural tissue repair and regeneration, among others.

Cell viability was estimated by the MTT colorimetric assay, the results are reported in Figure 14. By these results, biocompatibility of the scaffolds was verified. Additionally, in accordance with SEM images, significantly higher viability was found in coated scaffolds with respect to PLA scaffolds. Overall, these results show the potential of electrospun pPPy- and pPPy/I-coated scaffolds to bind cells and promote cellular processes such as survival, migration, proliferation, differentiation, and ECM formation [81,82].



**Figure 14.** Cell viability based on the MTT assay results. Estimation of cell viability on each scaffold was based on the absorption from dissolved MTT reduction product by metabolic activity of viable cells [57]. Results are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Additionally, correlations between cell viability and the physicochemical and morphological characteristics of scaffolds were investigated. Linear correlation analysis (Figure 15) showed a Pearson's  $r$  of 0.88 between cell viability results and fiber diameter, suggesting a dependence of adherent cells towards surface characteristics such as adhesion sites availability. Daud et al. also reported a significant difference between cell viability and fiber diameter, such that less neuronal cell viability was found in 1  $\mu\text{m}$  fiber scaffolds than in 5  $\mu\text{m}$  and 8  $\mu\text{m}$  fiber scaffolds [83].



**Figure 15.** Effect of fiber diameter on cell viability. Linear correlation analysis showed a Person's  $r$  of 0.88 between mean cell viability and mean fiber diameter.

Evidently, fiber diameter in this case was also dependent on the composite material, as coated scaffolds afforded larger diameters together with an enriched surface composed by functional groups such as amines, aliphatic sections, nitriles, and broken rings, which promotes cell adhesion and associated physiological processes such as proliferation. Interestingly, since rPLA+pPPy and aPLA+pPPy fiber diameters were not statistically different, higher mean cell viability results in aPLA+pPPy scaffolds suggest cell preference towards aligned scaffolds.

#### 4. Conclusions

Randomly- and aligned-oriented scaffolds were fabricated by electrospinning and used as core structure for novel PLA scaffolds coated with plasma synthesized pyrrole, both doped and undoped with iodine. Scaffold characterization revealed the coated scaffolds provide an enriched surface with primary and secondary amines, nitriles, and aliphatic sections, affording adhesion site availability for cell anchorage. Porosity analysis further demonstrated coated scaffolds' ability for cell infiltration into inner fibers, due to the fibrillar porous structure and enhanced surface hydrophilicity by the plasma pyrrole polymer.

Aligned pPPy-coated scaffolds elicited neurite-like projections without the need of biochemical stimuli on the culture media, which together with the high cell viability results on these scaffolds, suggest their potential for peripheral nerve tissue engineering applications, where directionality serves as a key advantage. Both random and aligned plasma pyrrole polymer-coated scaffolds provided a permissive surface for cell survival and proliferation; nevertheless, randomly-oriented scaffolds afford high surface to volume ratio and larger pore space where higher cell infiltration and anchorage on the substrate may be key for central nervous system tissue engineering strategies. Altogether, these results suggest pPPy- and pPPy/I-coated PLA scaffolds are a promising strategy for neural tissue engineering applications.

**Author Contributions:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing—Original Draft, Writing—Review & Editing, D.M.O.-L.; Conceptualization, Supervision, Resources, J.R.G.-F.; Supervision, Methodology, Investigation, Resources, M.C.A.-G.; Methodology, Supervision, J.M.-C.; Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Writing—Review & Editing, Project administration, R.O.-G.; Supervision, Writing—Review & Editing, A.M.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was partially supported by the projects: CONACyT CF19-263993 and the 2019 Frontier Science Project number 1311312. Osorio-Londoño received a scholarship from CONACyT (CVU. 798910).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** To UAM-I electronic microscopy central laboratory, UAM-I Quantitative X-ray Analysis laboratory, Carlos E. Orozco Barrios and Angélica B. Coyoy Salgado for their technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Doblado, L.R.; Martínez-Ramos, C.; Pradas, M.M. Biomaterials for neural tissue engineering. *Front. Nanotechnol.* **2021**, *3*, 21. [[CrossRef](#)]
2. Papadimitriou, L.; Manganas, P.; Ranella, A.; Stratakis, E. Biofabrication for neural tissue engineering applications. *Mater. Today Biol.* **2020**, *6*, 100043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hanumantharao, S.N.; Rao, S. Multi-functional electrospun nanofibers from polymer blends for scaffold tissue engineering. *Fibers* **2019**, *7*, 66. [[CrossRef](#)]
4. Keshvaridoostchokami, M.; Majidi, S.S.; Huo, P.; Ramachandran, R.; Chen, M.; Liu, B. Electrospun nanofibers of natural and synthetic polymers as artificial extracellular matrix for tissue engineering. *Nanomaterials* **2020**, *11*, 21. [[CrossRef](#)]
5. Kakoria, A.; Sinha-Ray, S. A review on biopolymer-based fibers via electrospinning and solution blowing and their applications. *Fibers* **2018**, *6*, 45. [[CrossRef](#)]
6. Ng, J.-J.; Supaphol, P. Rotating-disk electrospinning: Needleless electrospinning of poly(caprolactone), poly(lactic acid) and poly(vinyl alcohol) nanofiber mats with controlled morphology. *J. Polym. Res.* **2018**, *25*, 155. [[CrossRef](#)]
7. Moon, S.; Gil, M.; Lee, K.J. Syringeless electrospinning toward versatile fabrication of nanofiber web. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep41424. [[CrossRef](#)]
8. Yan, X.; Yu, M.; Ramakrishna, S.; Russell, S.J.; Long, Y.-Z. Advances in portable electrospinning devices for in situ delivery of personalized wound care. *Nanoscale* **2019**, *11*, 19166–19178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Shahriar, S.M.S.; Mondal, J.; Hasan, M.N.; Revuri, V.; Lee, D.Y.; Lee, Y.-K. Electrospinning nanofibers for therapeutics delivery. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 532. [[CrossRef](#)]
10. Xiao, Z.; Zhao, Y.; Chen, B.; Dai, J. *Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair: From Proof of Concept to First In-Human Studies and Clinical Trials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 603–619.
11. Garrudo, F.F.; Mikael, P.E.; Rodrigues, C.A.; Udangawa, R.W.; Paradiso, P.; Chapman, C.A.; Hoffman, P.; Colaço, R.; Cabral, J.M.; Morgado, J.; et al. Polyaniline-polycaprolactone fibers for neural applications: Electroconductivity enhanced by pseudo-doping. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *120*, 111680. [[CrossRef](#)]
12. Hurtado, A.; Cregg, J.; Wang, H.B.; Wendell, D.F.; Oudega, M.; Gilbert, R.J.; McDonald, J.W. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6068–6079. [[CrossRef](#)]
13. Schaub, N.J.; Le Beux, C.; Miao, J.; Linhardt, R.J.; Alauzun, J.G.; Laurencin, D.; Gilbert, R.J. The effect of surface modification of aligned poly-L-lactic acid electrospun fibers on fiber degradation and neurite extension. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136780. [[CrossRef](#)]
14. Sudwilai, T.; Ng, J.J.; Boonkrai, C.; Israsena, N.; Chuangchote, S.; Supaphol, P. Polypyrrole-coated electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold: Effects of coating on electrical conductivity and neural cell growth. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 1240–1252. [[CrossRef](#)]
15. Alves, C.M.; Yang, Y.; Marton, D.; Carnes, D.L.; Ong, J.L.; Sylvia, V.L.; Dean, D.D.; Reis, R.L.; Agrawal, C.M. Plasma surface modification of poly(D,L-lactic acid) as a tool to enhance protein adsorption and the attachment of different cell types. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Saini, P.; Arora, M.; Kumar, M.R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 47–59. [[CrossRef](#)]
17. Niu, Y.; Stadler, F.J.; Fu, M. Biomimetic electrospun tubular PLLA/gelatin nanofiber scaffold promoting regeneration of sciatic nerve transection in SD rat. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *121*, 111858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Fawcett, J.W.; Keynes, R.J. Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **1990**, *13*, 43–60. [[CrossRef](#)]
19. Imani, F.; Karimi-Soflou, R.; Shabani, I.; Karkhaneh, A. PLA electrospun nanofibers modified with polypyrrole-grafted gelatin as bioactive electroconductive scaffold. *Polymer* **2021**, *218*, 123487. [[CrossRef](#)]
20. Mozaffari, A.; Gashti, M.P.; Mirjalili, M.; Parsania, M. Argon and argon–oxygen plasma surface modification of gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Membranes* **2021**, *11*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Choi, M.; Sultana, T.; Park, M.; Lee, B.-T. Fibroblast cell derived extracellular matrix containing electrospun scaffold as a hybrid biomaterial to promote in vitro endothelial cell expansion and functionalization. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *120*, 111659. [[CrossRef](#)]
22. Manzari-Tavakoli, A.; Tarasi, R.; Sedghi, R.; Moghimi, A.; Niknejad, H. Fabrication of nanochitosan incorporated polypyrrole/alginate conducting scaffold for neural tissue engineering. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Balint, R.; Cassidy, N.J.; Cartmell, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2341–2353. [[CrossRef](#)]
24. Gajendiran, M.; Choi, J.; Kim, S.-J.; Kim, K.; Shin, H.; Koo, H.-J.; Kim, K. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *51*, 12–26. [[CrossRef](#)]
25. Rinoldi, C.; Lanzi, M.; Fiorelli, R.; Nakielski, P.; Zembrzycki, K.; Kowalewski, T.; Urbanek, O.; Grippo, V.; Jezierska-Woźniak, K.; Maksymowicz, W.; et al. Three-dimensional printable conductive semi-interpenetrating polymer network hydrogel for neural tissue applications. *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 3084–3098. [[CrossRef](#)]
26. Zarei, M.; Samimi, A.; Khorram, M.; Abdi, M.M.; Golestaneh, S.I. Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for tissue engineering application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *168*, 175–186. [[CrossRef](#)]
27. Jafarkhani, M.; Salehi, Z.; Nematian, T. Preparation and characterization of chitosan/graphene oxide composite hydrogels for nerve tissue engineering. *Mater. Today Proc.* **2018**, *5*, 15620–15628. [[CrossRef](#)]
28. Shafiee, A.; Kehtari, M.; Zarei, Z.; Soleimani, M.; Varshochian, R.; Ahmadi, A.; Atyabi, F.; Dinarvand, R. An in situ hydrogel-forming scaffold loaded by PLGA microspheres containing carbon nanotube as a suitable niche for neural differentiation. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *120*, 111739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jarrin, S.; Cabré, S.; Dowd, E. The potential of biomaterials for central nervous system cellular repair. *Neurochem. Int.* **2021**, *144*, 104971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Flores-Sánchez, M.G.; Islas-Arteaga, N.C.; Raya-Rivera, A.M.; Esquiliano-Rendon, D.R.; Morales-Corona, J.; Uribe-Juarez, O.E.; Vivar-Velázquez, F.I.; Ortiz-Vázquez, G.P.; Olayo, R. Effect of a plasma synthesized polypyrrole coverage on polylactic acid/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2021**, *109*, 2199–2211. [[CrossRef](#)]
31. Flores-Sánchez, M.G.; Raya-Rivera, A.M.; Esquiliano-Rendon, D.R.; Ontiveros-Nevarés, P.G.; Islas-Arteaga, N.C.; Morales-Corona, J.; Olayo, R. Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue–bone in vivo: Study in rabbit. *Int. J. Polym. Mater.* **2017**, *67*, 427–437. [[CrossRef](#)]
32. Islas-Arteaga, N.C.; Rivera, A.R.; Rendon, D.R.E.; Morales-Corona, J.; Ontiveros-Nevarés, P.G.; Sánchez, M.G.F.; Mojica-Cardoso, C.; Olayo, R. Electrospun scaffolds with surfaces modified by plasma for regeneration of articular cartilage tissue: A pilot study in rabbit. *Int. J. Polym. Mater.* **2018**, *68*, 1089–1098. [[CrossRef](#)]
33. Cortés-Ortiz, E.; Olayo-Valles, R.; Rodríguez-Talavera, R.; González-Torres, M.; Vargas-Muñoz, S.; Olayo, R.; Godínez-Fernández, R.; Juárez, O.E.U.; Morales-Corona, J. Plasma functionalized scaffolds of polyhydroxybutyrate electrospun fibers for pancreatic beta cell cultures. *Front. Mater.* **2021**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)]
34. Cruz, Y.; Muñoz, E.; Gomez-Pachón, E.Y.; Morales-Corona, J.; Olayo-Lortia, J.; Olayo, R.; Olayo-Valles, R. Electrospun PCL-protein scaffolds coated by pyrrole plasma polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2019**, *30*, 832–845. [[CrossRef](#)]
35. Zuñiga-Aguilar, E.; Olayo, R.; Ramirez-Fernandez, O.; Morales, J.; Godínez, R. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 729–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Alvarez-Mejía, L.; Morales, J.; Cruz, G.J.; Olayo, M.-G.; Olayo, R.; Diaz-Ruiz, A.; Ríos, C.; Mondragon-Lozano, R.; Sanchez-Torres, S.; Morales-Guadarrama, A.; et al. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2015**, *26*, 1–11. [[CrossRef](#)]
37. Mondragon-Lozano, R.; Ríos, C.; Roldan-Valadez, E.; Cruz, G.J.; Olayo, M.G.; Olayo, R.; Salgado-Ceballos, H.; Morales, J.; Mendez-Armenta, M.; Alvarez-Mejía, L.; 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. *Spine J.* **2017**, *17*, 562–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fabela-Sánchez, O.; Salgado-Ceballos, H.; Medina-Torres, L.; Alvarez-Mejía, L.; Sanchez-Torres, S.; Mondragón-Lozano, R.; Morales-Guadarrama, A.; Diaz-Ruiz, A.; Olayo, M.-G.; Cruz, G.J.; et al. Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2017**, *29*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sánchez-Torres, S.; Díaz-Ruiz, A.; Ríos, C.; Olayo, M.G.; Cruz, G.J.; Olayo, R.; Morales, J.; Mondragon-Lozano, R.; Fabela, O.; Orozco-Barrios, C.; et al. Recovery of motor function after traumatic spinal cord injury by using plasma-synthesized polypyrrole/iodine application in combination with a mixed rehabilitation scheme. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, 1–18. [[CrossRef](#)]
40. Olayo, R.; Ríos, C.; Salgado-Ceballos, H.; Cruz, G.J.; Morales, J.; Olayo, M.G.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Alvarez-Mejía, L.; Mondragon-Lozano, R.; Morales, A.; et al. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2008**, *19*, 817–826. [[CrossRef](#)]
41. Cruz, G.J.; Mondragon-Lozano, R.; Díaz-Ruiz, A.; Manjarrez, J.; Olayo, R.; Salgado-Ceballos, H.; Olayo, M.-G.; Morales, J.; Alvarez-Mejía, L.; Morales, A.; et al. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2012**, *23*, 2583–2592. [[CrossRef](#)]
42. Morales-Guadarrama, A.; Salgado-Ceballos, H.; Grijalva, I.; Morales, J.; Ríos, C.; Cruz, G.J.; Diaz-Ruiz, A.; Olayo, M.-G.; Alvarez-Mejía, L.; Mondragón-Lozano, R.; et al. Spinal cord injury of rhesus monkey implanted with PPy/I plasma polymer, MRI study. In Proceedings of the VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina, 29–31 October 2014; pp. 174–177.

43. Hosono, K.; Matsubara, I.; Murayama, N.; Shin, W.; Izu, N.; Kanzaki, S. Structure and properties of plasma polymerized and 4-ethylbenzenesulfonic acid-doped polypyrrole films. *Thin Solid Films* **2003**, *441*, 72–75. [CrossRef]
44. Cruz, G.; Morales, J.; Olayo, R. Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films* **1999**, *342*, 119–126. [CrossRef]
45. Colin, E.; Olayo, M.; Cruz, G.; Carapia, L.; Morales, J.; Olayo, R. Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body. *Prog. Org. Coat.* **2009**, *64*, 322–326. [CrossRef]
46. Kumar, S.; Nakamura, K.; Nishiyama, S.; Ishii, S.; Noguchi, H.; Kashiwagi, K.; Yoshida, Y. Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films. *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 2705–2711. [CrossRef]
47. Cruz, G.; Morales, J.; Castillo-Ortega, M.; Olayo, R. Synthesis of polyaniline films by plasma polymerization. *Synth. Met.* **1997**, *88*, 213–218. [CrossRef]
48. Fonseca, L.M.M.; Medeiros, M.J.; Góes, F.S.N.; Zamberlan-Amorim, N.E.; Scochi, C.G.S. Evaluation of the digital learning object taking care of the sensory environment in neonatal units: Noise, light and handling. *Procedia Soc. Behav. Sci.* **2012**, *46*, 509–514. [CrossRef]
49. Baji, A.; Mai, Y.-W.; Wong, S.-C.; Abtahi, M.; Chen, P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos. Sci. Technol.* **2010**, *70*, 703–718. [CrossRef]
50. Hamprecht, B. Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. *Adv. Appl. Microbiol.* **1977**, *49*, 99–170. [CrossRef]
51. Israëil, M.; Lesbats, B.; Synguelakis, M.; Joliot, A. Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15, glioma and neuroblastoma cells—Role of a 16 kDa membrane protein in release. *Neurochem. Int.* **1994**, *25*, 103–109. [CrossRef]
52. Molnar, P.; Hickman, J.J. Modeling of action potential generation in NG108-15 cells. *Adv. Struct. Saf. Stud.* **2014**, *1183*, 253–261. [CrossRef]
53. Tojima, T.; Yamane, Y.; Takahashi, M.; Ito, E. Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. *Neurosci. Res.* **2000**, *37*, 153–161. [CrossRef]
54. Osorio-Londoño, D.; Godínez-Fernández, J.R.; Acosta-García, M.C.; Morales-Corona, J.; Olayo-González, R. Morphology and viability of nerve cells cultured on plasma polymerized polypyrrole-coated scaffolds. In Proceedings of the VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering, Cancún, Mexico, 2–5 October 2019; pp. 652–655.
55. Rezakhanliha, R.; Agianniotis, A.; Schrauwen, J.T.C.; Griffa, A.; Sage, D.; Bouten, C.; van de Vosse, F.; Unser, M.; Stergiopoulos, N. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2011**, *11*, 461–473. [CrossRef]
56. Sage, D. OrientationJ: A Series of ImageJ Plugins for Directional Image Analysis. (n.d.). Available online: <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/> (accessed on 24 March 2021).
57. Stoddart, M.J. (Ed.) *Mammalian Cell Viability. Methods and Protocols*; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; Volume 740.
58. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. 2020. Available online: [www.rstudio.com/](http://www.rstudio.com/) (accessed on 7 October 2021).
59. Stuard, B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Analytical Techniques in the Sciences; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2004.
60. St. Thomas. Spectroscopic Tools. (n.d.). Available online: <http://www.science-and-fun.de/tools/> (accessed on 15 March 2021).
61. Morales, J.; Olayo, M.G.; Cruz, G.J.; Olayo, R. Plasma polymerization of random polyaniline-polypyrrole-iodine copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *85*, 263–270. [CrossRef]
62. Vasquez-Ortega, M.; Ortega, M.; Morales, J.; Olayo, M.G.; Cruz, G.J.; Olayo, R. Core-shell polypyrrole nanoparticles obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. *Polym. Int.* **2014**, *63*, 2023–2029. [CrossRef]
63. Jia, L.; Zhang, W.-C.; Tong, B.; Yang, R.-J. Crystallization, mechanical and flame-retardant properties of poly(lactic acid) composites with DOPO and DOPO-POSS. *Chin. J. Polym. Sci.* **2018**, *36*, 871–879. [CrossRef]
64. Wu, Y.; Li, L.; Chen, S.; Qin, J.; Chen, X.; Zhou, D.; Wu, H. Synthesis, characterization, and crystallization behaviors of poly(D-lactic acid)-based triblock copolymer. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12. [CrossRef]
65. Hara, S.; Watanabe, S.; Takahashi, K.; Shimizu, S.; Ikake, H. Preparation of crystallites for oriented poly(lactic acid) films using a casting method under a magnetic field. *Polymers* **2018**, *10*, 1083. [CrossRef]
66. Qin, L.; Qiu, J.; Liu, M.; Ding, S.; Shao, L.; Lü, S.; Zhang, G.; Zhao, Y.; Fu, X. Mechanical and thermal properties of poly(lactic acid) composites with rice straw fiber modified by poly(butyl acrylate). *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 772–778. [CrossRef]
67. Zhou, C.; Li, H.; Zhang, W.; Li, J.; Huang, S.; Meng, Y.; Christiansen, J.D.C.; Yu, D.; Wu, Z.; Jiang, S. Thermal strain-induced cold crystallization of amorphous poly(lactic acid). *CrystEngComm* **2016**, *18*, 3237–3246. [CrossRef]
68. Zhang, J.; Tashiro, K.; Tsuji, H.; Domb, A.J. Disorder-to-order phase transition and multiple melting behavior of poly(L-lactide) investigated by simultaneous measurements of WAXD and DSC. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1352–1357. [CrossRef]
69. Lins, L.C.; Wianny, F.; Livi, S.; Dehay, C.; Duchet-Rumeau, J.; Gérard, J.-F. Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 2376–2393. [CrossRef] [PubMed]
70. Pham, Q.P.; Sharma, U.; Mikos, A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1197–1211. [CrossRef]

71. Martín-Pat, G.E.; Rodríguez-Fuentes, N.; Cervantes-Uc, J.M.; Rosales-Ibáñez, R.; Carrillo-Escalante, H.J.; Ku-Gonzalez, A.F.; Avila-Ortega, A.; Hernandez-Sanchez, F. Effect of different exposure times on physicochemical, mechanical and biological properties of PGS scaffolds treated with plasma of iodine-doped polypyrrole. *J. Biomater. Appl.* **2020**, *35*, 485–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Farah, S.; Anderson, D.G.; Langer, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 367–392. [[CrossRef](#)]
73. Elsayy, M.; Kim, K.-H.; Park, J.-W.; Deep, A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *79*, 1346–1352. [[CrossRef](#)]
74. Zhang, Y.; Chen, X.; Gueydan, C.; Han, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* **2018**, *28*, 9–21. [[CrossRef](#)]
75. Wickman, G.R.; Julian, L.; Mardilovich, K.; Schumacher, S.E.; Munro, J.; Rath, N.; Al Zander, S.; Mleczak, A.; Sumpton, D.; Morrice, N.; et al. Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 1293–1305. [[CrossRef](#)]
76. Tixeira, R.; Caruso, S.; Paone, S.; Baxter, A.A.; Atkin-Smith, G.K.; Hulett, M.D.; Poon, I.K.H. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis* **2017**, *22*, 475–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Serratos, I.N.; Olayo, R.; Millan-Pacheco, C.; Morales-Corona, J.; Vicente-Escobar, J.O.; Soto-Estrada, A.M.; Córdoba-Herrera, J.G.; Uribe, O.; Gómez-Quintero, T.; Arroyo-Ornelas, M.Á.; et al. Modeling integrin and plasma-polymerized pyrrole interactions: Chemical diversity relevance for cell regeneration. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7009. [[CrossRef](#)]
78. Assoian, R.K. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 1–4. [[CrossRef](#)]
79. Galbraith, C.G.; Yamada, K.M.; Galbraith, J.A. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* **2007**, *315*, 992–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. ATCC. NG108-15 (ATCC ©HB-12317 TM. 2020. Available online: <https://www.atcc.org> (accessed on 7 October 2021).
81. Delcroix, G.J.-R.; Schiller, P.C.; Benoit, J.-P.; Montero-Menei, C.N. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2105–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–687. [[CrossRef](#)]
83. Daud, M.F.; Pawar, K.; Claeysens, F.; Ryan, A.; Haycock, J.W. An aligned 3D neuronal-glia co-culture model for peripheral nerve studies. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5901–5913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00042

Matrícula: 2163803112

Implante de andamios recubiertos con polímero de pirrol plasma dopado con yodo en lesión medular.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 8 del mes de noviembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GUSTAVO PACHECO LOPEZ  
DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO  
DR. LUIS CONCHA LOYOLA  
DR. ERNESTO ALEJANDRO ROLDAN VALADEZ  
DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: DIANA MARIA OSORIO LONDOÑO

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

Aprobar

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



*Diana Osorio L.*

DIANA MARIA OSORIO LONDOÑO  
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

*Roman Linares Romero*

DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. GUSTAVO PACHECO LOPEZ

VOCAL

DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO

VOCAL

DR. LUIS CONCHA LOYOLA

VOCAL

DR. ERNESTO ALEJANDRO ROLDAN VALADEZ

SECRETARIA

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO