



Casa abierta al tiempo

10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Básicas e Ingeniería

TRACTOGRAFÍA DTI EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL CON IMPLANTE DE POLÍMERO PPY/I SINTETIZADO POR PLASMA

Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

Presenta:

**Juan Carlos Axayacatl Morales
Guadarrama**

Director de Tesis:

Dr. Roberto Olayo González

México, D.F. Mayo 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

**TRACTOGRAFÍA DTI EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE
MÉDULA ESPINAL CON IMPLANTE DE POLÍMERO PPY/I SINTETIZADO
POR PLASMA**

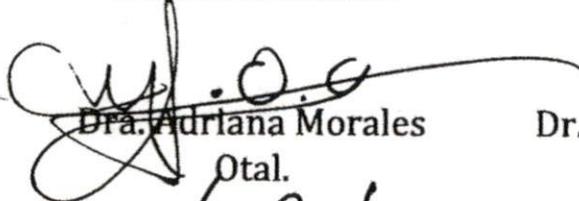
Presenta:

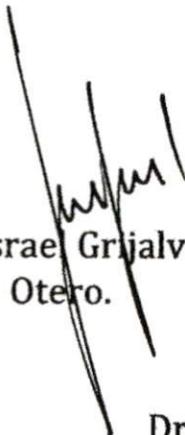
M. en C. Juan Carlos Axayacatl Morales Guadarrama

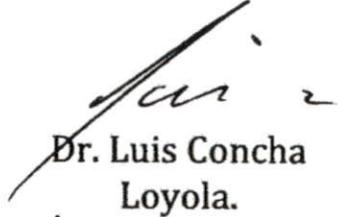
Director de Tesis:

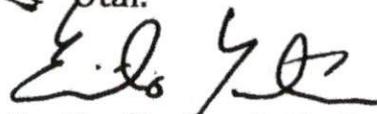
Dr. Roberto Olayo González

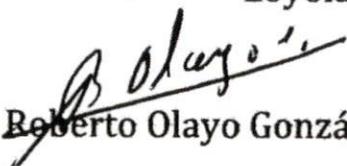
Comité Evaluador


Dra. Adriana Morales
Ojal.


Dr. Israe Grijalva
Otero.


Dr. Luis Concha
Loyola.


Dr. Emilio Sacristán Rock


Dr. Roberto Olayo González.

México, D.F. Mayo 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

**TRACTOGRAFÍA DTI EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE
MÉDULA ESPINAL CON IMPLANTE DE POLÍMERO PPY/I SINTETIZADO
POR PLASMA**

Presenta:

M. en C. Juan Carlos Axayacatl Morales Guadarrama

Director de Tesis:

Dr. Roberto Olayo González

Comité Evaluador

Dra. Adriana Morales
Otal.

Dr. Israel Grijalva
Otero.

Dr. Luis Concha
Loyola.

Dr. Emilio Sacristán Rock

Dr. Roberto Olayo González.

México, D.F. Mayo 2014

Agradecimientos

Por su colaboración, apoyo y amistad:

Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Roberto Olayo González.
Dr. Juan Morales Corona.
M. en C. Álvarez-Mejía Ana Laura.
M. en C. Mondragón-Lozano Rodrigo.
M. en C. Sánchez-Torres Stephanie.
M. en C. Fabela-Sánchez Omar Felipe.

Proyecto Camina A.C.

Dra. Hermelinda-Salgado Ceballos.
Antrop. Fís. Hernández-Godínez Braulio.
M.V.Z. Ibañez-Contreras Alejandra.

Instituto Mexicano del Seguro Social Hospital de Especialidades en Enfermedades Neurológicas

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos.
Dr. José Efrén Israel Grijalva Otero.

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Dra. Guadalupe Olayo González.
Dr. Guillermo Cruz Cruz.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Dra. Araceli Díaz Rufz.
Dr. Camilo Ríos Castañeda.

Centro Nacional de Investigación en imagenología e Instrumentación Médica

Dr. Emilio Sacristán Rock.	Dr. Azpiroz Leehan Joaquín.
M. en I. Andrés Morón.	M. en C. Miguel Cadena.
Ing. Fernanda Maldonado Sandoval.	Ing. Rafael Lara Estrada.
T.R. Alejandro Sánchez Herrera.	Dr. Luis Jiménez Ángeles.

Al personal académico y administrativo del CI3M

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al programa de becas para estudios de posgrado, proyectos: CONACyT - 155239, ICy-T-DF-PIUTE

10-63, 276/2010

Los procedimientos quirúrgicos de este trabajo fueron realizados:

- **Roedores.** Laboratorio de Proyecto Camina A.C. el cual cuenta con un quirófano equipado, un bioterio especializado en roedores y una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños.
- **Primates no humanos.** Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica. El cual cuenta con un quirófano experimental. Los cuidados post operatorios fueron realizados en CAMINA A.C. en la unidad de cuidados para primates no humanos.

Los estudios histológicos fueron realizados en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI IMSS y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

La síntesis del polímero y su caracterización fue realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa en el laboratorio de Polimerización por Plasma, Física y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Los estudios de imágenes por resonancia magnética de 3 Teslas y 7 Teslas fueron realizados en el Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica.

*The only laws of matter are those that our minds must fabricate and
the only laws of mind are fabricated for it by matter.*

James Clerk Maxwell

*An expert is a person who has found out by his own painful experience
all the mistakes that one can make in a very narrow field.*

Niels Henrik David Bohr

*Study and in general the pursuit of truth and beauty is a sphere of activity in which
we are permitted to remain children all our lives.*

Albert Einstein

*In Othin ihuan in tonaltin nican amo tzonquica
nemi tinej nemij in cem anahuac yolotl.*

Axayacatl Morales-Guadarrama

Para Liliana García.

Para mis padres.

Para mis hijos.

Para mi familia, hermanos y amigos.

Resumen

La lesión de médula espinal causa una discapacidad neurológica grave, en dicha lesión la función de transmitir señales desde y hacia el cerebro a través de la médula espinal se ve comprometida, generando así paraplejia o tetraplejia según el nivel en el que ocurre la lesión, la lesión de médula espinal afecta principalmente a la población económicamente activa, con gran repercusión médica y socioeconómica. Actualmente no existe una estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica normal, debido a la alta complejidad de la fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal tanto en su atapa aguda como en su etapa crónica.

Se ha demostrado que implantes de polímeros derivados del pirrol y sintetizados por plasma en modelos de ratas a los que se les indujo una lesión traumática de la médula espinal contribuyen a la recuperación funcional de los roedores y favorecen en la protección del tejido nervioso adyacente a la lesión, tanto en un modelo de lesión por sección completa como en un modelo de lesión por contusión, al ser comparados contra sujetos con lesión de médula espinal sin implantarles el polímero.

Los estudios en modelos animales del tipo roedores, han contribuido en gran medida, a una mayor comprensión de la fisiopatología de la lesión de médula espinal y han servido para poner a prueba varias estrategias de tratamiento enfocadas en recuperar permanentemente la función motora y sensorial; así como para prevenir secuelas neurológicas. Sin embargo, no ha sido posible traducir estos hallazgos eficazmente a mejorar los tratamientos para la lesión de médula espinal en humano. La traducción de los estudios con roedores hacia los seres humanos ha sido limitada y esto es debido a las diferencias en tamaño, metabolismo, características neuroanatómicas y neurofuncionales entre ambas especies. Por lo tanto, para facilitar la traducción de los avances producidos en el laboratorio a la clínica, está siendo altamente recomendado el uso de primates no humanos.

Actualmente se estudian los mecanismos implicados con la interacción de implantes poliméricos derivados del pirrol sintetizados por plasma y la lesión de médula espinal, mediante estudios histológicos, inmunohistoquímicos, potenciales evocados, etc.; aunque, dichos estudios son necesarios para poder establecer la integración implante-lesión de médula espinal, los procedimientos son invasivos o terminales.

Con estudios como imágenes por resonancia magnética es posible realizar un análisis *in vivo* del estado del tejido afectado y circundante a la lesión de manera no invasiva e inclusive usar el mismo sujeto experimental como su control a través del tiempo. Así mismo, con técnicas especiales de imágenes por resonancia magnética como: imágenes por tensor de difusión (la cual cuantifica la preferencia direccional de la difusión de agua en la materia blanca) y tractografía (donde de acuerdo a las propiedades locales de difusión se reconstruye en tres dimensiones la conectividad axonal siguiendo el eje principal de la difusión de una zona a otra a lo largo de fibras anatómicamente conectadas), se puede determinar inclusive la interrupción o la continuidad de los axones.

En éste trabajo se realizaron estudios por imágenes de resonancia magnética en 7 Teslas en un modelo de lesión de ratas, para el procesamiento y la cuantificación del tejido circundante a la lesión por sección completa de médula espinal. También, se obtuvieron imágenes de resonancia magnética en 3 Teslas con secuencias estándares e imágenes por tensor de difusión, donde se dio seguimiento a la lesión y por lo tanto al tejido en la zona de lesión, buscando diferencias en la conservación ó pérdida del tejido nervioso y el crecimiento de tejido en la zona de lesión entre dos primates no humanos (de la raza Macaca Mulatta): uno con lesión por sección completa de la médula espinal y el otro con lesión por sección completa de la médula espinal más una implante de pastilla de polipirrol dopado con Yodo sintetizado por plasma.

En ambos modelos (roedores y primates no humanos), la morfometría permitió observar el contraste que existe en la histoarquitectura entre los diferentes sujetos: en los sujetos control hay una gran destrucción de la histoarquitectura en la zona de lesión, comparada con los sujetos implantados, en los cuales existe una mayor conservación de la histoarquitectura aledaña a la zona de lesión. Para los primates no humanos, la recuperación de la fracción de anisotropía en la zona de lesión del sujeto implantado indica recuperación de la difusión estructurada a través del tiempo, en contraste con la disminución de la fracción de anisotropía en el sujeto no implantado. Con el calculo de la tractografía se pudo observar la reconexión en la difusión de agua en el primate no humano implantado; reconstruyendo tridimensionalmente la estructura de la materia blanca se observó la reconexión de paquetes de tractos nerviosos a diferencia de el sujeto control, el cual muestra un incremento en la separación de los extremos caudal y cefálico respecto al epicentro de la lesión por sección completa del médula espinal, así como la formación de siringomielia post traumática.

El implante de polipirrol dopado con Yodo mostró contribuir, también en primates no humanos, a la conservación de la histoarquitectura en la zona de lesión al ser implantado después de un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal, promoviendo a su vez el crecimiento de tejido a través de él.

Con el procedimiento de imágenes de resonancia magnética mostrado en éste trabajo es posible dar seguimiento *in vivo* al estado de el tejido circundante a la zona de lesión tanto en modelo de ratas como en modelo de primates no humanos, sin importar el modelo específico de lesión, inclusive es posible extrapolar los estudios y el procesamiento a la clínica para dar seguimiento a lesiones de médula espinal en humanos.

Tabla de contenido

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	1
LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL.....	2
<i>Epidemiología</i>	4
<i>Edad de riesgo</i>	5
<i>Nivel neurológico y magnitud de la lesión</i>	5
<i>Patofisiología</i>	6
Lesión primaria.....	6
Lesión secundaria.....	7
Interrupción axonal y degeneración Walleriana.....	9
USO DE POLÍMEROS SINTETIZADOS POR PLASMA DERIVADOS DEL PIRROL PARA LA NEUROPROTECCIÓN Y RECONEXIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	11
IMÁGENES POR RESONANCIA MAGNÉTICA.....	14
<i>Imágenes por Tensor Difusión</i>	16
<i>Difusión en la médula espinal</i>	22
TENSOR DE DIFUSIÓN.....	23
TRACTOGRAFÍA.....	26
CAPÍTULO 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
SÍNTESIS DEL MATERIAL.....	32
ESTUDIO DE IRM EN LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE RATAS IMPLANTADAS CON PPy/I [53].....	35
<i>Modelo de Lesión e Implante</i>	36
<i>Imágenes de Resonancia Magnética</i>	38
<i>Obtención de Médula Espinal de Ratas Lesionadas y Procedimiento Histológico</i>	39
TRACTOGRAFÍA DTI EN LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL CON IMPLANTE DE POLÍMERO PPy/I SINTETIZADO POR PLASMA EN MONO RHESUS (MACACA MULATTA).....	41
<i>Modelo de lesión e Implante en Mono Rhesus</i>	42
<i>Estudios de Imágenes por Resonancia Magnética</i>	48
CAPÍTULO 3 RESULTADOS	50
CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL.....	51

<i>Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)</i>	51
<i>Propiedades eléctricas</i>	53
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	53
<i>Análisis de Rayos-X</i>	54
<i>Análisis Morfológico</i>	55
ESTUDIO DE IRM EN LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE RATAS IMPLANTADAS CON PPy/I.....	57
<i>Análisis Histológico</i>	57
<i>Imágenes de Resonancia Magnética</i>	60
DTI TRACTOGRAFÍA E IRM EN ISQUEMIA CEREBRAL CRÓNICA DE MONO IN VIVO [57].....	64
TRACTOGRAFÍA DTI EN LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL CON IMPLANTE DE POLÍMERO PPy/I SINTETIZADO POR PLASMA EN MONO RHESUS (MACACA MULATTA)	71
<i>Estudios de Imágenes por Resonancia Magnética</i>	71
Mono Rhesus Control.....	71
Mono Rhesus Implantado con pastilla PPy/I.....	76
<i>Morfometría</i>	78
Mono Rhesus Control.....	78
Mono Rhesus con implante PPy/I.....	86
<i>Imágenes por Tensor de Difusión</i>	94
Fracción de Anisotropía.....	97
Tractografía.....	100
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES.....	109
PERSPECTIVAS.....	111

Índice de Figuras

FIG. 1 EXTENSIÓN DE LA LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE ACUERDO AL NIVEL DE LA LESIÓN.....	3
FIG. 2 PACIENTES REGISTRADOS POR AÑO DESDE EL 2004 HASTA INICIOS DEL 2012 EN E.U.	4
FIG. 3 HISTOLOGÍAS DE MÉDULA ESPINAL 1 HORA Y 60 DÍAS POST LESIÓN	7
FIG. 4. ESQUEMA DE MÉDULA ESPINAL DESPUÉS DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL.....	8
FIG. 5 LOS DOS PRINCIPALES MECANISMOS DE CONTRASTE EN IMÁGENES POR RESONANCIA MAGNÉTICA: T1 Y T2.....	15
FIG. 6 ESQUEMA DE LA VARIACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE UNA POBLACIÓN MOLECULAR CON EL TIEMPO EN DIFUSIÓN LIBRE.....	17
FIG. 7 SECUENCIA SPIN ECHO.	18
FIG. 8 DIAGRAMA DE LA SECUENCIA DE STEJSKAL-TANNER PARA EL CÁLCULO DE LA DIFUSIÓN	19
FIG. 9 SECUENCIA DE DIFUSIÓN <i>SPIN ECHO</i>	20
FIG. 10 DIFUSIÓN ISOTRÓPICA Y ANISOTRÓPICA.....	22
FIG. 11 ELIPSOIDES DE DIFUSIÓN	23
FIG. 12 DEMOSTRACIÓN DE EL ESPACIO DE FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA).....	25
FIG. 13 REPRESENTACIÓN GRAFICA DE GLIFOS CALCULADOS A PARTIR DE LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA) Y EL MAPA DE PREFERENCIA DE DIFUSIÓN.....	25
FIG. 14 ESQUEMA QUE MUESTRA EL TRAZADO DE LA SUSTANCIA BLANCA.....	26
FIG. 15 TRACTOGRAFÍA EN CEREBRO DE MONO RHESUS SANO	27
FIG. 16 TRACTOGRAFÍA EN CEREBRO DE MONO RHESUS SOBRE EL PLANO AXIAL Y VISTA CRÁNEO-CAUDAL DE LA VÍA ÓPTICA	28
FIG. 17 SUPERPOSICIÓN DE TRACTOGRAFÍA Y RECONSTRUCCIÓN 3D T2W	29
FIG. 18 ESQUEMA DEL SISTEMA DE POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....	32
FIG. 19 REACTOR DE POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.	33
FIG. 20 MICROFOTOGRAFÍAS SEM DE POLIPIRROL DOPADO CON YODO.....	34
FIG. 21 RECONSTRUCCIÓN 3D A PARTIR DE IRM DE MÉDULA ESPINAL.	35
FIG. 22 RECONSTRUCCIÓN DE LAMINECTOMÍA REALIZADA.....	36
FIG. 23 MÉDULA ESPINAL DE RATA EXPUESTA.....	37
FIG. 24 MÉDULA ESPINAL DE RATA EXTIRPADA CON SECCIÓN COMPLETA CON POLÍMERO A TRAVÉS DE ELLA.....	38
FIG. 25 IRM ADQUIRIDA EN EQUIPO VARIAN 7T CON SECUENCIA ESTÁNDAR GRADIENTE ECO.....	39
FIG. 26 PREPARACIÓN DE RHESUS PARA LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL.....	44
FIG. 27 MODELO DE LESIÓN EN MONO RHESUS	44
FIG. 28 LAMINECTOMÍA EN MONO RHESUS	45
FIG. 29 CORTE TRANSVERSAL COMPLETO DE LA MÉDULA ESPINAL	45

FIG. 30 IRM PONDERADA EN T2.....	47
FIG. 31 RECONSTRUCCIÓN 3D DE COLUMNA VERTEBRAL INTACTA.....	48
FIG. 32 ESPECTRO DE INFRARROJO DE PPy/I.....	51
FIG. 33 DESCOMPOSICIÓN TÉRMICA DEL PPy/I.....	54
FIG. 34 DIFRACTO GRAMA DE RAYOS-X DE PPy/I.....	55
FIG. 35 MICROFOTOGRAFÍA SEM DE PPy/I.....	56
FIG. 36 MICROFOTOGRAFÍAS LATERALES SEM.....	56
FIG. 37 HISTOLOGÍAS DE LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL A UNA SEMANA POST LESIÓN.....	57
FIG. 38 HISTOLOGÍA DE IMPLANTE DE PPy/I EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL A DOS SEMANAS POST LESIÓN.....	58
FIG. 39 HISTOLOGÍAS DE LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL A CUATRO SEMANAS POST-LESIÓN.....	59
FIG. 40 HISTOLOGÍAS DE LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE MÉDULA ESPINAL A OCHO SEMANAS POST-LESIÓN.....	59
FIG. 41 IRM POST PROCESADA. ACERCAMIENTO DEL ÁREA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	60
FIG. 42 IRM POST PROCESADA EN ZONA DE LESIÓN.....	61
FIG. 43 RECONSTRUCCIÓN 3D DE IRM DE MÉDULA DISECADA.....	61
FIG. 44 SECCIÓN AXIAL DEL EPICENTRO DE LESIÓN.....	62
FIG. 45 RECONSTRUCCIÓN DE SUPERFICIE GENERADA POR MATERIA GRIS.....	62
FIG. 46 SUPERFICIES RECONSTRUIDAS.....	63
FIG. 47 ACERCAMIENTO A LA FUSIÓN DE LAS SUPERFICIES DE PPy/I Y TEJIDO NERVIOSO.....	63
FIG. 48 IRM DE MONO RHESUS CON ATAQUE ISQUÉMICO.....	64
FIG. 49 VISTA CORONAL COMPUESTA PONDERADA EN T1.....	66
FIG. 51 ANGIORESONANCIA DE RHESUS CON ATAQUE ISQUÉMICO.....	67
FIG. 52 RECONSTRUCCIÓN 3D ANGIORESONANCIA E IRM T2.....	68
FIG. 53 TRACTOGRAFÍA CEREBRO DE RHESUS SANO.....	69
FIG. 54 TRACTOGRAFÍA DE RHESUS CON ATAQUE ISQUÉMICO.....	70
FIG. 55 IRM BASAL DE MONO RHESUS CONTROL: T2 Y DENSIDAD DE PROTONES.....	72
FIG. 56 IMÁGENES DTI EN MONO RHESUS CONTROL.....	73
FIG. 57 IMÁGENES DTI EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE FA.....	74
FIG. 58 IRM T2 PARA MONO RHESUS CONTROL EN LA ZONA DE LESIÓN.....	75
FIG. 59 IRM DENSIDAD DE PROTONES Y T2 PARA MONO RHESUS IMPLANTADO.....	76
FIG. 60 IRM-T2 EN MONO RHESUS CON IMPLANTE EN ZONA DE LESIÓN A TRES MESES POST LESIÓN.....	77
FIG. 61 MORFOMETRÍA DE LA ZONA DE LESIÓN EN MONO RHESUS CONTROL A PARTIR DE IRM.....	79
FIG. 62 MORFOMETRÍA DE CICATRIZ Y QUISTE EN MONO RHESUS CONTROL.....	80
FIG. 63 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS CONTROL SANO.....	81
FIG. 64 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN MONO RHESUS CONTROL EL DÍA DE LA LESIÓN.....	82
FIG. 65 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN MONO RHESUS CONTROL UN MES POST LESIÓN.....	83
FIG. 66 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN MONO RHESUS CONTROL DOS MESES POST LESIÓN.....	84

FIG. 67 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN MONO RHESUS CONTROL TRES MESES POST LESIÓN.....	85
FIG. 68 MORFOMETRÍA DE LA ZONA DE LESIÓN EN MONO RHESUS CON IMPLANTE A PARTIR DE IRM.....	87
FIG. 69 MORFOMETRÍA DE PPy/I EN MONO RHESUS IMPLANTADO.	88
FIG. 70 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS PARA IMPLANTE, ANTES DE LA LESIÓN.	89
FIG. 71 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS IMPLANTADO, EL DÍA DE LA LESIÓN.	90
FIG. 72 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS IMPLANTADO, UN MES POST LESIÓN.....	91
FIG. 73 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS IMPLANTADO, DOS MESES POST LESIÓN.....	92
FIG. 74 SEGMENTACIÓN DE MÉDULA ESPINAL DE MONO RHESUS IMPLANTADO, TRES MESES POST LESIÓN.....	93
FIG. 75 ROI DEFINIDO PARA MEDIR FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA.	94
FIG. 76 TRACTOGRAFÍA DE LA MÉDULA ESPINAL PROYECTADA A TRAVÉS DEL ROI ASIGNADO.	95
FIG. 77 REGIONES ASIGNADAS PARA EVALUAR LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA EN LA LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL.	96
FIG. 78 SEGUIMIENTO DE FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA EN MONO RHESUS CONTROL.	98
FIG. 79 SEGUIMIENTO DE FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA EN MONO RHESUS IMPLANTADO.	99
FIG. 80 TRACTOGRAFÍA AL NIVEL DE LA 9ª VERTEBRA TORÁCICA ANTES DE LA LESIÓN.....	100
FIG. 81 TRACTOGRAFÍA TOMADA UN MES POST LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.	101
FIG. 82 TRACTOGRAFÍA TOMADA 2 MESES EN MONO RHESUS IMPLANTADO.	102
FIG. 83 TRACTOGRAFÍA DEL EXTREMO CAUDAL DE MONO RHESUS CON IMPLANTE DOS MESES POST LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.	103
FIG. 84 TRACTOGRAFÍAS CORRESPONDIENTES A TRES MESES POST LESIÓN.	104

Capítulo 1 Antecedentes

Lesión de médula espinal

El trauma en la médula espinal causa la disfunción de ésta, con la pérdida de función sensorial, motora y autonómica, distal al punto de lesión. La lesión traumática de médula espinal (LTME) causa una discapacidad neurológica grave, con gran repercusión médica y socioeconómica [1,2]. La mayoría de las LTME en la vida urbana, se deben a la fractura o dislocación de la columna vertebral [3]. Esto se presenta comúnmente por compresión con flexión torácica así como flexión o hiperextensión en la médula cervical. Los indicadores que aumentan el riesgo de la LTME como resultado de trauma mínimo son: preexistencia de espondilosis, estenosis espinal congénita, hipertrofia del ligamento e inestabilidad en la unión de las apófisis debido a artritis reumatoide [4].

La manifestación de la LTME tiene grados que varían y es enteramente dependiente en la severidad y el nivel de lesión en la médula (Fig. 1). La regla es que cuanto más alto es el nivel de la lesión, más severas son las consecuencias, por ejemplo: en una lesión a nivel cervical 5 (C5) los lesionados están propensos a tener parálisis total de las muñecas, manos, tronco y piernas, la respiración se debilita; mientras que una lesión a nivel torácico 9 los nervios afectados controlan músculos abdominales y de la espalda, por lo general resulta en paraplejía, sin control de la vejiga pero con control para digerir [5]. A grandes rasgos, en el caso de lesión cervical alta, los pacientes requieren de respiración artificial para permanecer con vida. Este tipo de lesión conduce a tetraplejía, con debilitación de la función en órganos pélvicos y a la pérdida de función motora y sensorial de los brazos, tronco y piernas. La lesión para bajos niveles de la médula, depende también del nivel exacto, puede dejar la función de los miembros superiores con debilitación limitada hasta miembros más abajo. La paraplejía se restringe a lesiones de la médula a nivel torácica o lumbar [6].

Se han definido cuatro tipos generales de lesión traumática de la médula espinal:

1. Maceración de la médula, en la cual la morfología de la médula se tuerce seriamente
2. Laceración de la médula (Heridas por arma de fuego o cuchillo);

3. Contusión de la médula, que puede desarrollarse en siringomielia (formación de quistes).
4. Lesión sólida de la médula, en la cual no hay foco central de necrosis como en lesión por contusión.

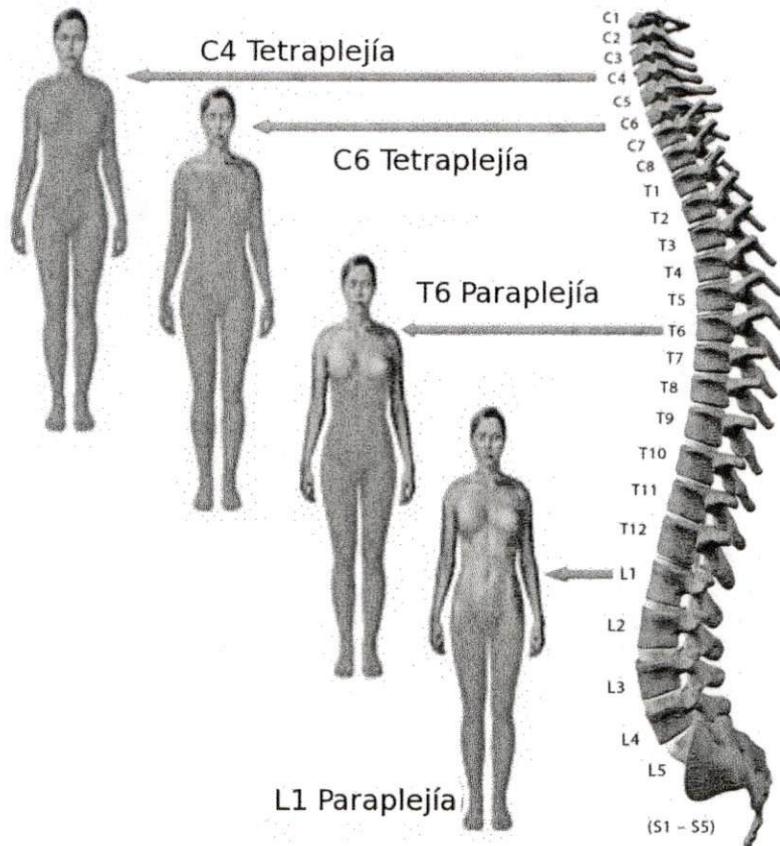


Fig. 1 Extensión de la lesión de médula espinal de acuerdo al nivel de la lesión. La lesión de médula espinal se puede subdividir en Tetraplejía o Paraplejía. Por ejemplo una lesión a nivel C6, genera Tetraplejía, mientras que una lesión en T9 genera Paraplejía [5] (Modificada de [5]).

Dentro de estos cuatro tipos de lesión, la proporción que fue dañada debe ser considerada, pues las lesiones incompletas beneficiarán dramáticamente las intervenciones experimentales en términos del grado de la recuperación que puede tener el paciente en comparación con las lesiones completas [7].

Epidemiología

En el mundo se estiman 2.5 millones de personas que viven con una LTME, con más de 130,000 nuevos casos reportados al año. Por ejemplo solo en E.U en el 2010 se registraron 418 nuevos casos de lesión de médula espinal la Fig. 2 y la Tabla 1 muestran el numero de casos reportados en E.U. hasta inicios del 2012.

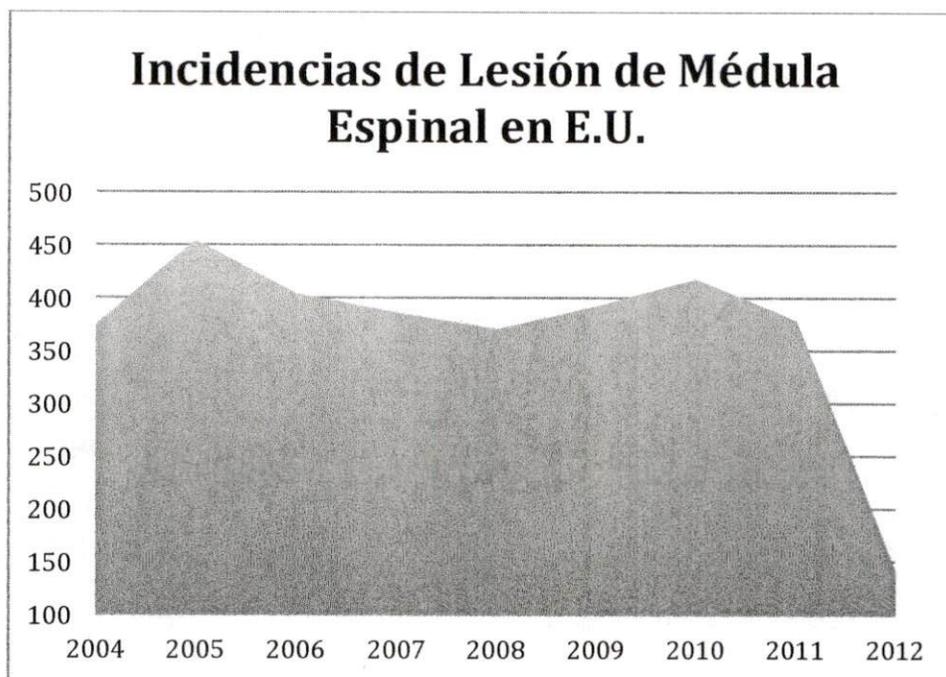


Fig. 2 Pacientes registrados por año desde el 2004 hasta inicios del 2012 en E.U. [3]. Actualmente se estiman 2.5 millones de personas con lesión de médula espinal en el mundo.

Año	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Incidencias	374	454	404	386	370	392	418	379	142

Tabla 1 Pacientes registrados por año en E.U. desde el 2004 hasta inicios del 2012 [3].

Edad de riesgo

La mayoría de casos de LTME ocurre en jóvenes adultos. De 1973 al 1979, el promedio de edad del daño fue 28.7 años, y la mayoría de estas heridas ocurrieron entre las edades de 16 a 30. Sin embargo, mientras la edad media de la población ha aumentado por aproximadamente 8 años desde 1970, el promedio de edad de lesión también ha aumentado. Desde el 2000, el promedio de edad de trauma ha aumentado a los 38 años. Además, el porcentaje de personas mayores de 60 años lesionados ha aumentado de 4.7% antes de 1980 a 11.5% desde el 2000. Este aumento en la edad de lesionados podría ser atribuido por cambios en la manera de reportar del Centro de Estadísticas la localización geográfica de los sistemas modelos, el porcentaje de sobrevivencia de las personas mayores lesionadas o la edad específica del índice de incidencia[3].

Nivel neurológico y magnitud de la lesión

Personas con tetraplejía han sostenido daño en uno de los ocho segmentos cervicales de la médula espinal; aquellos con paraplejía tienen lesiones en las regiones torácica, lumbar, o sacro de la médula espinal. Desde el 2000, la categoría más frecuente al dar de alta a las personas reportadas al banco de datos es tetraplejía incompleta (34.1%), seguido por paraplejía completa (23.0%), tetraplejía completa (18.3%), y paraplejía incompleta (18.5%). Menos de 1% de personas experimentaron recuperación neurológica completa al tiempo de salir del hospital.

El porcentaje de personas con tetraplejía incompleta ha disminuido mientras paraplejía completa y tetraplejía completa han incrementado [8].

Patofisiología

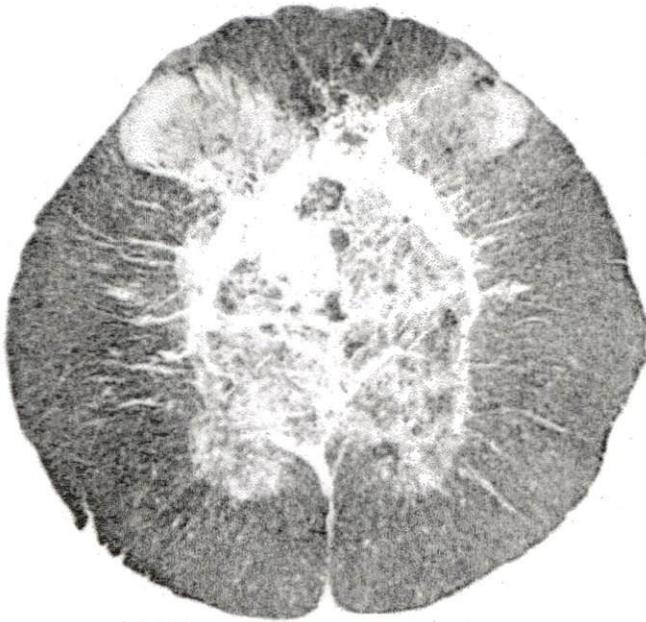
Hay tres fases en la respuesta de la LTME que ocurren después de la lesión: los procesos agudos, secundarios, y crónicos de lesión.

La lesión primaria abarca la destrucción focal del tejido fino de los nervios causada por trauma mecánico directo. Esta alteración inicial da como resultado una onda progresiva de lesión secundaria, que activa una cascada de mecanismos patofisiológicos nocivos que exagera la LTME. Pues esto conduce a la destrucción de las zonas axonales cercanas intactas por el trauma inicial, por lo que resulta en un impedimento importante para la recuperación funcional después de una LTME.

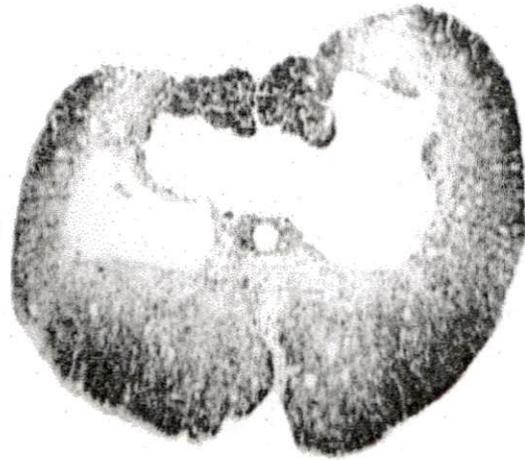
Lesión primaria

En el impacto inicial o lesión primaria, hay daños mecánicos inmediatos al tejido nervioso y a otros tejidos, incluyendo las células endoteliales de la vasculatura. Así, la necrosis, o muerte celular, resultado de alteraciones mecánicas e isquémicas, es instantánea, y en lesión por contusión, parece ser más predominantes en la materia gris de la médula espinal que en la materia blanca, dando por resultado un anillo de materia blanca preservada en el sitio de contusión. Esto debido a la consistencia suave y a la naturaleza altamente vascular de esta región [9].

La durabilidad axonal después de la LTME también depende de la presencia de mielina. La lesión por contusión puede causar un daño difuso mayor del axón con fibras mielinizadas debido a que son las más vulnerables. Con la persistencia de la compresión en la médula espinal, ocurren los acontecimientos moleculares y celulares específicos que se desarrollan en mecanismos secundarios de lesión.



1 Hora Post Lesión



60 Días Post Lesión

Fig. 3 Histologías de médula espinal 1 hora y 60 días post lesión. La pérdida de células continua radialmente en todas direcciones, de modo que la lesión se expande con el tiempo. Alrededor de 60 días post lesión, sólo queda un delgado aro de materia blanca (derecha). Es evidente que la muerte celular se produce masiva e inmediatamente después del impacto inicial en el epicentro [10], (modificada de [10]).

Lesión secundaria

Los procesos secundarios y crónicos de lesión, inician dentro de minutos y semanas después de lesión, Aparte de la hemorragia en la materia gris, la lesión primaria no causa un daño total a la médula espinal a pesar de la muerte directa de las células que ocurre en el sitio de lesión. Sin embargo, con el advenimiento de mecanismos perjudiciales secundarios este cuadro cambia drásticamente. El signo más rápido (2 h) es la expansión de la hemorragia en el sitio de lesión y la aparición de numerosas hemorragias locales. Después de eso (6 h), una sombra rodea la lesión primaria y el edema predomina en la materia blanca. Al primer día del trauma (12 a 24 h) los focos hemorrágicos continúan expandiéndose y llegan a ser más confluentes. Además, junto a la lesión, la materia gris y blanca pierden su definición, se convierte más suave e inflamada debido al incremento del edema [11]. La

hemorragia sigue siendo evidente por 3 días, al octavo día post lesión se detiene y el sitio es mucho más amplio de la lesión primaria.

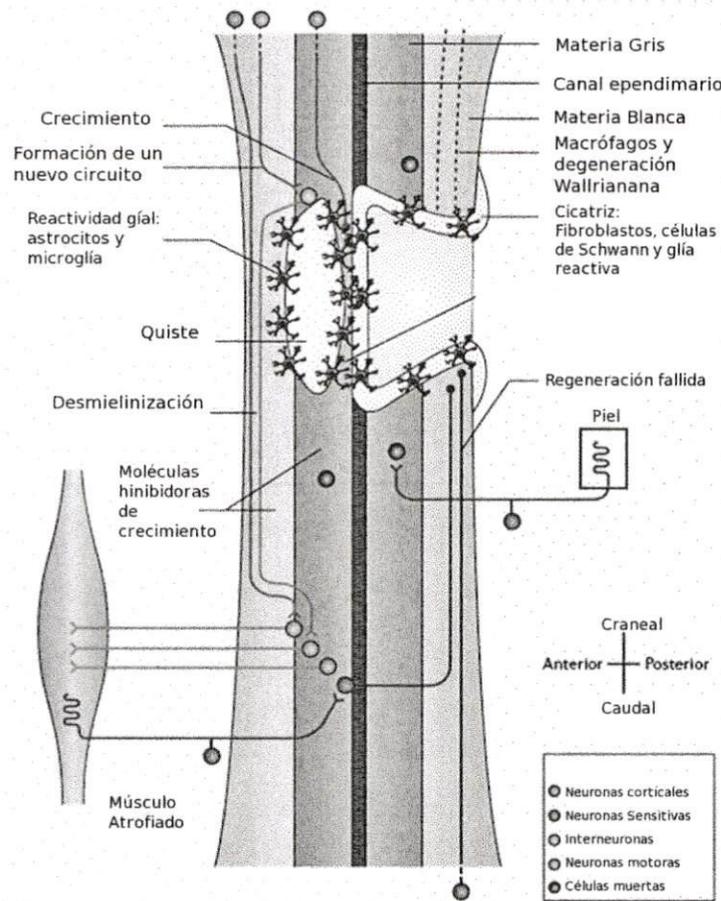


Fig. 4 Esquema de médula espinal después de Lesión de médula espinal. Se muestra un corte sagital con una lesión de médula espinal en la región cervical, representando una combinación de características de diversos tipos de lesión. Muchas células mueren inmediatamente, así como progresivamente, después de la lesión de médula espinal. Los quistes se forman generalmente después del daño inicial. Después las células del sistema nervioso periférico invaden a menudo el sitio de lesión para formar una cicatriz de tejido fino conectivo, que incorpora astrocitos y microglía. Muchos axones ascendentes y descendentes se interrumpen y no pueden regenerar. Algunos axones forman nuevos circuitos con las neuronas motoras vía interneuronas. En el sitio de la formación del quiste, los axones pueden brotar en los trabéculas que se forman de las células endimarias. Segmentos desconectados desmielinizados del axón son fagocitados por los macrófagos. Alguna remielinización espontánea ocurre, en gran parte junto a las células de Schwann del sistema nervioso periférico, mientras que los músculos desnervados se atrofian [12].

En 21 días post lesión, la médula espinal ha desarrollado cavidades claramente visibles, que alrededor de la 14ª semana se unen para formar grandes regiones enquistadas. Estas regiones son rodeadas por una cicatriz que se origina principalmente de glía y en un grado inferior del sistema nervioso periférico (SNP). En etapas más crónicas de LME, la secuela patofisiológica conduce a atrofia de la médula en el sitio de lesión primaria. Sin embargo, debido a la degeneración Walleriana en las zonas ascendentes y descendentes, la atrofia de la médula puede también ser rostral y caudal al sitio del trauma inicial.

Una cascada de acontecimientos patofisiológicos que causan necrosis y apoptosis da como resultado la biología de la lesión secundaria después de la LTME (Fig. 4).

Interrupción axonal y degeneración Walleriana.

La patología axonal que sigue la LTME es crónica. Desde 15 minutos después de lesión existe hinchazón del axón. En este momento, también existe ruptura de mielina, y alrededor de 24 horas, el contenido axonal se puede observar en el espacio extracelular. Los axoplasmas neuronales experimentan también cambio; exhiben un aspecto granular con desorden en sus neurofilamentos y en muchos axones hay una abundancia inusual de organelos intracelulares. Conforme pasa el tiempo, hay otras características patológicas de axones dañados, tales como la desmielinización extensa y conos abortivos de crecimiento que se incrementan. De hecho, por 24 horas, un fenómeno común es el aspecto de los axones gigantes (mayor de 40 mm), que exhiben una combinación de todas las características patológicas ya mencionadas anteriormente [13]. Estos cambios del axón son acompañados en última instancia por la degeneración Walleriana, que en roedores dura por varios meses y en los seres humanos por años [14]. La degeneración Walleriana se describe como la fulminación de los segmentos axonales separados de su soma neuronal. El proceso comienza con la degeneración de fibras separadas, que es acompañada por la fragmentación de su mielina asociada. Continúa con la acumulación de los restos y culmina con la fagocitosis de estos por los macrófagos y la microglía. Como la lesión primaria separa zonas axonales ascendentes y

descendientes, la degeneración Walleriana actúa rostral y caudal a la lesión inicial [15].

El principal déficit funcional asociado a la LTME, se presenta con la interrupción de zonas espinales ascendentes y descendentes. Cuando los axones de las zonas espinales ascendentes y descendentes son dañados, el segmento distal experimenta la degeneración Walleriana y el segmento próximo no puede regenerarse con éxito. Por lo tanto, la información (sensorial) ascendente no alcanza el sitio supraespinal y los sistemas descendentes motores y autonómicos se desconectan, incluyendo los generadores centrales de patrones, que son responsables de la función locomotora coordinada [16].

Uso de Polímeros Sintetizados por Plasma Derivados del Pirrol para la neuroprotección y reconexión del Sistema Nervioso Central

Se ha reportado el uso de diferentes materiales para reparar el tejido después de una LTME. Estos materiales incluyen tejido vivo como implantes de células madre [17], revestimiento de células olfatorias, implante de células de Schwann [18], implante de factores tróficos e injertos de médula espinal embrionaria con el objetivo de facilitar el crecimiento de nueva materia blanca y la restauración de su funcionalidad [19]. Sin embargo, hasta la fecha han sido poco eficaces.

Otro enfoque para la reparación y reconexión de la LTME es el uso de biomateriales inertes [20]. Se ha reportado el uso de implantes de filamento de carbono para promover la regeneración axonal en un modelo de LTME en rata [21], en dicho trabajo los autores muestran el potencial uso de filamentos de carbón como superficie de adhesión para dirigir el recrecimiento axonal. Diversas estrategias para recuperar las funciones perdidas de la médula espinal incluyendo el uso de implantes poliméricos se han reportado [20]. La mayoría de los implantes poliméricos utilizados hasta la fecha no han sido capaces de mejorar significativamente ni las funciones motoras ni las funciones sensoriales de los animales sometidos a pruebas después de una sección completa de la médula espinal [22].

Por otro lado, el uso de materiales derivados del pirrol se ha convertido en una alternativa interesante para la reparación de tejidos. Compuesto por aminas heterocíclicas, el pirrol (PPy) es un material semiconductor con uso potencial en la próxima generación de sensores, baterías y diodos. Las capacidades eléctricas del PPy tienen su origen en los dobles enlaces conjugados existentes en las moléculas heterocíclicas [23,24]. En aplicaciones biológicas, la biocompatibilidad y bioestabilidad del PPy ha sido probada, tanto *in vitro* como *in vivo* [25-27]. Por lo

tanto, aplicando sus propiedades eléctricas y biológicas, el PPy puede ser usado para crear nuevas tecnologías de bioingeniería para modificar funciones celulares, como la migración [28], adhesión [29] o síntesis [30] de ADN, entre otros. Algunos estudios han demostrado que el PPy estimula el crecimiento de células neuronales [31]. Otros polímeros con diferente estructura a la de polipirroles se han estudiado como implantes en la LTME de ratas. Por ejemplo, Olson et al. [32] estudiaron el efecto de células madre y células de Schwann sobre andamios de polímeros biodegradables encontrando que la evaluación de la recuperación motora en la escala Basso-Beattie y Bresnahan (BBB) [33] no mostró diferencia significativa de los animales implantados en comparación con el grupo control.

La síntesis de materiales poliméricos sintetizados del pirrol se lleva a cabo con frecuencia mediante química oxidativa o métodos electroquímicos. Sin embargo, los polímeros obtenidos por estos métodos deben ser cuidadosamente purificados antes de aplicarlos a sistemas vivos, debido a que las impurezas y la contaminación con disolventes y catalizadores atrapados en las cadenas pueden tener efectos colaterales en tales sistemas [23]. El uso de plasmas como agentes ionizantes para generar iones, electrones, fotones, y moléculas en estado electrónico excitado es una alternativa para promover la propagación de las reacciones de polimerización sin contaminantes, en lugar de reactivos catalíticos, porque en este método de polimerización sólo participa los monómeros iniciales y los productos son oligómeros y polímeros con diferentes pesos moleculares [24].

Hemos empleado el PPy dopado con Yodo (PPy/I) y el copolímero de PPy y polietilenglicol (PPy/PEG) sintetizados por plasma como implantes en la LTME de ratas. El dopaje de PPy/I se utiliza con la intención de aumentar la conductividad eléctrica del PPy. El copolímero PPy/PEG se emplea con el objetivo de añadir grupos oxigenados a las redes de PPy para aumentar la afinidad de los copolímeros con los fluidos de la médula espinal. En donde ocho semanas después del implante, los polímeros se integraron con el tejido de la médula espinal con baja respuesta inflamatoria de los tejidos del huésped, lo que permite la proliferación celular y el aumento de la preservación del tejido [23]. También hemos reportado que las ratas implantadas con PPy sintetizados por plasma después de la LTME son capaces de movimientos voluntarios de hasta tres articulaciones en las extremidades

posteriores. Se obtuvo la más alta recuperación cuando el PPy fue dopado con yodo, con una recuperación de más del doble que los de los animales sin implantes. Los resultados indican que es posible reducir la parálisis producida en LTME cuando el PPy/I es implantado inmediatamente después de la lesión [34].

En estudios de inmunofluorescencia se pudo identificar la expresión de β -III tubulina (proteína que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto) en animales con PPy/I lo que sugiere que el polímero podría estar participando en procesos de plasticidad neuronal así como un incremento en la neuroprotección. También el uso de PPy/I ha demostrado resultados benéficos en cuanto a los procesos isquémico y apoptótico [35] en LTME.

Los polímeros sintetizados por plasma implantados en el tejido de la médula espinal están siendo estudiados. Teniendo en cuenta sus propiedades, actualmente se están desarrollando muchos estudios relacionados con las técnicas de síntesis de plasma, las características físico-químicas de los polímeros, el tamaño de las partículas, las técnicas de implantación en la LTME, los procesos de integración con el tejido, los mecanismos de neuroprotección y/o regeneración que se expresan; con el fin de ampliar su uso en lesiones de la médula espinal. También se están desarrollando posibles terapias donde se combinan diversos métodos de recuperación funcional como el uso combinado con proteína albúmina (Omar Fabela et al.) por ejemplo.

El uso de polímeros sintetizados por plasma derivados del pirrol para la neuroprotección y la reconexión del sistema nervioso central cuenta con patentes aceptadas en Rusia [36], la Unión Europea [37] y Estados Unidos [38].

Imágenes por Resonancia Magnética

Desde el punto de vista de la mecánica clásica la Resonancia es un fenómeno oscilatorio que puede representarse por una senoidal con amplitud y frecuencia propia, y magnitud finita. Si un objeto se encuentra en presencia de una onda cuya frecuencia corresponda a la suya propia, entra en movimiento, su amplitud aumenta y entra en resonancia. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una herramienta que permite el estudio de propiedades físicas y químicas a pequeña escala, de acuerdo con la capacidad del sistema. Una aplicación específica de la RMN es la obtención de imágenes (IRM). La IRM es capaz de producir imágenes de órganos internos y estructuras de seres vivos de forma relativamente no alterada [39], con una excelente resolución del contraste entre tejidos blandos [40]. La IRM se basa en la capacidad de algunos núcleos atómicos para reaccionar a ondas de radiofrecuencia (RF) cuando son sometidos al efecto de un campo magnético. Dicha capacidad genera una señal que se detecta por un receptor y es procesada por una computadora para producir imágenes.

La IRM fue desarrollada en los 80's y es un proceso complejo basado en el fenómeno de RMN, fenómeno descubierto por Bloch [41] y Purcell en 1946 [42]. El concepto de extenderla a estudios *in vivo* en los humanos se atribuye a Jasper Jackson, quien produjo la primera señal de RM de un animal vivo. Lauterbur y Mansfield ganaron el premio Nobel por sus descubrimientos y aportaciones en IMR.

La adquisición de imágenes, está relacionado con la intensidad de la señal en la región de interés, es dependiente de parámetros intrínsecos como la densidad de protones, tiempos de relajación longitudinal T1 (espín-red) y de relajación transversal T2 (espín-espín), movimientos moleculares, efectos de susceptibilidad y cambios químicos.

La magnetización longitudinal es la componente del vector de magnetización M que es paralela al campo principal B_0 . El proceso en que la magnetización se recupera en equilibrio térmico, esta definida por la ecuación (1.1), caracterizada por el tiempo de relajación longitudinal T1.

$$M_z(t) = M_z(0) \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad (1.1)$$

El componente de magnetización M perpendicular al campo principal B_0 es llamado magnetización transversal M_{xy} . El comportamiento del decaimiento de esta componente es llamado relajación transversal y esta caracterizado por la constante de tiempo T_2 (Ec. 1.2).

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) \left(e^{-\frac{t}{T_2}}\right) \quad (1.2)$$

El contraste en IRM está basado en la diferencia de la intensidad de la señal entre áreas de composición distinta en una imagen. De acuerdo a esto, una imagen se forma mediante la medición de energía disponible en cada uno de los tejidos en un instante determinado. Las imágenes en T_1 tienen un contraste muy distinto a las imágenes con contraste T_2 y de igual manera, tienen utilidad y contenido diagnóstico muy distinto. Una imagen de contraste T_1 da información anatómica, mientras que una imagen de contraste T_2 da información patológica.

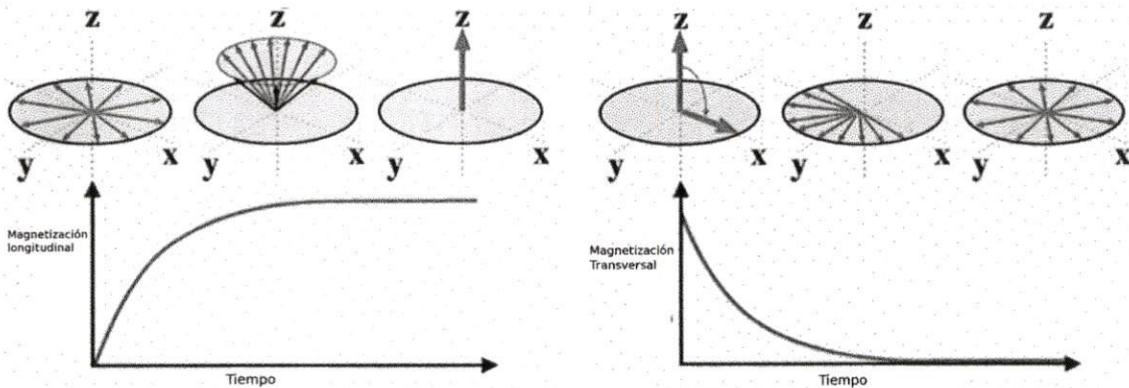


Fig. 5 Los dos principales mecanismos de contraste en imágenes por resonancia magnética: T_1 y T_2 . T_1 , mostrado a la izquierda, describe cómo el equilibrio de la magnetización longitudinal (eje z) se restablece después de ser afectado. T_2 , ilustrada a la derecha, muestra el decaimiento de la señal de resonancia magnética una vez que fue generada [43].

Después de que un pulso de 90° es aplicado al tejido en equilibrio térmico en un campo magnético estático, una señal generada por la libre precesión del vector de magnetización alrededor de B_0 que decrece con el tiempo (*Free Induction Decay*,

FID) es registrada. En este proceso, la magnetización al equilibrio M_0 apunta a lo largo de la dirección del campo magnético estático, es rotada en el plano transversal con lo que la magnetización del plano transversal M_{XY} tiene la magnitud M_0 . A través del tiempo la componente de magnetización transversal disminuye. Si otro pulso de 90° es aplicado al tejido antes que la magnetización longitudinal retorne al valor de equilibrio de M_0 , la magnetización en el plano transversal será menor que M_0 y la amplitud de la señal FID resultante se reducirá comparada con la señal inicial. La amplitud de las señales FID es afectada por la magnitud de la magnetización al equilibrio M_0 , el cual a su vez, es afectado por la densidad de protones en el tejido. La FID también es afectada por el tiempo de relajación del tejido y el intervalo de tiempo entre los dos pulsos de 90° (TR), a mayor tiempo de relajación o menor periodo de tiempo, menor amplitud de FID. En un tejido con la misma densidad de protones la FID será derivada del tejido que tiene mayor tiempo de relajación y ese tejido aparecerá oscuro en la imagen. Las áreas brillantes en la imagen corresponderán a tejido con mayor energía disponible en un tiempo TR corto, mientras que tejidos con tiempos de relajación mayores aparecerán oscuros. El contraste máximo entre dos tejidos se obtiene con un tiempo de TR igual al promedio del tiempo de relajación T1 de los tejidos.

Imágenes por Tensor Difusión

Debido a la agitación térmica, las moléculas de agua libre, se encuentran en continuo movimiento, por lo que su posición y orientación espacial cambian de forma aleatoria; esto es conocido como movimiento *Browniano* o *difusión molecular*. El efecto de difusión libre implica que si colocamos en un punto cualquiera, una gran concentración de moléculas, estas, al paso del tiempo se dispersarán, como una gota de tinta en un vaso de agua, alejándose del punto inicial en forma simétrica, disminuyendo su concentración del punto de partida y alcanzando mayores distancias, este espacio se puede medir mediante la cuantificación de un radio promedio de la distribución. El cálculo r se determina estadísticamente, ya que

forma una distribución gaussiana (Fig. 6) cuya mediana sería nula ya que la probabilidad de desplazarse en una dirección es idéntica a la de desplazarse en sentido contrario, pero la varianza de la distancia recorrida es proporcional al tiempo (ecuación de Einstein de la difusión, Ec.1.3).

$$r = \sqrt{2nDt} \quad (1.3)$$

La varianza ésta dada por el cuadrado del radio promedio de la distribución. **D** es un parámetro que depende del medio y recibe el nombre de coeficiente de difusión y se caracteriza por la movilidad de las moléculas en el medio considerado. La ecuación anterior (1.3) es básica de la difusión libre donde se muestra que el desplazamiento crece dependiendo tan sólo de la raíz cuadrada del tiempo transcurrido.

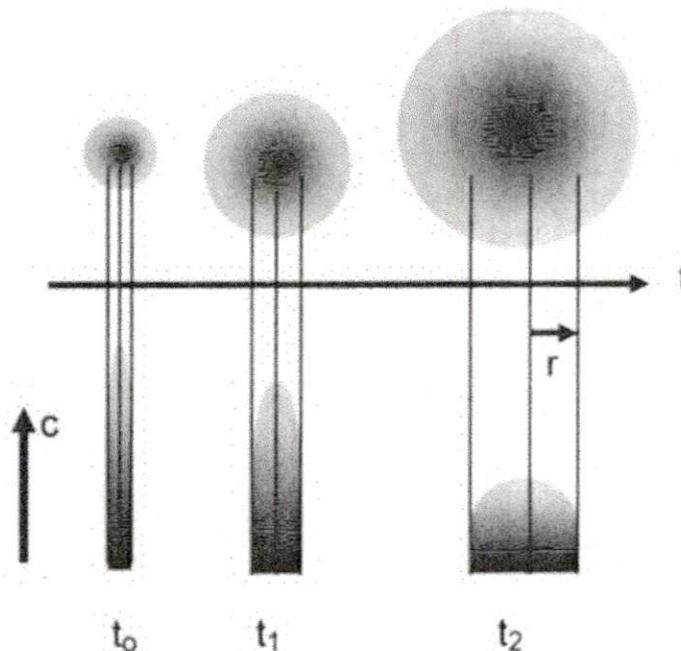


Fig. 6 Esquema de la variación de la distribución de una población molecular con el tiempo en difusión libre. En cada instante la población adopta una distribución gaussiana. En la gráfica se representa la distribución molecular en diferentes momentos (t_0 , t_1 y t_2), se observa que la concentración en el centro disminuye debido a la dispersión y el espacio alcanzando es cada vez mayor [44].

Por ejemplo, si comparamos el desplazamiento por difusión de una molécula de agua libre en un medio con un coeficiente de difusión de $D = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (valor

normal del tejido cerebral) y el desplazamiento de una molécula de agua llevada por el flujo dentro de un capilar a una velocidad de 1 mm/s, se observará que en 2 ms cada molécula se mueve 2 micras, pero para recorrer 20 micras, la molécula de agua en el capilar tardará 20 ms y la molécula de agua en difusión tardará 200 ms, por lo anterior, es bien conocido que la difusión es eficiente para el movimiento de moléculas en cortas distancias pero ineficiente para el transporte en largas distancias. La señal de RM es sensible a estos pequeños desplazamientos de traslación molecular del agua libre.

Una secuencia estándar Spin Echo (SE) se muestra en la Fig. 7. El pulso de radiofrecuencia de 90° rota el vector de magnetización al plano horizontal. Los espines precesan en la frecuencia de Larmor pero inician un desfase debido a inhomogeneidades del campo magnético, teniendo como resultado el decaimiento de la señal. El pulso de 180° invierte la dispersión de las fases, induciendo después en los espines un re enfase, provocando entonces un eco (echo) [45].

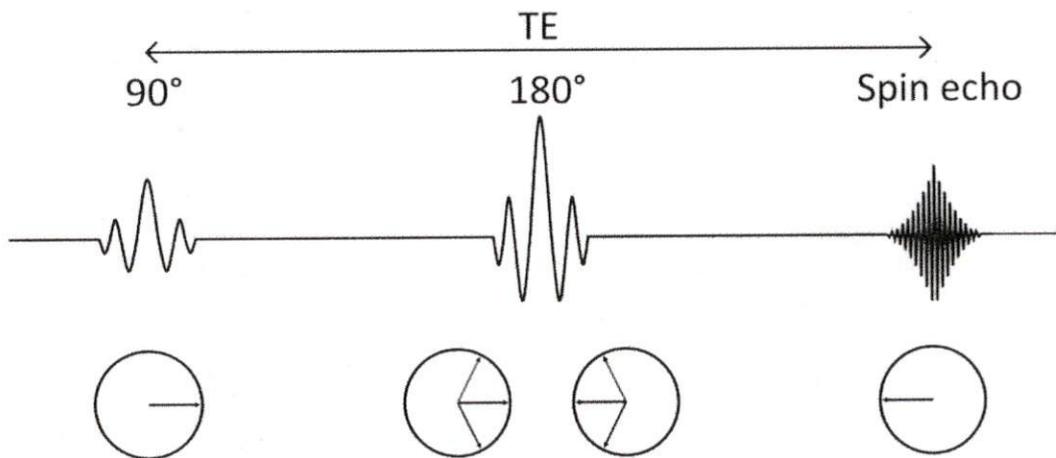


Fig. 7 Secuencia Spin Echo. El pulso de radiofrecuencia de 90° produce magnetización transversa (primer círculo). Los espines comienzan a desfase debido a inhomogeneidades del campo magnético (flechas roja, azul y negra en el segundo círculo). El pulso de 180° invierte la dispersión de la fase (tercer círculo). Los espines después se reenfasan y produciendo un eco (cuarto círculo) [45], modificada de [46].

La adición de dos pulsos de gradiente que inducen una dependencia espacial en el cambio de la fase, hace esta secuencia sensible a los efectos de difusión (Fig. 8)

[47]. Para espines estáticos (sin difusión), el cambio en la fase inducido por dos gradientes opuestos, se cancelan. Mientras que para espines en movimiento (con difusión), no se cancelan por completo dando lugar a la dispersión de la fase restante y a una mayor atenuación de la señal [48]. El grado de atenuación de la señal esta definido por la ecuación de *Stejskal y Tanner* (Ec. 1.4), el método de *Stejskal y Tanner*, es el método más extendido en la clínica para obtener imágenes sensibles a la difusión. El grado de difusión esta descrito por el *valor b*, el cual es un parámetro que esta determinado por el tipo de gradiente. En el esquema de *Stejskal-Tanner* (Fig. 8), el valor *b* esta dado por la ecuación 1.4, dónde:

- Duración (δ)
- Fuerza (G) del pulso de gradiente y
- El intervalo entre dos pulsos (Δ):
- γ proporción giró magnética del protón de hidrógeno (42.58 MHz/T)

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (1.4)$$

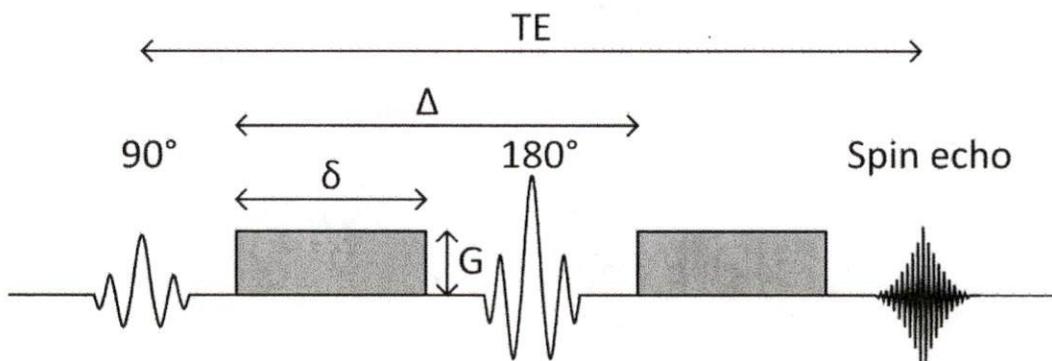


Fig. 8 Diagrama de la secuencia de Stejskal-Tanner para el cálculo de la difusión. La ponderación en difusión es función de la duración del gradiente (δ), de la amplitud del gradiente (G) y del intervalo entre los gradientes de difusión (Δ). La duración del gradiente y el intervalo entre gradientes determina el tiempo durante el cual se mide la difusión que se denomina tiempo de difusión [44]. Secuencia gradiente espín eco (PGSE por sus siglas en inglés: pulsed gradient spin echo). La secuencia espín eco es modificada con la adición de dos pulsos de gradiente (bloques grises) [46].

El valor b puede incrementarse usando pulsos fuertes (G) y largos (δ) o por alargamiento del tiempo entre los pulsos (Δ). Las dos últimas aumentan el TE y por tanto la ponderación en T2.

Si el valor b es pequeño, la sensibilidad a los movimientos de difusión es mínima y el contraste T2 es dominante. Para eliminar la contaminación T2, es preciso obtener imágenes calculadas a partir de imágenes con diferentes valores b , preferentemente con diferentes valores de la amplitud del gradiente.

Adicionando los gradientes de difusión a una secuencia cualesquiera de RM se forman las imágenes ponderadas en difusión (DWI, por sus siglas en inglés *diffusion-weighted imaging*). La intensidad de señal de cada voxel en una imagen DWI esta influenciada por el cambio del valor b , la secuencia de pulso y por parámetros intrínsecos de los tejidos.

Estos experimentos de difusión pueden ser extendidos a tres dimensiones para aplicar gradientes de difusión en cualquier dirección (Fig. 9).

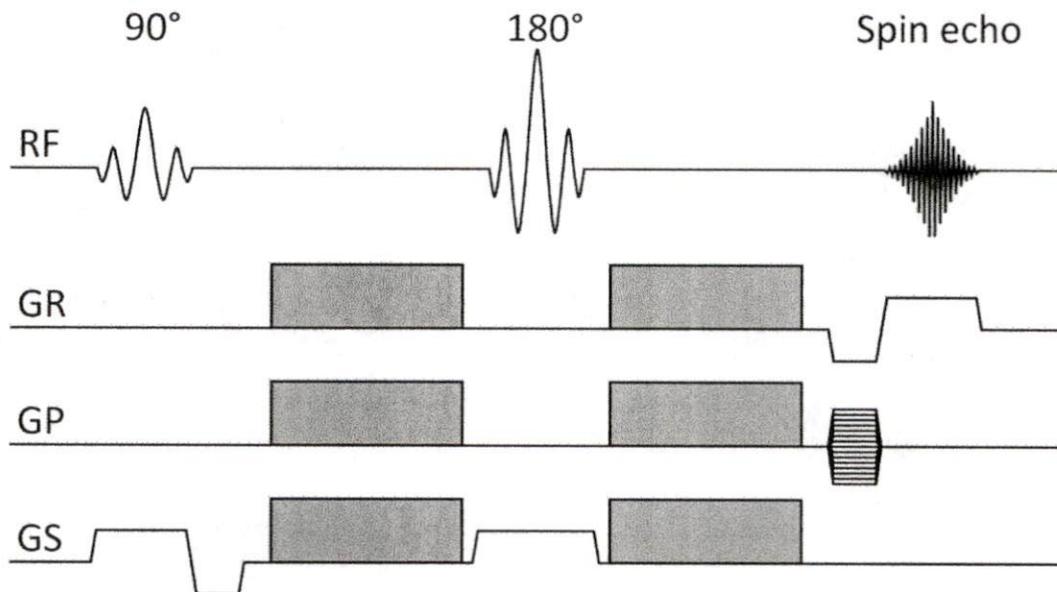


Fig. 9 Secuencia de Difusión *Spin Echo*. La RF indica pulsos de 90° y 180° . GR es el gradiente *Readout* (típicamente en dirección x), GP es el gradiente *Phase-Encoding* (típicamente en dirección y) y GS es el gradiente *Slice-Select* (típicamente en dirección z). Los gradientes de difusión (bloques gris) pueden ser aplicados como cualquier combinación de estas direcciones.

La cantidad de señal de RMN existente, en un experimento sensible a difusión decae exponencialmente de acuerdo a D y esta definida por la siguiente ecuación (Ec.1.5) :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bD} \quad (1.5)$$

Donde S es la señal obtenida con los gradientes de difusión y S₀ es la señal obtenida sin el uso de gradientes de difusión, la ecuación anterior (Ec.1.5) se puede escribir:

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -bD \quad (1.6)$$

Por lo tanto es posible determinar el coeficiente de difusión D en cada voxel de la imagen. En tejidos biológicos, la difusión de agua no solo depende de la temperatura o la viscosidad; sino también de barreras semipermeables. Stejskal y Tanner encontraron y estudiaron el efecto de las barreras y propusieron la idea de medir la difusión de moléculas de agua restringidas variando el retardo entre los pulsos de gradientes [49]. En tejidos biológicos D es llamado Coeficiente de Difusión Aparente (ADC) por lo que (Ec.1.7):

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -b(ADC) \quad (1.7)$$

Adquiriendo imágenes ponderadas en difusión con al menos 2 diferentes *valores* b y con TE fijo se puede determinar el valor de ADC para cada voxel, asignando una escala de grises a los rangos del ADC se constituye el mapa de ADC. El mapa de ADC provee un contraste basado únicamente en las diferencias de la difusión del agua en los tejidos, sin contaminación por la relación T2. Las imágenes DWI pueden demostrar cambios de señal que no son detectadas en imágenes T2 y actualmente son utilizadas de manera rutinaria para la detección de lesiones isquémicas en el cerebro.

Difusión en la médula espinal

En tejidos biológicos la difusión de agua no es completamente libre, la cual depende de la citoarquitectura del tejido.

En la sustancia blanca la difusión de las moléculas de agua, en un espacio tridimensional, no es la misma en todas las direcciones a esto se le denomina anisotropía (Fig. 10).

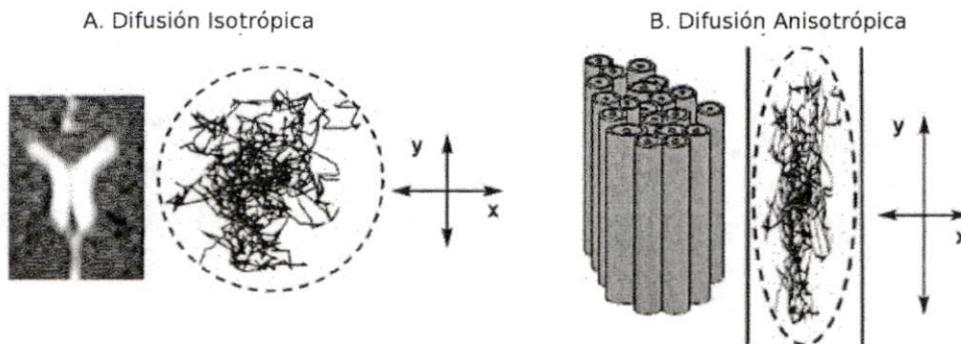


Fig. 10 Difusión Isotrópica y Anisotrópica. (A) Moléculas de agua en el cerebro están en constante movimiento. Cuando el movimiento no tiene restricciones, como en el fluido dentro del cerebro (los ventrículos por ejemplo, como se ilustra del lado izquierdo), la difusión es isotrópica, lo que significa que el movimiento ocurre de la misma forma y aleatoriamente en todas direcciones. (B) Cuando el movimiento está restringido, como en los tractos de materia blanca (ilustrado en la derecha), la difusión es anisotrópica, lo que significa que el movimiento está orientado más en una dirección que en otra [50].

La anisotropía de la difusión ésta causada por la orientación de las fibras del tracto e influenciada por las siguientes características:

Micro estructural

- Organización axonal.
- Densidad de la fibra.
- Paquete neuroglial.
- Grado de mielinización.
- Diámetro individual de la fibra.

Macro estructural

- Variación en la orientación de los tractos de la sustancia blanca.

Tensor de difusión

En imágenes *DTI*, las propiedades de la difusión del agua son evaluadas usando las coordenadas espaciales x y z , el calculo de D para coordenadas tridimensionales se escribe (Ec.1.6):

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = - \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij} \quad (1.6)$$

donde cada elemento para b y D corresponden a un dirección de difusión. Así el tensor puede escribirse como matriz (Ec.1.7):

$$D = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \quad (1.7)$$

Se han propuesto diferentes esquemas para definir la cantidad de direcciones adecuadas para determinar con precisión la orientación del tensor. Cada marca de scanner tiene diferentes estándares y protocolos en lo que la dirección de gradientes se refiere.

De la matriz del tensor de n elementos son calculados los eigenvalores y eigenvectores, estos aportan los valores de la configuración de una representación tridimensional de una elipsoide y su sumatoria, con la cual podemos generar un modelo de la preferencia de difusión en la materia blanca.

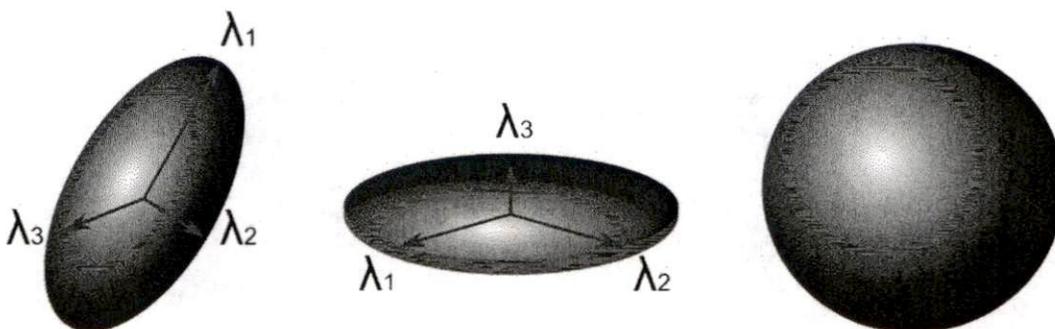


Fig. 11 Elipsoides de difusión. Elipsoide lineal (alargada) representa la difusión en una sola dirección (izquierda), elipsoide plana representa difusión en un solo plano (centro) y elipsoide esférica representa difusión isotrópica [46].

Los eigenvalores y eigenvectores son caracterizados para cada voxel. Los eigenvalores reflejan la preferencia de difusión en alguna dirección de acuerdo a su asociado eigenvector. El ADC en tres dimensiones esta dado por (Ec.1.8):

$$ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad (1.8)$$

Para calcular entonces el ADC pixel por pixel son necesarios n estudios de DWI generando imágenes por tensor de difusión (DTI).

Una medida de anisotropía, es la razón de volumen (RV), representa el volumen de la elipsoide dividida por el volumen de una esfera, cuyo radio es la difusión media (Ec.1.9). Teniendo como valores 0 para la anisotropía más alta y 1 para una difusión isotrópica.

$$RV = \frac{\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3}{\left(\frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}\right)^3} \quad (1.9)$$

Otra medida de anisotropía es la razón de anisotropía relativa (RA) que representa el coeficiente de variación de los eigenvalores. Asignando desde 0 para isotrópico hasta $\sqrt{2}$ para una anisotropía infinita y se expresa con la ecuación 1.10 (Ec.1.10).

$$RA = \sqrt{\frac{1}{3}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - D)^2 + (\lambda_2 - D)^2 + (\lambda_3 - D)^2}{D}} \quad (1.10)$$

La ecuación 1.11 es la definición de la fracción de anisotropía (FA), la cual mide la fracción de la magnitud del tensor debido a la difusión anisotrópica. Donde 0 se asigna a una difusión isotrópica y 1 a una difusión anisotrópica (Fig. 12).

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - D)^2 + (\lambda_2 - D)^2 + (\lambda_3 - D)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad (1.11)$$

Para representar la orientación de los tractos de la materia blanca se asigna un código de colores de acuerdo a la preferencia de difusión asignando al eje X color rojo, al eje Y color verde y color azul al eje Z, éstas componentes se multiplican por algún índice de anisotropía, la FA por ejemplo, con esto la intensidad del color coincide con el índice de anisotropía, así el color reflejará la orientación del tensor.

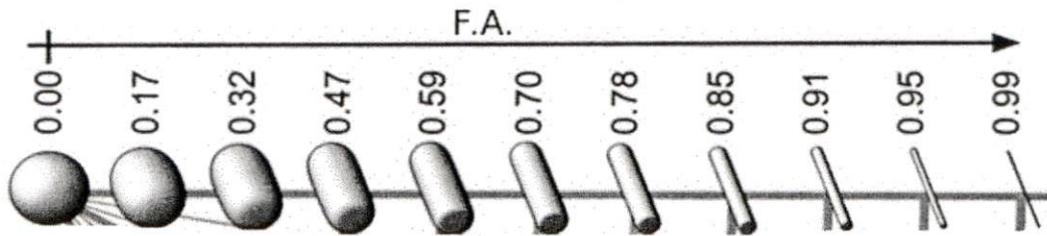


Fig. 12 Demostración de el espacio de fracción de anisotropía (FA). El glifo de la izquierda representa un espacio isotrópico (FA = 0) y hacia la derecha va incrementando el valor de la isotropía [51].

En la Fig. 13 se muestran las elipsoides que describen la FA en el espacio 3D de acuerdo a los eigenvectores y eigenvalores calculados para cada voxel multiplicada por el mapa de color donde se muestra la preferencia de difusión.

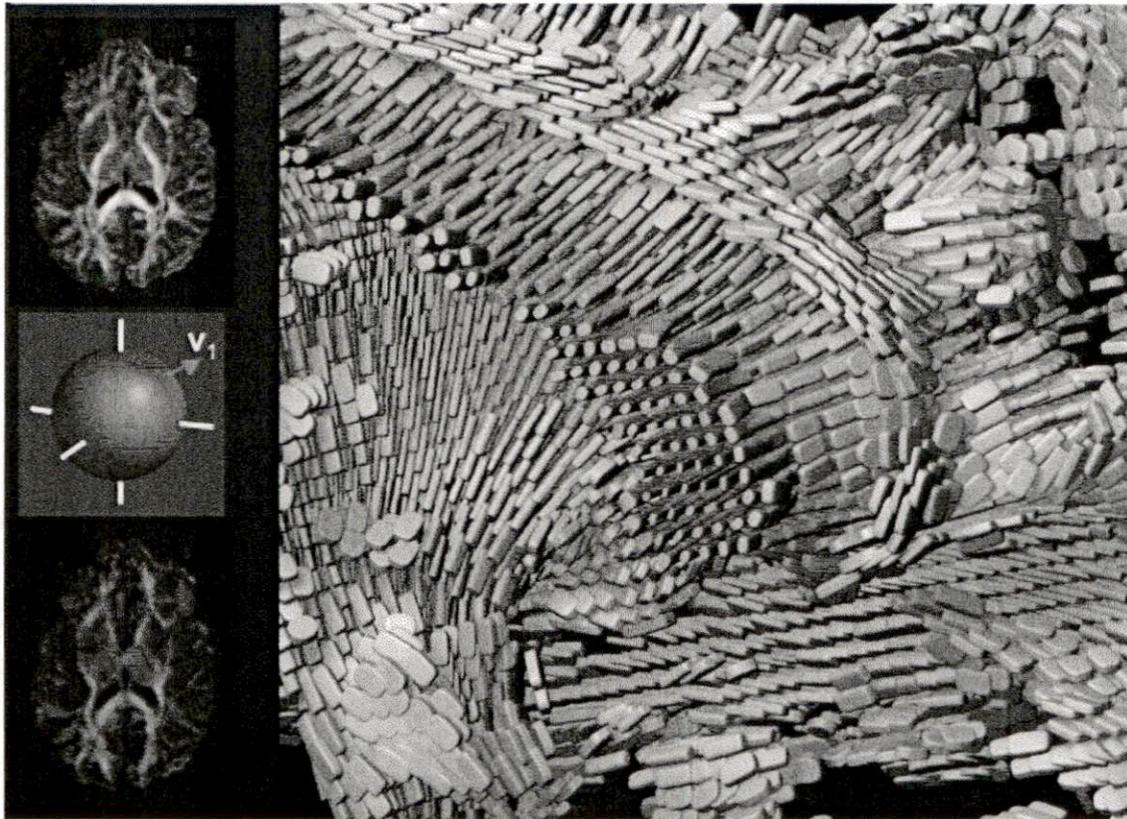


Fig. 13 Representación grafica de glifos calculados a partir de la fracción de anisotropía (FA) y el mapa de preferencia de difusión. Se muestra una vista sagital, dónde cada glifo representa la FA para un voxel de acuerdo a lo mostrado en la Fig. 12. En el centro de color rojo podemos observar la FA para el cuerpo calloso, a su vez en un color predominantemente azul situado en la parte baja izquierda se observa el tracto cortico espinal.

Tractografía

La aproximación empleada para el trazo de las fibras de la materia blanca es denominado FACT, por sus siglas en ingles "Fiber Assignment by Continuous Tracking", la cual tiene una alta definición en la proyección de axones [52]. El cual se basa en un algoritmo de propagación lineal que usa la información del tensor local para cada medida de propagación, siempre y cuando el índice de anisotropía (FA) del voxel a propagar este dentro de un rango definido; La localización de la fibra es iniciada con un voxel el cual se propaga linealmente en dirección anterógrada y retrógrada de acuerdo a principal eigenvector en cada voxel (Fig. 14).

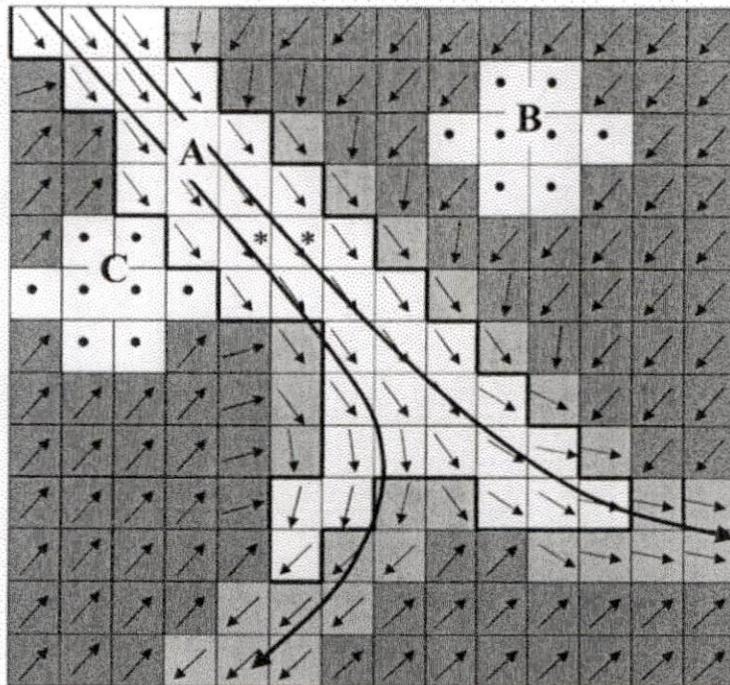


Fig. 14 Esquema que muestra el trazo de la sustancia blanca. El grado de la difusión anisotrópica esta indicada por la escala de grises y la dirección principal del eigenvector en cada voxel ésta indicada por una flecha.

El paso final de el proceso es el correregistro de los tractos de la sustancia blanca en tres dimensiones en IRM, comúnmente T2 (Fig. 15, Fig. 16 y Fig. 17).



Fig. 15 Tractografía en Cerebro de Mono Rhesus sano. Se puede observar la vía óptica: nervio óptico (flecha amarilla), cintillas ópticas (flecha naranja) y las radiaciones ópticas dorsales (flecha verde); también podemos ver el tracto cortico-espinal (flecha azul), cuerpo calloso (la flecha roja indica la parte frontal) y el fórceps mayor (flecha blanca) por mencionar algunos.

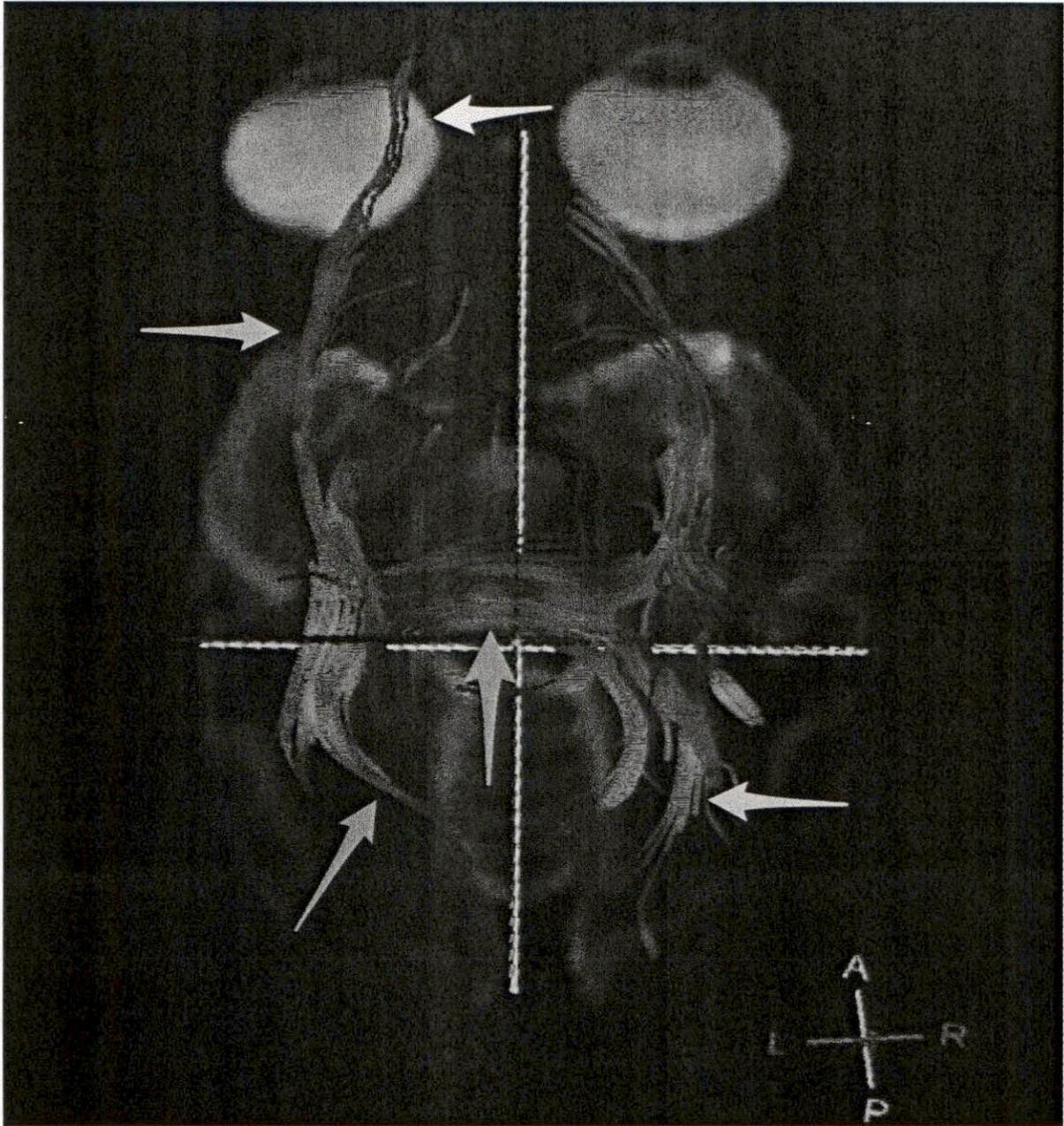


Fig. 16 Tractografía en Cerebro de Mono Rhesus sobre el plano axial y vista cráneo-caudal de la vía óptica. Nervio óptico (flecha amarilla), cintillas ópticas (flecha naranja), radiaciones ópticas dorsales (flecha verde), esplenio (flecha roja) y asa de Meyer (flecha azul).

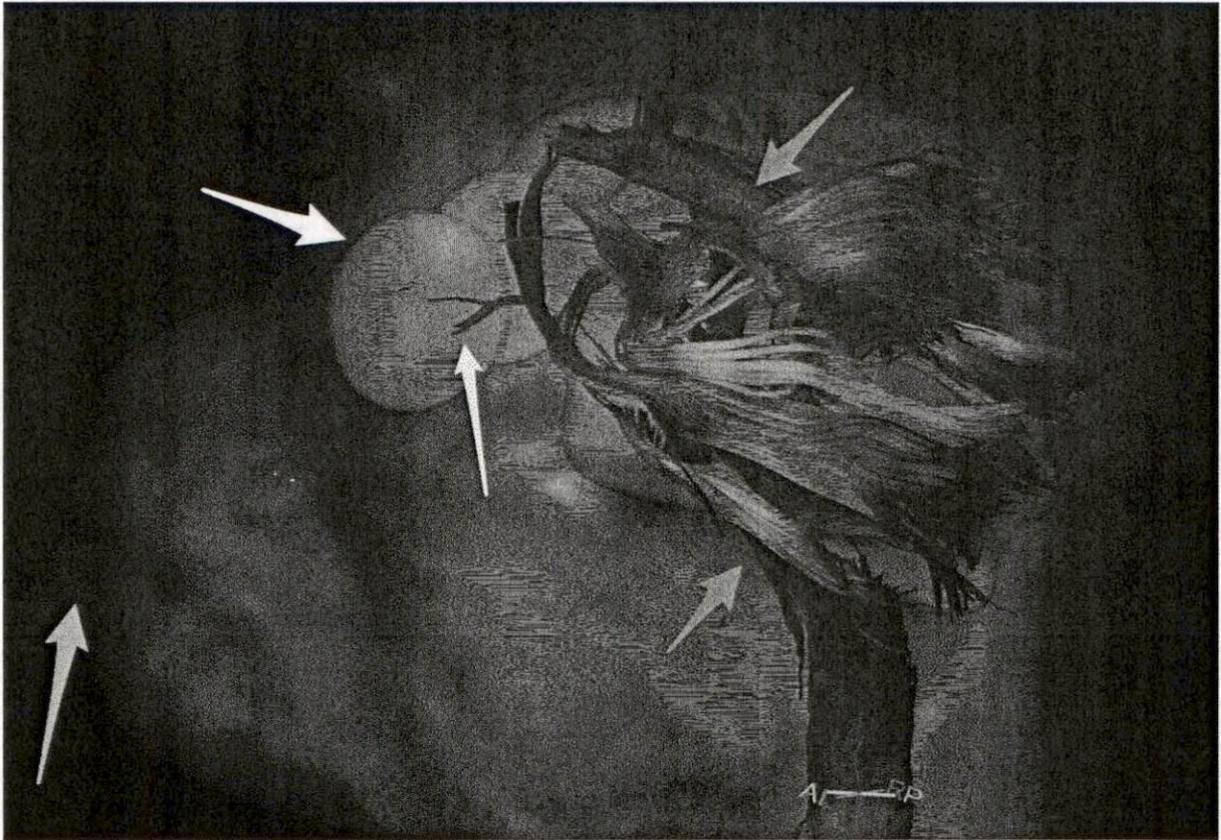


Fig. 17 Superposición de Tractografía y Reconstrucción 3D T2W. Vista sagital de la cabeza de un mono Rhesus sano, se observa la reconstrucción tridimensional de IRM ponderada en T2, dónde se destacan los globos oculares (flecha blanca), la boca (flecha naranja) y el contorno de la cabeza. Sobre está reconstrucción se superpuso la tractografía para mejorar la percepción espacial, se observa el tracto cortico-espinal (flecha azul), el nervio óptico (flecha amarilla) y el cuerpo caloso (flecha roja).

Capítulo 2 Desarrollo

Experimental

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Después de una lesión por sección completa de la médula espinal será posible llevar con IRM un seguimiento prospectivo morfométrico de la zona de lesión, así como determinar si existe reconexión axonal, con y sin implante de polímero semiconductor derivado del pirrol sintetizado por plasma.

Objetivos

- Realizar el estudio longitudinal con IRM.
- Determinar rasgos morfométricos en la zona de lesión.
- Calcular cambios en los valores de la fracción de anisotropía después de una lesión por sección completa de médula espinal a lo largo de los estudios de IRM en primates no humanos.
- Realizar los estudios de Tractografía, para observar el comportamiento de los tractos a través del tiempo después de una lesión por sección completa de médula espinal en primates no humanos.

Síntesis del material

La síntesis por plasma del polímero PPy/I se realizó en un reactor cilíndrico de vidrio Pirex con un diámetro externo de 90 mm y 200 mm de longitud con un volumen aproximado de 1500 cm³ acoplado a un sistema de vacío, una bomba mecánica, a un generador de funciones sinodales y a un amplificador de voltaje. En los extremos del tubo de vidrio se encuentran dos bridas fijas de acero inoxidable. Cada brida en el centro tiene un acceso para un electrodo metálico deslizante de placas paralelas. Estos electrodos deslizables también están contruidos de acero inoxidable y permiten situarlos a la distancia conveniente para la descarga de resplandor. Cada electrodo se conecta eléctricamente con su brida correspondiente de tal forma que el reactor tiene dos electrodos al mismo potencial, esto sirve para hacer que el campo eléctrico generado entre los electrodos sea más homogéneo. Cada brida tiene también dos puertos de acceso. En los puertos de acceso de una brida se conecta el sistema de vacío, consiste de una bomba mecánica y una trampa fría para partículas, y un medidor de presión tipo Pirani marca Edwards. Por la otra brida se da acceso al monómero y al Yodo, los dos en fase vapor. Los productos de la reacción que no se depositaron como película fueron colectados por un condensador enfriado con nitrógeno líquido (Fig. 18).

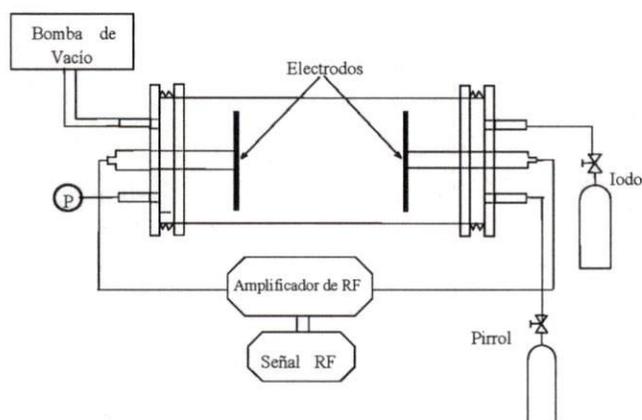


Fig. 18 Esquema del sistema de polimerización por plasma. Al centro la cámara de polimerización, del lado derecho las entradas para los monómeros, en este caso pirrol o Yodo, del lado izquierdo la conexión para la bomba de vacío.

Las descargas de resplandor fueron realizadas por un generador de funciones de radio frecuencia Wavetek-164 a 13.56 MHz y un amplificador de voltaje ENI A150 (Fig. 19). El mecanismo usado es de tipo resistivo a una potencia promedio de 18W, una temperatura aproximadamente constante de 365 °K, con una presión promedio de 1.5×10^{-2} Torr, un potencial entre electrodos de 700 V y un tiempo total de síntesis de 300 minutos. Las descargas de resplandor se llevaron a cabo sin gas portador, sólo con la atmósfera residual del reactor. El pirrol y el Yodo fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se usaron sin alguna purificación adicional.

Una vez sintetizada la película de PPy/I, el reactor se lavo con acetona para separar la película del sustrato y disolver los oligómeros remanentes de pirrol. La película se dejó dentro del reactor por 24 horas en una atmósfera de Yodo para cerrar los radicales libres que permanecían abiertos cuando la descarga concluyo, con este tratamiento final se busca disminuir la oxidación de la superficie de la película y al mismo tiempo un aumento en la cantidad de Yodo, la Fig. 20 muestra una fotografía SEM de laminas de PPy/I extraídas del reactor de polimerización.

Las películas de PPy/I fueron pulverizadas en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino de color marrón, que fue comprimida a 9 toneladas por 10 min para formar una tableta delgada, la cual fue implantada en las ratas. FTR-IR, TGA y análisis morfológico de las películas fueron realizados antes de la compresión.

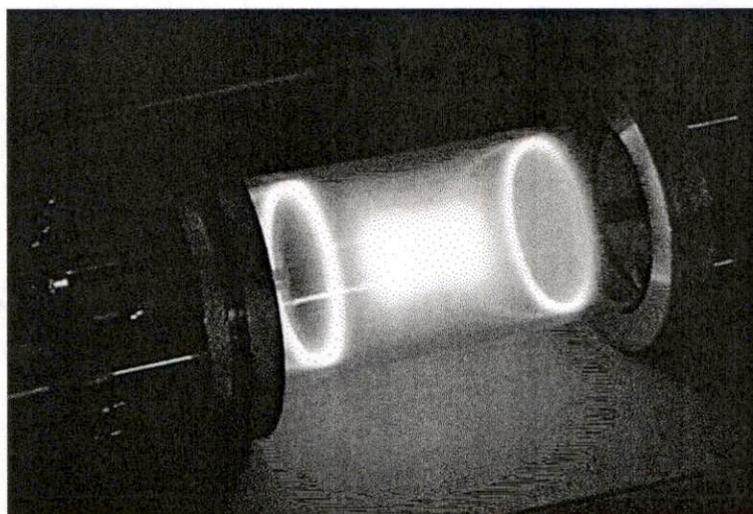


Fig. 19 Reactor de polimerización por plasma. Éste reactor se encuentra en la UAM-Iztapalapa en el laboratorio de polímeros, Física. La luz intensa es el plasma con el cual se realiza la polimerización.

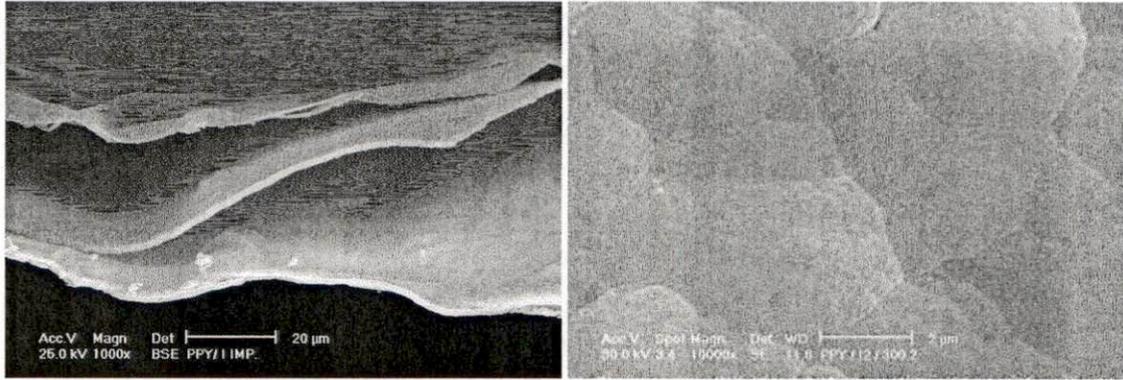


Fig. 20 Microfotografías SEM de polipirrol dopado con YODO. Al retirar el polímero del reactor se obtienen laminillas (izquierda) el material es pulverizado para general el implante. A la izquierda microfotografía transversal del polímero se observa la forma de hojuelas característica del polímero dopado con Yodo. La barra representa 20 μm y 2 μm respectivamente. Fotografías tomadas en e ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares).

Estudio de IRM en Lesión de Médula Espinal de Ratas Implantadas con PPy/I ^[53]

Polímeros sintetizados por plasma derivados del pirrol, han sido implantados en ratas con lesión traumática de médula espinal (LTME) usando un modelo de lesión por sección completa; los polímeros contribuyen a la recuperación funcional después de la lesión. La LTME se estudió usando imágenes por resonancia magnética (IRM). Se usaron reconstrucciones 3D para seguir el arreglo estructural, la localización del implante y la formación de quistes. Las IRM muestran una clara diferenciación entre tejido nervioso, material implantado y quistes formados debido a los mecanismos de daño secundario de lesión.



Fig. 21 Reconstrucción 3D a partir de IRM de médula espinal. Vista Axial. Se observa en azul oscuro la reconstrucción de materia gris y en azul claro la correspondiente a materia blanca, en rojo se observan la reconstrucción de meninges. Las imágenes fueron tomadas en un equipo Varian 7T, con una secuencia estándar gradiente eco.

Modelo de Lesión e Implante

El presente trabajo siguió los lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Se emplearon 16 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas entre 12–14 semanas de edad con peso corporal de entre 230 gr y 250 gr, divididas en 2 grupos:

- Grupo Control. El cual consistió de ocho ratas a las cuales se les practicó una sección completa de la médula espinal a nivel de la 9a vértebra torácica (T9).
- Grupo PPy/I. Que consistió de ocho ratas a las cuales se le aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y se les implantó una pastilla de polímero PPy/I.

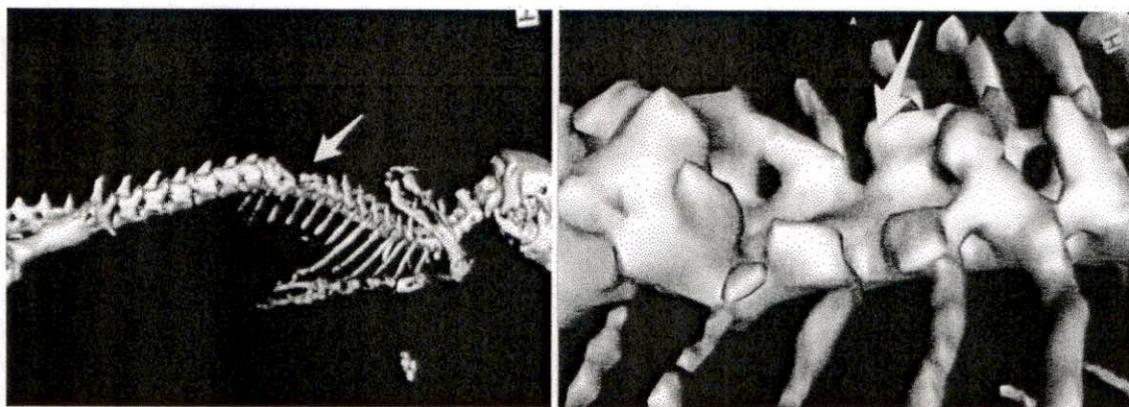


Fig. 22 Reconstrucción de laminectomía realizada. La flecha amarilla indica la posición de las apófisis espinosas extirpadas (T-9, T-10) y la extensión de la laminectomía en el modelo de lesión.

Para realizar la lesión por sección completa de médula espinal los animales se anestesiaron por vía intramuscular con una mezcla de 77.5 mg de ketamina y 12.5 mg de hidrocloreuro de xilacina por kg/peso corporal. Después de la anestesia, los animales fueron sometidos a una cirugía en la que se les practicó una incisión sagital en la piel seguida de una disección de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas. Se extirparon 2 apófisis espinosas de T9 a T10 (

Fig. 22) para observar los procesos laminares de esas vértebras.

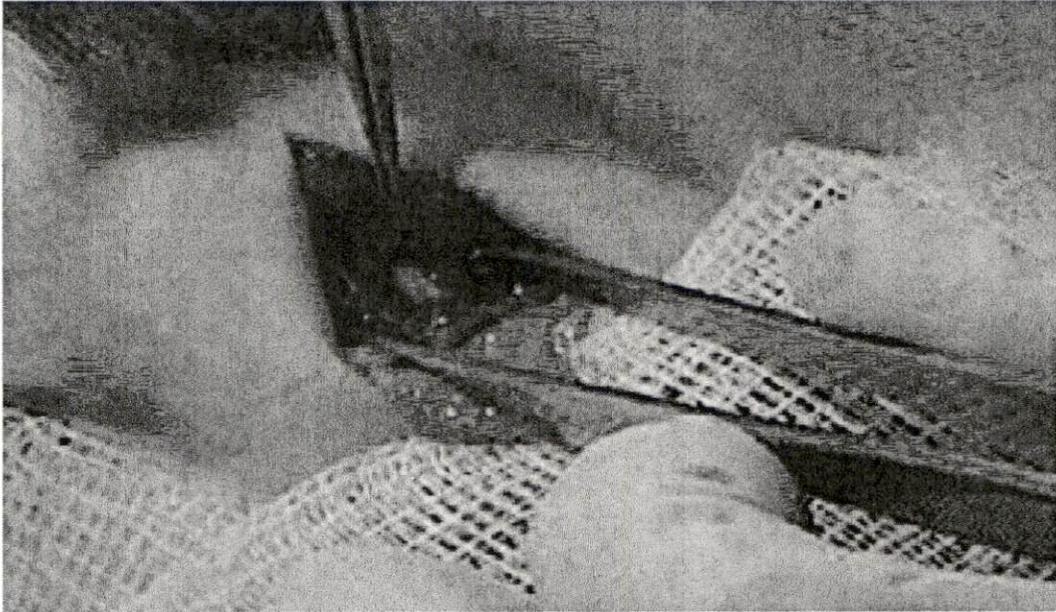


Fig. 23 Médula espinal de rata expuesta. Resultado del proceso de laminectomía en médula espinal de rata, se observa en el centro de la fotografía la médula espinal expuesta (región blanca, entre las pinzas) con la arteria espinal posterior atravesándola. La lesión para el modelo en ratas se realizó en proyecto CAMINA A.C.

Finalmente se realizó una laminectomía de 2 niveles, extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios (Fig. 23). Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía se realizó una incisión longitudinal en meninges de aproximadamente 5mm de largo, referenciando ambos lados de la incisión con un punto simple de sutura de 10-0 (Polipropileno deknatel), posteriormente se hizo un corte transversal completo de la médula espinal, se corroboró mediante gancho de microcirugía y microscopio quirúrgico que ninguna vía nerviosa quedará conectada.

Inmediatamente después de terminar el proceso de lesión por sección completa de la médula espinal en las ratas, justo en el sitio de sección se introdujo en forma transversal un trozo de pastilla de polímero de aproximadamente 3mm de diámetro a los sujetos asignados al grupo PPy/I (Fig. 24), posteriormente a ambos grupos se les pasó una sutura de 10-0 a través de las meninges con puntos simples de sutura.



Fig. 24 Médula espinal de rata extirpada con sección completa con polímero a través de ella (pastilla en la zona central de color oscuro).

Finalmente, la incisión quirúrgica se suturo en 2 planos. La fascia muscular y la piel con puntos simples y continuos respectivamente de 5-0 (polipropileno monofilamento).

Después de la cirugía todos los animales recibieron 200 ml de penicilina benzatínica i.m. (1'200,000 u.i.) y antipirético (acetaminofen) disuelto en el agua de bebida durante 3 días, posteriormente los animales fueron alimentados con una dieta a base de alimento comercial y agua *ad libitum*.

Imágenes de Resonancia Magnética

Estudios de IRM fueron realizados en un escáner Varian 7T. Usando secuencias estándares gradiente-eco (GEMS) con los parámetros de adquisición:

- *TE/TR*: 4/15ms.
- *FOV*: 60x60mm.
- *Angle*: 20°.
- *Matriz size*: 256x256.
- *Thickness*: 1mm.
- *NEX*: 6.

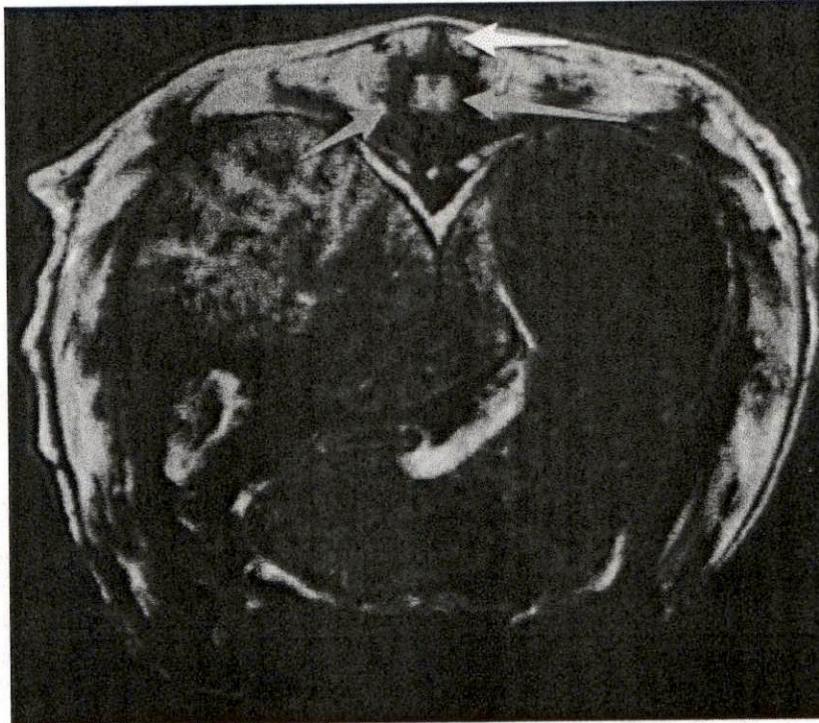


Fig. 25 IRM adquirida en equipo Varian 7T con secuencia estándar gradiente eco. Vista axial, se observa la apófisis espinosa (flecha amarilla), disco vertebral (flecha roja) y médula espinal (flecha azul), se identifica también la materia gris en forma de "H".

En la Fig. 25 se ejemplifican imágenes obtenidas fuera de la zona de la lesión; en el centro superior de la Fig. 25 se puede observar la citoarquitectura intacta del tejido nervioso, donde la característica principal es la forma "H" de la materia blanca, rodeada por el disco vertebral en negro.

Obtención de Médula Espinal de Ratas Lesionadas y Procedimiento Histológico

Las ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas de entre 12-14 semanas de edad con peso corporal entre 230 gr y 250 gr fueron anestesiados con una mezcla de 12.5 mg y 77.5 mg de clorhidrato de ketamina y xilazina por kg/peso corporal, después se perfundieron por vía intracardiaca con 200 ml de solución salina con

1000 UI de heparina, seguido de 500 ml de formaldehído al 10%. Ambas soluciones se transfunden a una velocidad de 30 ml/min con una bomba peristáltica. Después de la perfusión, la médula espinal se removió (Fig. 24) para obtener un segmento de aproximadamente 2 cm a partir del epicentro de la lesión. Se obtuvieron 10 muestras longitudinales secuenciales con un micrótopo de rotación automática con un espesor de 10 μ m cada una. Los segmentos se transfirieron a un baño de agua a 45 °C (cada litro de agua tenía 0.5 gr de gelatina bacteriológica) y luego se colocan en portaobjetos de vidrio para posteriormente ser teñidas con el procedimiento de rutina de hematoxilina-eosina.

Tractografía DTI en Lesión de Médula Espinal con Implante de Polímero PPy/I Sintetizado por Plasma en Mono Rhesus (Macaca Mulatta)

Estudios en modelos animales han contribuido en gran medida a una mayor comprensión de la fisiopatología de la LTME y han servido para poner a prueba varias estrategias de tratamiento dirigidas a recuperar la función motora y sensorial permanentemente; así como para prevenir secuelas neurológicas. Sin embargo, no ha sido posible traducir estos hallazgos eficazmente a mejorar los tratamientos para la LTME en humano.

La traducción de los estudios con roedores a los seres humanos ha sido limitada y esto es debido a las diferencias en tamaño, metabolismo, características neuroanatómicas y neurofuncionales entre ambas especies [54,55]. Por lo tanto, para facilitar la traducción de los avances producidos en el laboratorio a la clínica, está siendo altamente recomendable el uso de primates no humanos [54,56].

Para este estudio se utilizaron dos monos Rhesus (Macaca Mulatta) hembras provenientes de proyecto Camina A.C. Fueron seleccionados de acuerdo a su aspecto general saludable, movilidad, signos vitales saludables y química sanguínea (sin información patológica).

A ambos primates no humanos (PNH) se les realizó la lesión por sección completa de la médula espinal (LPSCME), a uno de ellos se le implanto el PPy/I (RH-I) y al otro solo se le practicó la lesión (RH-C).

Un mes antes de iniciar los procedimientos experimentales, los animales se desplazan de su tropa hacia una jaula (70 cm de ancho, 90 cm de profundidad, y 150 cm de altura). Fueron mantenidos *ad libitum* con *pellets* Purina Monkey Diet 5045® (PMI Nutrition International, St. Louis, MO, USA) y agua.

Para manejar a los animales, se empleó un sistema *Pole-and-Collar* (Primate Products Inc., Immokalee, FL, EE.UU.) que garantizó la seguridad del manejador.

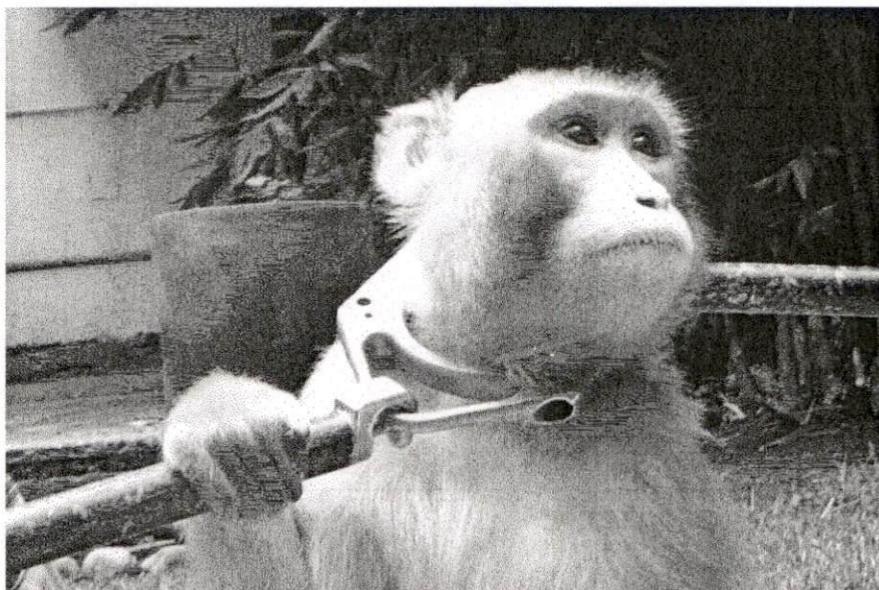


Fig. [53] Mono Rhesus con sistema *Pole-and-Collar*, que garantizó la seguridad del manejador

Los animales fueron tratados en conformidad con los lineamientos éticos de nuestra Institución, de acuerdo a "*National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*". Así mismo el experimento estuvo avalado por los comités de ética de: CAMINA A.C, I.M.S.S. y CI3M.

Modelo de lesión e Implante en Mono Rhesus

El modelo de lesión fue realizado en el quirófano del CI3M. La cirugía fue realizada por el Dr. José Efrén Israel Grijalva Otero y la Dra. Hermelinda Salgado-Ceballos con apoyo de nuestro grupo de investigación, del grupo de investigación de Bioinvert y del grupo de investigación del CI3M. En lo particular realicé la labor de circulante del Dr. Grijalva.

El PNH mantuvo un periodo de ayuno de 12 horas como parte del manejo pre operatorio. Una hora antes de la cirugía se contuvo físicamente para administrar Tiletamina-Zolacepam (Zoletil®) en una dosificación de 4mg/Kg. por vía intramuscular. Se colocó un catéter número 22 (Becton Dickinson Insyte® 0.09x 25 mm) en la vena safena y se transfundieron 20 ml de solución tibia de glucosa al 5%, y posteriormente 500 ml de cloruro de sodio a 0.09% para pasar en dos horas. Se administró por vía intravenosa, 50 mg/kg de ceftriaxona y 1 mg/kg de tramadol. Se monitorearon la frecuencia cardiaca, respiratoria, temperatura y saturación de oxígeno, así como llenado capilar y coloración de mucosas, de forma continua en todo el tiempo pre quirúrgico y tras quirúrgico, el monitoreo se llevo a cabo con electrodos cutáneos (conductores eléctricos) aplicados en la superficie de la piel, en las palmas de las manos y en la planta del pie izquierdo mediante un equipo para constantes fisiológicas marca Ohmeda Cardiocap/5®. Para la inducción de la anestesia se administro propofol 5 mg/kg por vía intravenosa. Se vigilaron los reflejos palpebral y deglutorio para que en el momento que desaparecieran se realizara la intubación. Se administro atropina 0.02 mg/kg por vía intravenosa, y se procedió a intubar al PNH utilizando una sonda endotraqueal con globo del No. 3.5 y un laringoscopio marca Gowllands®. Una vez intubada la tráquea se administro isoflurano a 3% con vaporizador. Durante el transoperatorio se bajó la concentración del isoflurano a 2% manteniéndose así durante la intervención quirúrgica (Fig. 26).



Fig. 26 Preparación de Rhesus para lesión por sección completa de médula espinal. Realizada en el quirófano del CI3M. La cirugía fue realizada por el Dr. José Efrén Israel Grijalva Otero con apoyo de nuestro grupo de investigación, el grupo de BioInvert y el grupo del CI3M.

Posteriormente fueron sometidos a una cirugía en la que se les practicó una incisión sagital en la piel seguida de una disección de los músculos paravertebrales (Fig. 27) hasta dejar las apófisis espinosas expuestas.

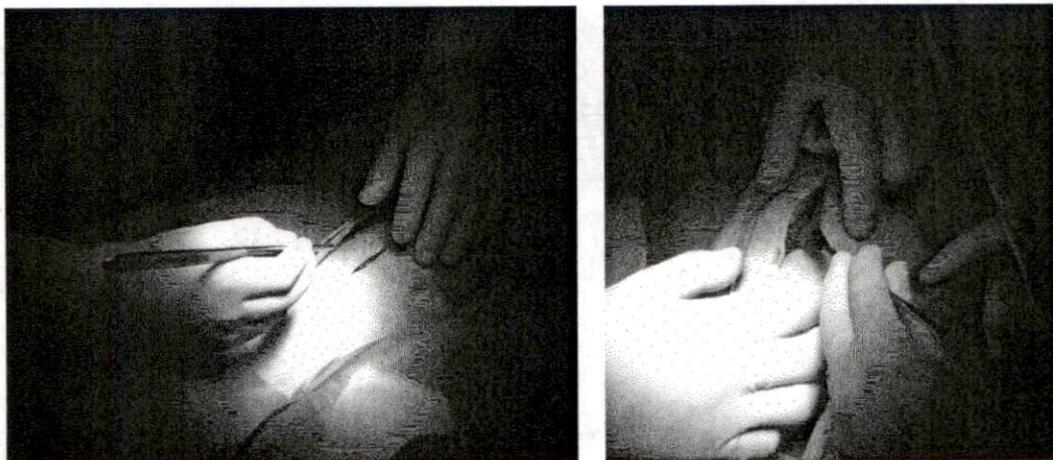


Fig. 27 Modelo de lesión en mono Rhesus. Se observa la incisión sagital realizada en la piel a la altura de T9 (izquierda) y la disección de los músculos paravertebrales (derecha).



Fig. 28 Laminectomía en mono Rhesus.- Se observa la laminectomía realizada y su extensión. Al centro de la lesión la zona blanca es la médula espinal expuesta, inclusive es posible visualizar la arteria espinal posterior justo en medio de ésta.

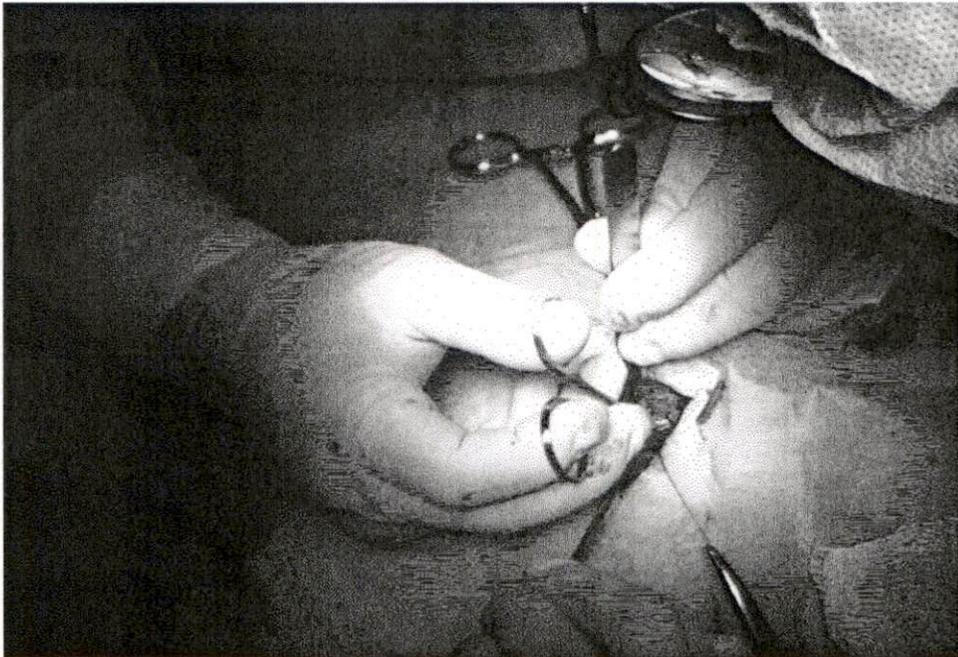


Fig. 29 Corte transversal completo de la médula espinal. En la fotografía el hilo que se aprecia en la parte baja de la lesión, sujeta un extremo de las meninges seccionadas longitudinalmente, el neurocirujano (Dr. Grijalva Otero) esta realizando el corte transversal a la médula espinal.

Se extirpó la apófisis espinosa de la 9ª vertebra torácica (T9) para observar los procesos laminares de esta vértebra. A continuación se realizó una laminectomía, extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas (Fig. 28). Una vez concluida la laminectomía se realizó una incisión longitudinal en meninges, posteriormente, se hizo un corte transversal completo de la médula espinal (Fig. 29), y se corroboró que ninguna vía nerviosa quedara conectada. Inmediatamente después justo en el sitio de sección se introdujo en forma transversal un trozo de pastilla de polímero al mono RH-I, de acuerdo al tamaño de la médula espinal determinado por un estudio de IRM previo (Fig. 30 y Fig. 31), después se pasó una sutura de 10-0 a través de las meninges con puntos simples de sutura. Finalmente, la incisión quirúrgica se suturó en 2 planos.

El retiro de la entubación se inició con el cierre del paso de isoflurano y se retiró la cánula endotraqueal en el momento en que estuvieron presentes los reflejos palpebral y deglutorio, así como movimientos de brazos y piernas. Se corroboró que las frecuencias fisiológicas se encontraran dentro de límites normales para desconectarlos del monitor. Lo último en retirarse fue el catéter venoso corroborando que no hubiera sangrado para llevar al PNH a la IRM.

Con una IRM posterior a la lesión (minutos después de la sutura) se corroboró la LPSCME y la posición del implante (en su caso) para el PNH.

Como profiláctico de infecciones, Ciprofloxacina Lactate (Bayer de México S. A. de C. V., Ciudad México, México; 10 mg/Kg) se administró vía intravenosa cada 12 horas el primer día después de la lesión y luego una dosis intramuscular diaria de 15 mg/Kg durante 6 días. Para la analgesia, Acetaminophen (Cilag, México) se administró vía oral en dosis de 100 mg/Kg por día durante 2 semanas.

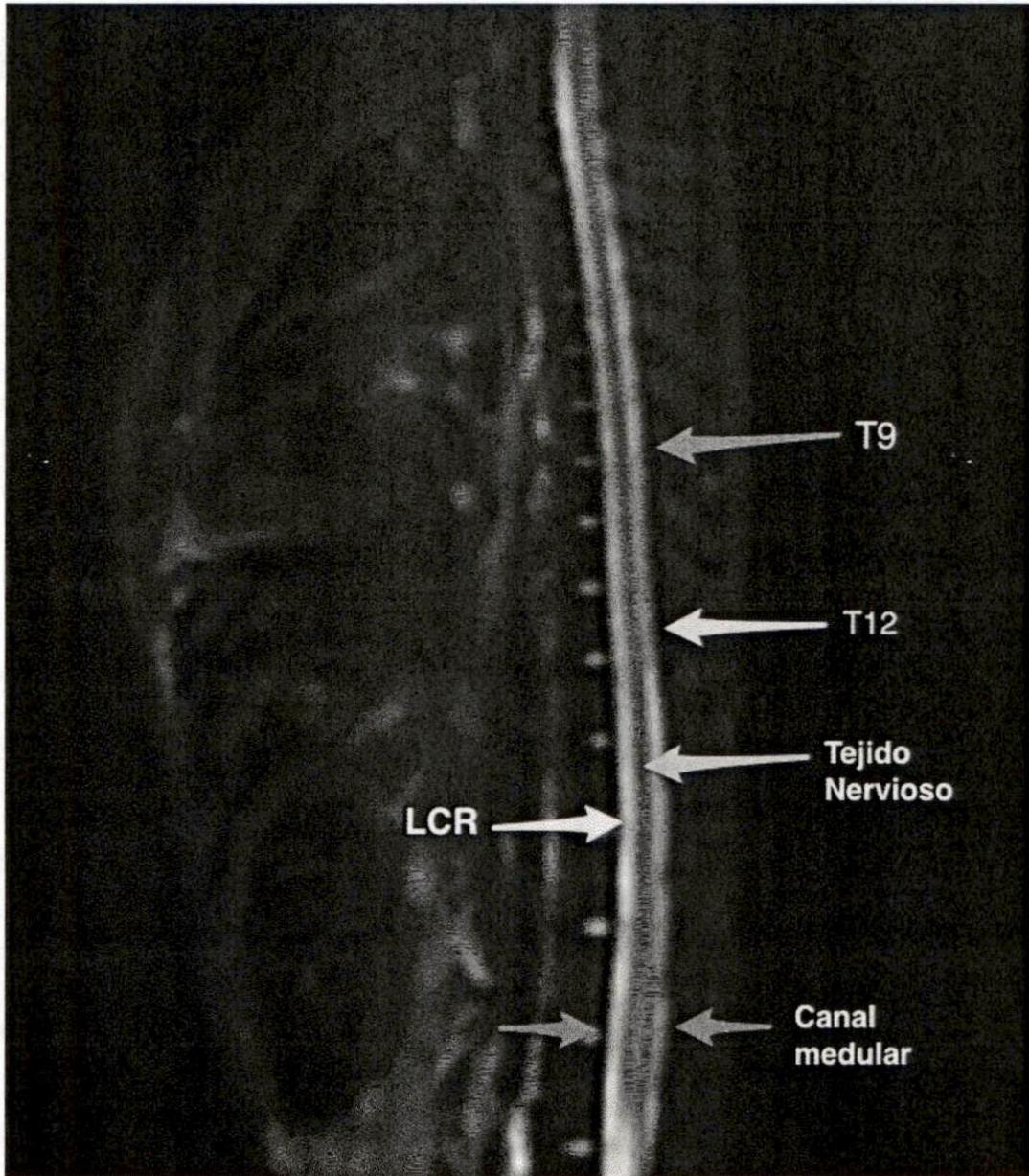


Fig. 30 IRM ponderada en T2. Imagen 3T obtenida en el CI3M previa a la lesión por sección completa de la médula espinal. Se observa la continuidad del tejido nervioso (flecha verde) dentro del canal medular (entre flechas rojas), el líquido cefalorraquídeo (LCR), las vertebrae torácicas 9 y 12 (T9 y T12).

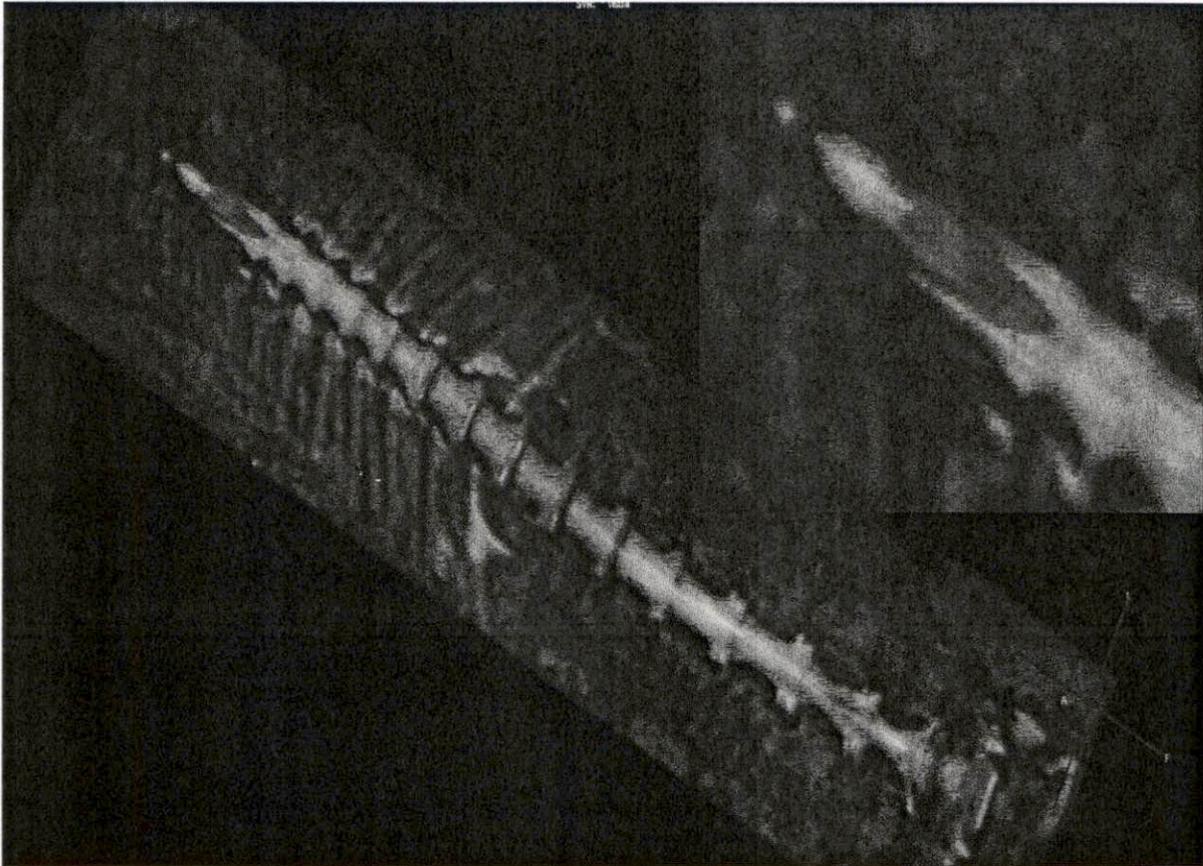


Fig. 31 Reconstrucción 3D de columna vertebral intacta. Ésta imagen es una reconstrucción generada a partir de la secuencia a la que pertenece la Fig. 30. Es posible distinguir la vertebra torácica 12, siendo la última costilla que se observa casi en el centro de la imagen. El acercamiento (recuadro superior derecho) muestra un corte virtual donde se observan: meninges, liquido cefalorraquídeo y médula espinal (naranja) respectivamente (de afuera hacia dentro) en el centro de éste.

Estudios de Imágenes por Resonancia Magnética

Los estudios de IRM y DTI *in vivo* fueron tomados en el CI3M con un escáner clínico Phillips Archieva de 3T. Para las sesiones se mantuvo un periodo de ayuno de 12 horas previas a la realización de la IRM. Se contuvo físicamente para administrar Tiletamina-Zolacepam (Zoletil®) en una dosificación de 4mg/Kg por vía intramuscular. Una vez que los reflejos palpebral y deglutorio desaparecieron fue

colocado en posición de decúbito supino, con las extremidades anteriores y posteriores en extensión. Las secuencias utilizadas se listan en la Tabla 2, los estudios fueron realizados previo a la LPSCME (base); en 0 (t0), 1 (t1), 2 (t2) y 3 (t3) meses post LPSCME. La duración del protocolo de IRM fue de 50 min cada estudio.

Secuencia	TE(ms)	TR(ms)	Matriz(px)	Extra
Densidad de Protones PROSET CLEAR	6.9	10.9	720x720	
T1 VISTA CLEAR	120	2000	768x768	
DIFUSIÓN SE-EPI DTI HIGH ISO	70	5934	256x256	b 800 Gradiente 32 direcciones
T2 T2W DRIVE 3D	100	1600	800x800	

Tabla 2 Protocolo de Imágenes por Resonancia Magnética.

Capítulo 3 Resultados

Caracterización del Material

Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

El espectro de infrarrojo que se muestra en la Fig. 32 se tomó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR muestreando directamente sobre la película de PPy/I, con un intervalo de longitud de onda de 400-4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . El espectro se muestra en modo de absorción.

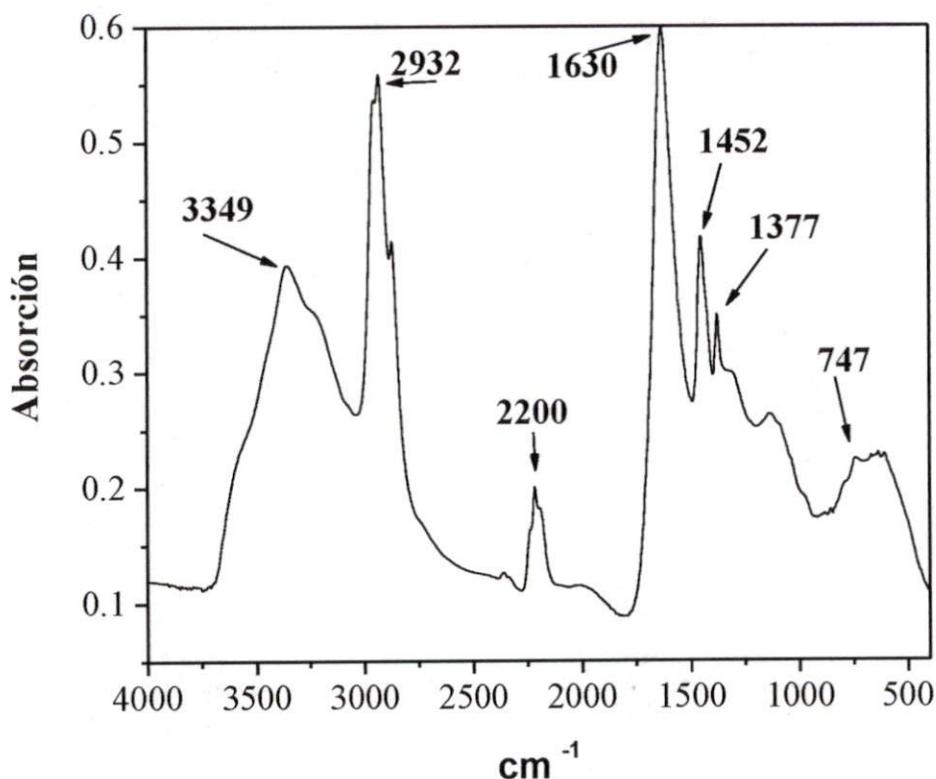


Fig. 32 Espectro de infrarrojo de PPy/I. El pico centrado en 3349 cm^{-1} corresponde a la vibración de las aminas primarias y secundarias (-NH₂, -NH) provenientes del anillo de pirrol. En 1452 cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los grupos metilo (C-H). El pico centrado en 1377 cm^{-1} corresponde a la vibración de los grupos metilos (-CH₃). El cuarto pico centrado en 747 cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los enlaces del tipo C-C.

Como se puede apreciar en la Fig. 32 el espectro está formado de dos bandas amplias y complejas de absorción características de los polímeros sintetizados por plasma. La primera banda se encuentra entre 2400 y 3600 cm^{-1} , en ella se puede apreciar dos picos que sobresalen. El primero centrado en 3349 cm^{-1} corresponde a la vibración de las aminas primarias y secundarias (-NH₂, -NH) provenientes del anillo de pirrol.

Como no se usaron condiciones especiales de almacenamiento de la película, está absorbe una pequeña cantidad de agua (como se muestra en el análisis de TGA), por lo que en esta misma región es posible encontrar vibraciones que correspondan a grupos O-H. El segundo pico centrado en 2932 cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica de los carbonos alifáticos CH₃ y CH₂, indican la existencia de grupos alquilo que se pueden originar por el rompimiento de algunos anillos de pirrol durante la descarga de plasma.

La segunda banda compleja de absorción se encuentra en la región de 500 a 1800 cm^{-1} . En esta banda sobresalen 4 picos. El primero está centrado en 1642 cm^{-1} y corresponde a las aminas primarias, secundarias y terciarias provenientes de la estructura del pirrol, esta vibración junto con 3349 cm^{-1} es una confirmación de la existencia de estos grupos aminas. Además este pico es ancho porque incluye las contribuciones de los grupos amina (C=N) y de los alquenos (C=C) provenientes de anillos rotos de pirrol. En 1452 cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los grupos metilo (C-H). El pico centrado en 1377 cm^{-1} corresponde a la vibración de los grupos metilos (-CH₃). El cuarto pico centrado en 747 cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los enlaces del tipo C-C.

Finalmente se tiene una absorción intensa en la posición de 2200 cm^{-1} que corresponde a la vibración del grupo nitrilo (C≡N) este pico indica el rompimiento de los anillos de pirrol, es una indicación de que el PPy/I es un material ramificado y entrecruzado.

Propiedades eléctricas

La resistencia eléctrica del PPy/I se midió con un multímetro digital marca OTTO MX620 en un arreglo tipo capacitivo con la pastilla situada en medio de dos electrodos de cobre y todo el conjunto montado en un dispositivo de acrílico para darle estabilidad mecánica al conjunto.

El material PPy/I presentó una resistencia de 1.3 M Ω a una humedad relativa de 25%, una resistividad de 45.94 M Ω cm, y una conductividad de 21 nS/cm.

Análisis termogravimétrico (TGA)

La descomposición térmica del PPy/I se hizo con un analizador *Perkin-Elmer thermogravimetric Analyzer Pyris 1 TGA* en una atmósfera de nitrógeno con rampa de calentamiento de 10 °C/min. entre 25 y 700 °C. La Fig. 33 muestra la descomposición térmica de la película de PPy/I. En la gráfica se observa que el polímero pierde aproximadamente el 5% de agua y disolventes entre 25 y 150 °C. Entre 200 y 400 °C el polímero pierde el Yodo y parte de su estructura compleja, con alrededor del 40% de pérdida en peso. A partir de 400 °C, los polímeros tienen una caída de masa moderada que termina en aproximadamente 650 °C. En este punto sólo quedan algunos fragmentos de cadenas con algunos átomos de iodo enlazados fuertemente y que necesitan mayor energía térmica para liberarlos. La descomposición del material finaliza en los 700 °C.

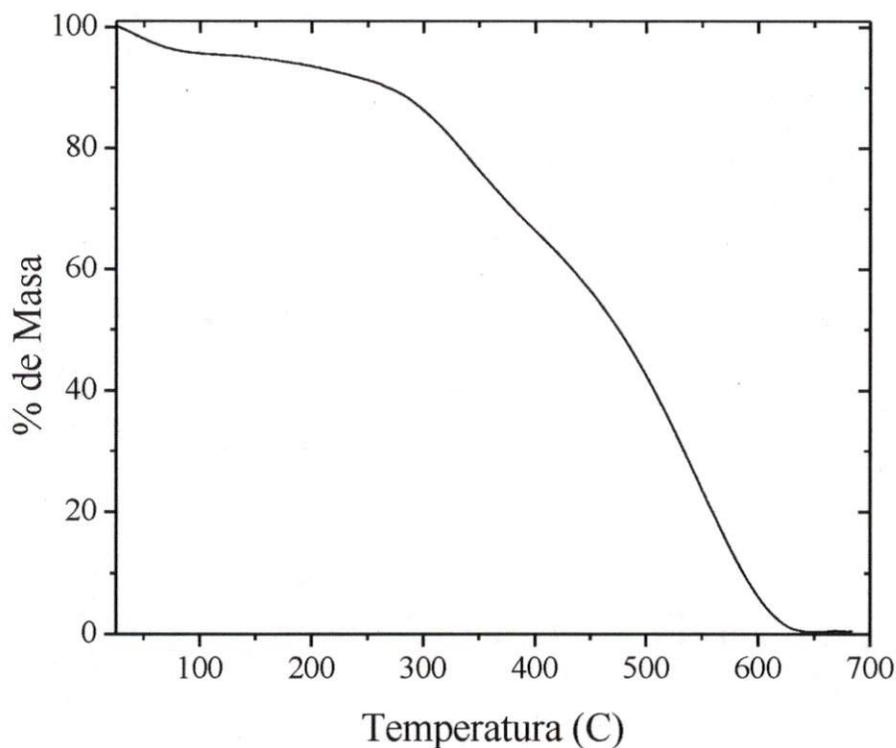


Fig. 33 Descomposición térmica del PPy/I. El polímero pierde aproximadamente el 5% de agua 25 y 150 °C. Entre 200 y 400 °C el polímero pierde el Yodo y parte de su estructura compleja, con alrededor del 40% de pérdida en peso.

Análisis de Rayos-X

En la Fig. 34 se presenta el espectro de difracción de rayos-X de PPy/I. El espectro corresponde a un material amorfo con un pequeño pico cristalino centrado en la posición $2\theta = 22.6^\circ$. Este pico cristalino indica que el material presenta regiones ordenadas que pueden influir en la conductividad eléctrica del material. El espectro de rayos-X y el análisis termogravimétrico sugieren que el contenido de humedad tienen efecto sobre la conductividad eléctrica. Cruz, et al [24], estudiaron el PPy/I a diferentes tiempos de reacción y mostraron que al aumentar la humedad relativa del material aumentaba la conductividad eléctrica. Hay que recordar que este material va a estar en un ambiente biológico y en contacto con fluidos

corporales por lo que estará a una humedad relativa del 100% y por ello su conductividad debe de ser mayor que 21 nS/cm.

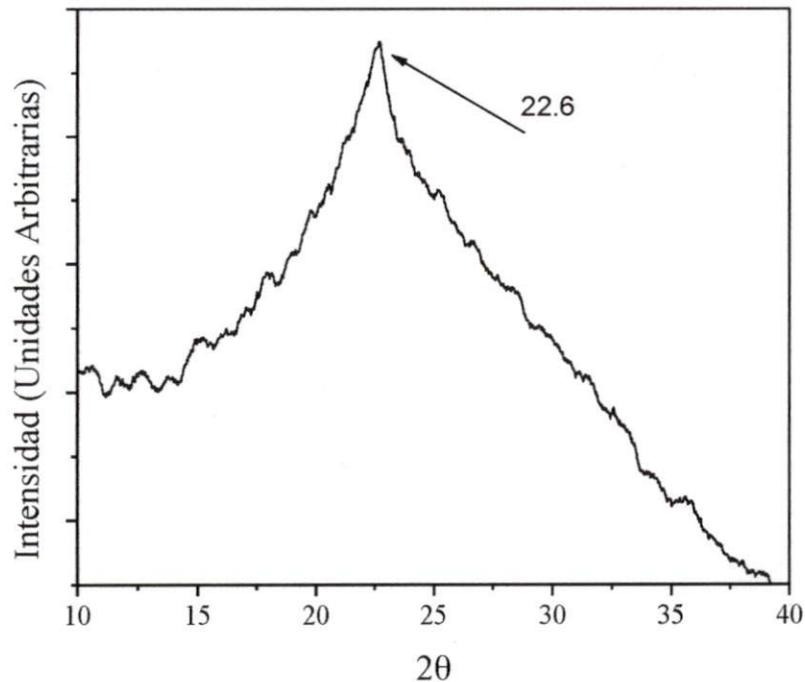


Fig. 34 Difracto grama de rayos-X de PPy/I. El espectro corresponde a un material amorfo con un pequeño pico cristalino, el pico cristalino a 22.6 indica que el material presenta regiones ordenadas que pueden influir en la conductividad eléctrica del material

Análisis Morfológico

La morfología del PPy/I sintetizado por plasma se estudio en un microscopio electrónico de barrido Philips XL 30. En la Fig. 35 se puede apreciar una serie de fotografías de la película de PPy/I. La Fig. 35 (A) tiene una amplificación de 500x, muestra una superficie compuesta de pequeños aglomerados de material con un tamaño aproximado de 5-10 μ m. También se puede apreciar que los aglomerados están distribuidos de manera uniforme sobre toda la superficie. En la Fig. 35 (B) se muestra la película de PPy/I con una amplificación de 10, 000x. La morfología tiene la apariencia de hojuelas de maíz empalmadas entre ellas dando la apariencia de una estructura esponjosa. La Fig. 35 (C) fue tomada a una amplificación de 20,000x,

muestra que el material a escala micrométrica esta compuesto de pequeñas esferas distribuidas uniformemente sobre las hojuelas que se aprecian.

Estas fotografías muestran la morfología superficial de la película de PPy/I, pero este material fue molido en un mortero de ágata hasta convertirlo en un polvo fino (cientos de micrones) y se construyo la pastilla para el implante del cual no se muestran fotografías.



Fig. 35 Microfotografía SEM de PPy/I 500x (A), 10,000x (B) y 20,000x (C). En A muestra una superficie compuesta de pequeños aglomerados de material con un tamaño aproximado de 5-10 μ m. Para B la morfología tiene la apariencia de hojuelas de maíz empalmadas entre ellas dando la apariencia de una estructura esponjosa. Finalmente C muestra que el material a escala micrométrica esta compuesto de pequeñas esferas distribuidas uniformemente sobre las hojuelas que se aprecian.

Con las microfotografías laterales (Fig. 36) podemos observar que el espesor de la película es de aproximadamente 2.5 μ m y que el material no es poroso con los parámetros de reacción empleados.

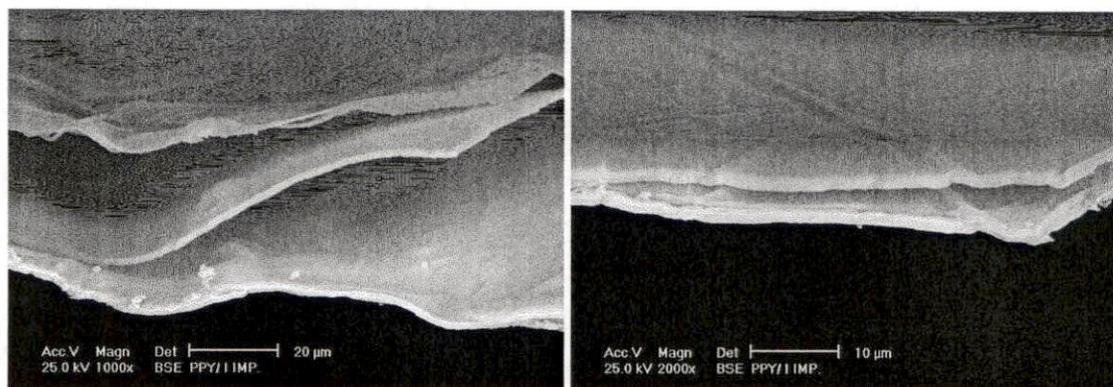


Fig. 36 Microfotografías laterales SEM a)1,000x y b)2,000x. El espesor de la película es de aproximadamente 2.5 μ m y el material es no poroso con los parámetros de reacción empleados.

Estudio de IRM en Lesión de Médula Espinal de Ratas Implantadas con PPy/I

Análisis Histológico

Los grupos de ratas hembras: control e implantado, tienen diferencias histológicas macroscópicas notables. En la Fig. 37 se muestra un corte histológico de Hematoxilina y Eosina del grupo control, en el que aparece en la zona de lesión una barrera rodeada de quistes mostrando una gran pérdida en la citoarquitectura medular. Para el sujeto con implante se observa la integración de la pastilla de PPy/I con tejido a través de la disgregación de éste (Fig. 37 y Fig. 38). Es posible seguir trayectorias que sugieren una conexión entre ambos extremos de la lesión. Hay mayor presencia de tejido preservado respecto al grupo control.

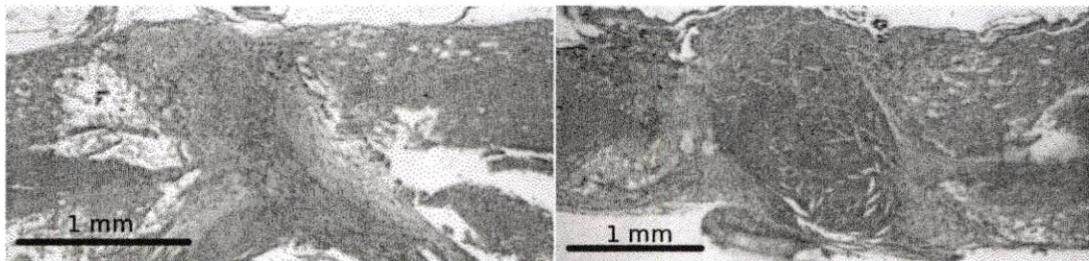


Fig. 37 Histologías de lesión por sección completa de médula espinal a una semana post lesión. Médula de grupo control a la izquierda, se observa la formación de la cicatriz en el epicentro de lesión y la formación de quiste alrededor de ella; grupo PPy/I a la izquierda, se predomina la existencia del material (en el centro de color naranja) ya en esta etapa se puede observar crecimiento de tejido a través de éste, así como la disgregación del mismo.

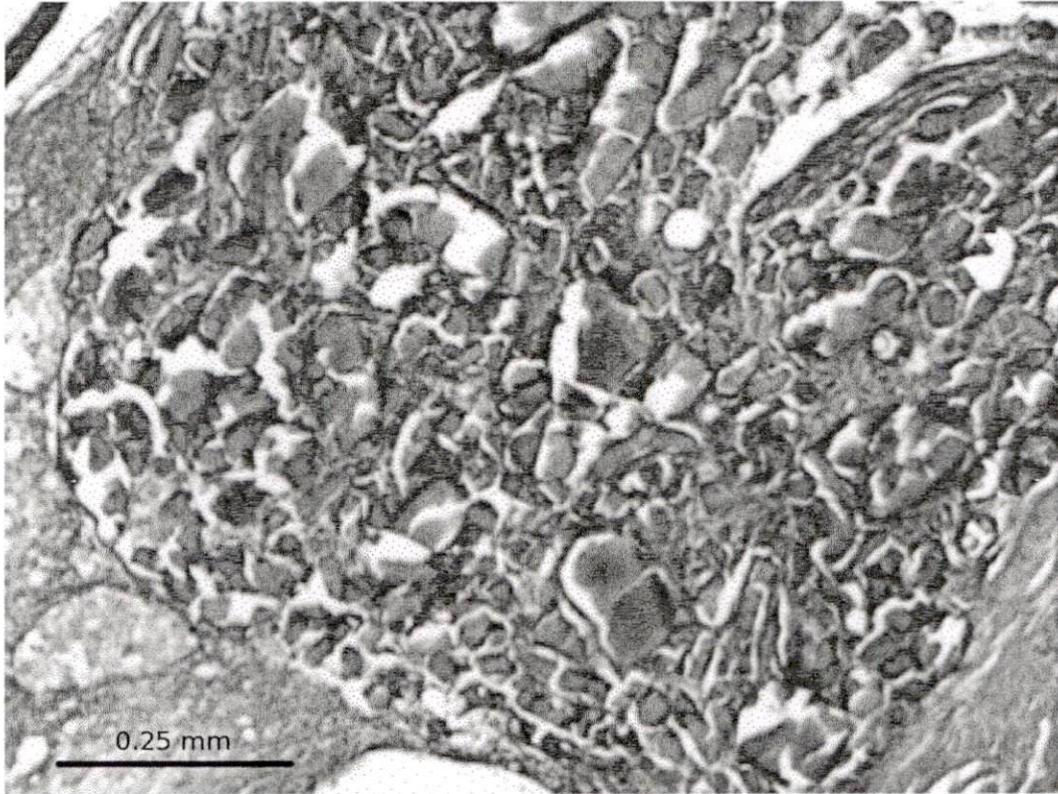


Fig. 38 Histología de implante de PPy/I en lesión por sección completa de médula espinal a dos semanas post lesión. El material se observa en color naranja, el cual se ha disgregado, mostrando crecimiento de tejido a través de él.

A cuatro semanas posteriores a la lesión el análisis histológico de la médula espinal perteneciente a esta etapa reveló la formación de macro quistes los cuales se observan de manera ovalada irregular en color blanco, en dirección tanto caudal como cefálica al epicentro de lesión (Fig. 39, izquierda). Mientras que el sujeto con implante, presenta la existencia de quistes en menor cantidad que su control correspondiente, llama la atención el espacio vacío dentro de la pastilla, el cual se debe a la disgregación del implante de PPy/I conjunto al crecimiento de tejido a través de él, ya que el material no puede sujetarse al momento de realizar el corte con el micrótopo, esparciendo el material en la laminilla. En resumen, el espacio se debe a la técnica de corte y la existencia de la pastilla.

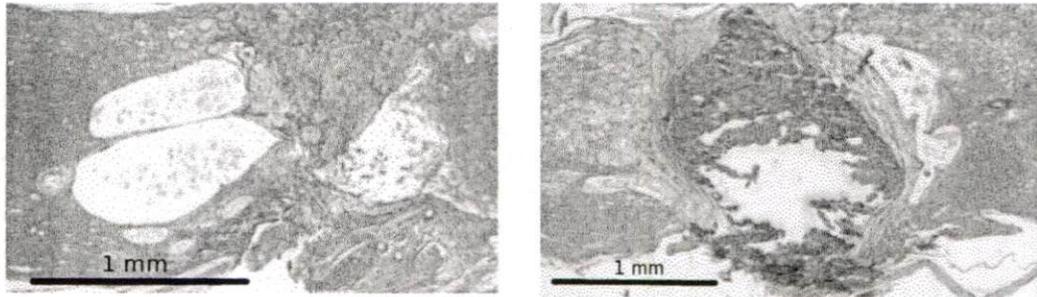


Fig. 39 Histologías de lesión por sección completa de médula espinal a cuatro semanas post-lesión. Se observa en la histología control (izquierda) la coalescencia de quistes y la extensión de la lesión en dirección tanto caudal como cefálica. La histología del grupo con polímero, muestra una menor pérdida de histoarquitectura respecto a su equivalente control, también se observa el hueco dentro del material debido a la técnica de corte la cual desplazo el material que ya no pudo ser retenido (éste material se observa conglomerado en la parte central baja de la fotografía).

El análisis histológico del grupo de ocho semanas post lesión (Fig. 40), para el grupo control se observa la existencia de quistes más grandes respecto a los observados en su mismo grupo pertenecientes a semanas anteriores, y al grupo PPy/I; la formación de un gran quiste es notable, lo cual sugiere coalescencia de los pequeños quistes que se fueron formando a través de la evolución de la lesión. Para el grupo PPy/I se observa como el material se separo y fue desplazado parcialmente de su sitio original, esto hace más evidente el crecimiento de tejido a través de él; también se acentúa la incapacidad del material para mantenerse en la muestra, al momento de realizar el corte.

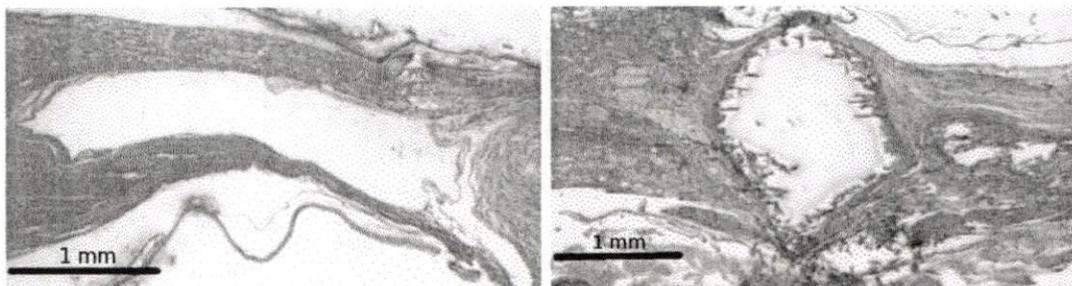


Fig. 40 Histologías de lesión por sección completa de médula espinal a ocho semanas post-lesión. A la derecha la histología control dónde prevalece el quiste el cual tiene un longitud mayor a 2mm. Del lado izquierdo la histología con polímero donde se observa mayor preservación de la histoarquitectura y se acentúa el hueco debido al material desplazado.

Imágenes de Resonancia Magnética.

Los estudios de IRM fueron procesados con OSIRIX. En la Fig. 25 se ejemplifican las imágenes obtenidas para el procesamiento. En la Fig. 41 y Fig. 42 se observan imágenes extraídas a partir de una reconstrucción 3D (El video completo esta disponible con el autor). La Fig. 41 muestra post procesamiento de estudio en 7T a centímetros del epicentro de la lesión. El lado derecho de la Fig. 41 es un acercamiento del área de la médula espinal, la cual muestra la citoarquitectura conservada. La forma de "H" de la materia gris esta claramente definida. La región de interés (ROI), ovalo entre las astas dorsales, esta posicionado en el extremo cefálico de la lesión.

Un corte axial de la zona de lesión se puede observar en la Fig. 42 izquierda, donde se observa la destrucción de la citoarquitectura de la materia gris, la forma de "H" se perdió por completo. En los tres cortes la flecha indica el ROI en el extremo caudal de la zona de lesión. Los otros ROI delimita el área de la lesión. En la imagen central de la Fig. 42 se muestra una sección coronal de la zona de lesión, materia gris sobreviviente se puede observar (área hiperintensa) en los costados de la zona de lesión. Un corte sagital del centro de la médula espinal se muestra en la imagen derecha de la Fig. 42 donde se muestra la extensión de la zona de lesión.



Fig. 41 IRM post procesada. Acercamiento del área de la médula espinal. El ROI (ovalo verde entre las astas dorsales) se encuentra señalando el extremo cefálico de la lesión. Se observa la forma en "H" característica de la materia gris. Las reconstrucciones son a partir de la Fig. 25.

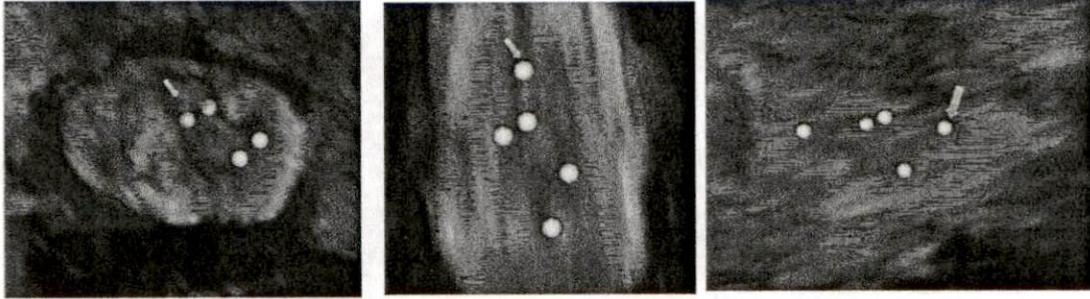


Fig. 42 IRM post procesada en zona de lesión. La flecha indica el ROI ubicado en el extremo caudal de la zona de lesión. Vista axial (izquierda); Vista coronal (centro) y Vista sagital (derecha). En las tres vistas se observa, delimitada por los ROI, la extensión de la lesión por sección completa de la médula espinal.

En las IRM de médula espinal disecada, se obtuvo una resolución de $156 \mu\text{m}$ pp., la Fig. 43 muestra la reconstrucción de estas imágenes con el centro en el epicentro de la lesión. La sección axial (imagen derecha) resalta la materia gris, señal hiperintensa, los filamentos de las raíces ventrales en ambos extremos de la base de la médula espinal (también señal hiperintensa). Se observan la meninges que recubren la médula espinal. Así mismo, entre las astas dorsales (al centro) y a lo largo de las astas laterales, muestra la extensión de la lesión (señal hipointensa) en la región cefálica de la lesión.

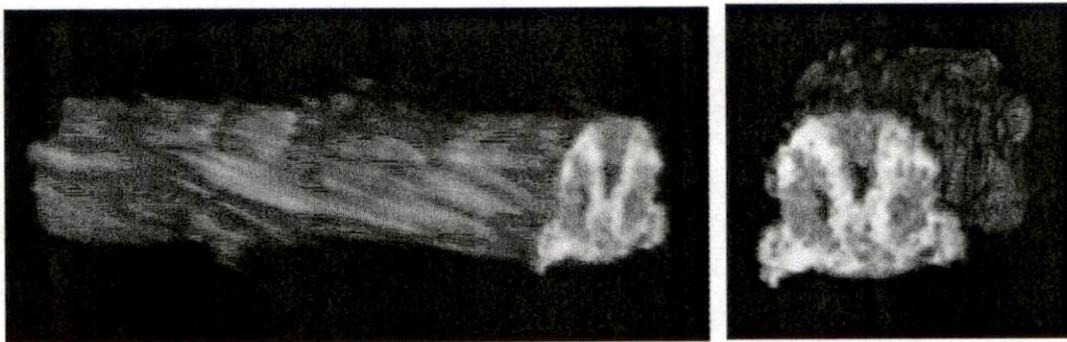


Fig. 43 Reconstrucción 3D de IRM de médula disecada. Vista sagital (izquierda) y vista axial (derecha); se observan materia gris, asta anterior y asta posterior en color amarillo, así como materia blanca en color naranja.

La Fig. 44 muestra una vista seleccionada de la zona de lesión donde se muestra materia gris y materia blanca dispersada. Se observa la destrucción de la

citoarquitectura y la morfología de la médula espinal. En la reconstrucción 3D el espacio vacío observado en el centro corresponde a material y quistes, el cambio de contraste en el epicentro de lesión muestra cambio en la composición de la zona del material implicando así, crecimiento de tejido a través del implante (flecha).

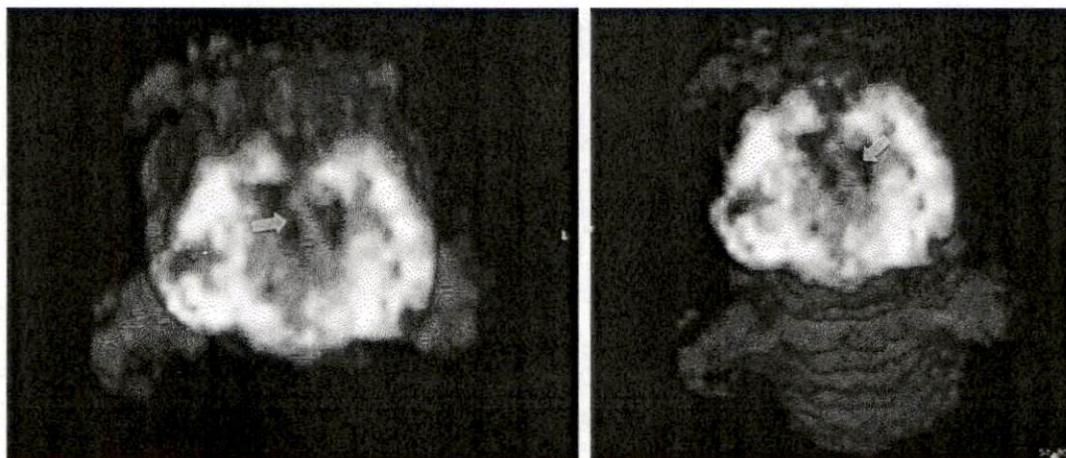


Fig. 44 Sección axial del epicentro de lesión. En el centro el espacio oscuro (señal hipointensa) se debe a la señal correspondiente al implante de PPy/I. La flecha indica la incremento en la intensidad de señal debido al crecimiento de tejido a través del implante.

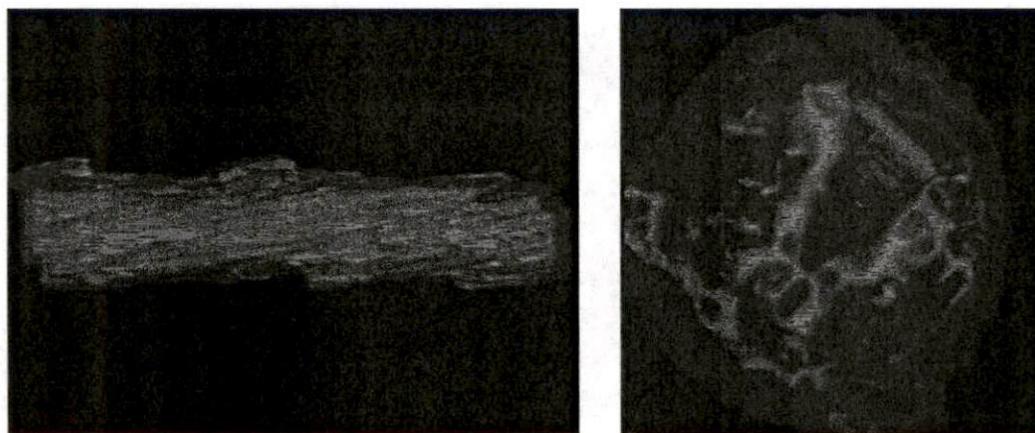


Fig. 45 Reconstrucción de superficie generada por materia gris. En las vistas (sagital a la derecha y axial a la izquierda) en color azul se observa la superficie correspondiente a la señal obtenida de la materia gris

Procesamiento centrado en la superficie de la materia gris mostrada en la [53]; muestra la continuidad de tejido a través de la muestra. También se muestra la vista

axial de este procesamiento, el cual mejora la percepción de la morfología de la materia gris.

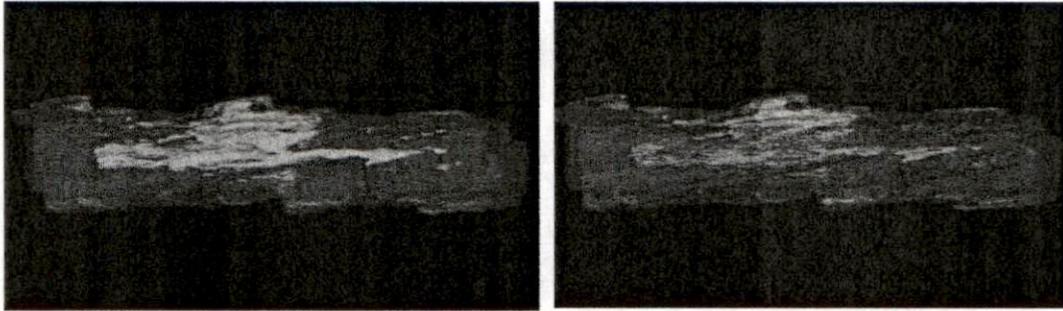


Fig. 46 Superficies reconstruidas. En la izquierda de color naranja la superficie correspondiente a PPy/I, quistes o espacios vacíos. A la derecha se muestra la fusión entre la superficie mostrada del lado izquierdo y la superficie de materia gris (Fig. 45).

La Fig. 46 (izquierda) muestra la superficie generada basada en la señal correspondiente al material, quistes o espacios vacíos en la muestra. Se puede observar el material desplazado hacia el dorso del sujeto mostrado. Esto se debe a fuerzas mecánicas generadas por el crecimiento de tejido. En la imagen derecha se muestra la fusión de las superficies de materia gris y material implantado. Un acercamiento de esta fusión se ilustra en la Fig. 47, a través de la superficie de material y quiste existe superficie generada por crecimiento de tejido.

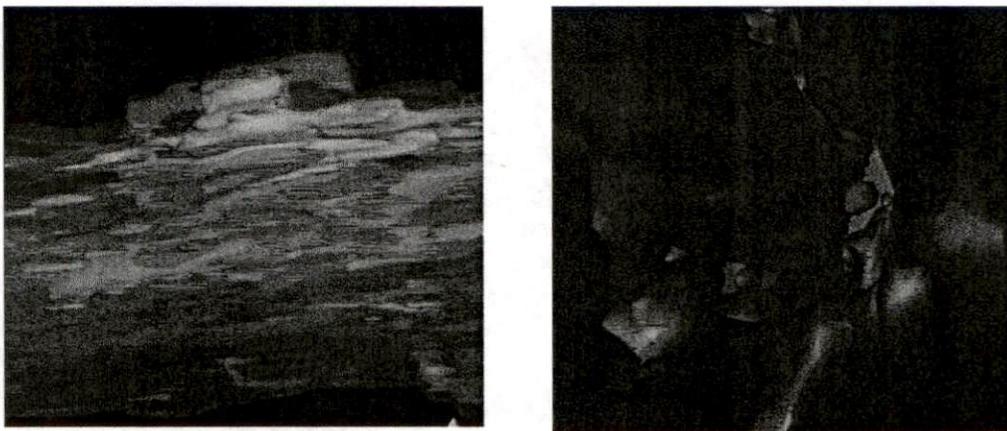


Fig. 47 Acercamiento a la fusión de las superficies de PPy/I y tejido nervioso (Fig. 46). Se muestra tejido en el epicentro de lesión (imagen izquierda, en color azul) dentro del material (color naranja). En la imagen del lado derecho, se observa crecimiento de tejido (azul) a través de la estructura generada por el material (naranja).

DTI tractografía e IRM en isquemia cerebral crónica de mono in vivo [57]

A pesar de que el PNH lesionado no tiene una LTME se emplea procesamiento de imagen y el calculo de la tractografía para su diagnostico, siendo éste un perfecto ejercicio para el análisis central de este trabajo, sin necesidad de generar alguna lesión al PNH.

Un mono Rhesus (*Macaca Mulatta*) macho de 8 años de edad presentó un ataque isquémico a los 6 meses de edad de manera natural debido a un ataque hipoglucémico, generando asfixia e hipotensión arterial, afectando la región subcortical de la zona temporal derecha,. Dentro del cuadro clínico hubo presencia de desvanecimientos y déficit motor del lado izquierdo del cuerpo.



Fig. 48 IRM de Mono Rhesus con ataque isquémico. Vista coronal (izquierda) que muestra la penumbra isquémica en el lóbulo afectado. Vista Sagital T1 (centro) y vista sagital T2 (derecha) se muestra la penumbra por debajo del cuerpo ventricular.

Los estudios de MRI revelaron isquemia en el lóbulo parietal derecho, a partir de el foco de lesión en la arteria cerebral posterior derecha. Las IRM permitieron discernir el diagnóstico ya que este tipo de patologías se pueden asociar con un síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible, debido a que la lesión se presenta en forma bilateral afectando las zonas occipitales con una distribución aleatoria, además de que presentaría un incremento en la presión arterial, en contraste con el caso, que engloba las secuelas neurológicas provocadas por la

hipoglucemia neonatal, donde hay un decremento en el flujo vascular, generando posteriormente una lesión hipóxico isquémica.

Como consecuencia de la estenosis cerebral media se puede observar la disminución de la masa cerebral en el hemisferio derecho, afectando la materia blanca a nivel subcortical (Fig. 49).

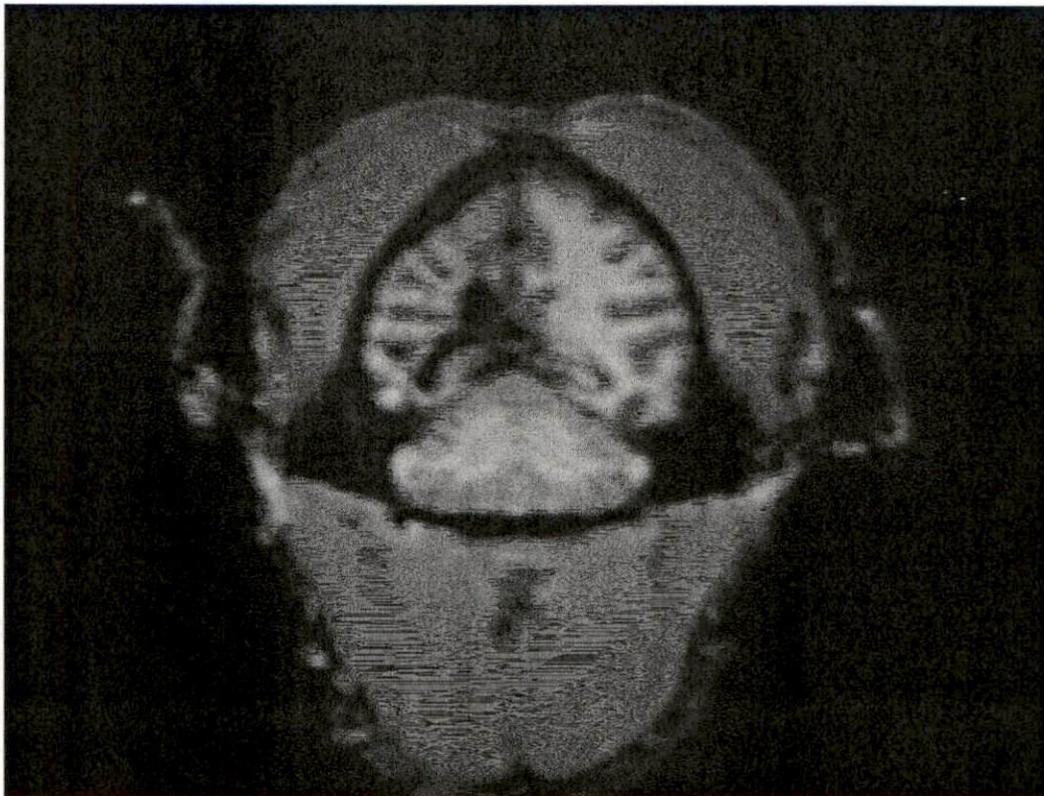


Fig. 49 Vista Coronal compuesta ponderada en T1, se observa la disminución del hemisferio derecho (lado izquierdo en la imagen). Se reveló una pérdida particularmente en la materia blanca del hemisferio derecho, se observa una gran asimetría con respecto al hemisferio izquierdo.

Fig. 48 y Fig. 50 muestran señal del hemisferio derecho correspondiente al área isquémica; La vista Coronal (Fig. 49) ponderada en T1 muestra señal hipointensa o ausencia de la misma en la zona de la lesión, así como la disminución del hemisferio derecho.

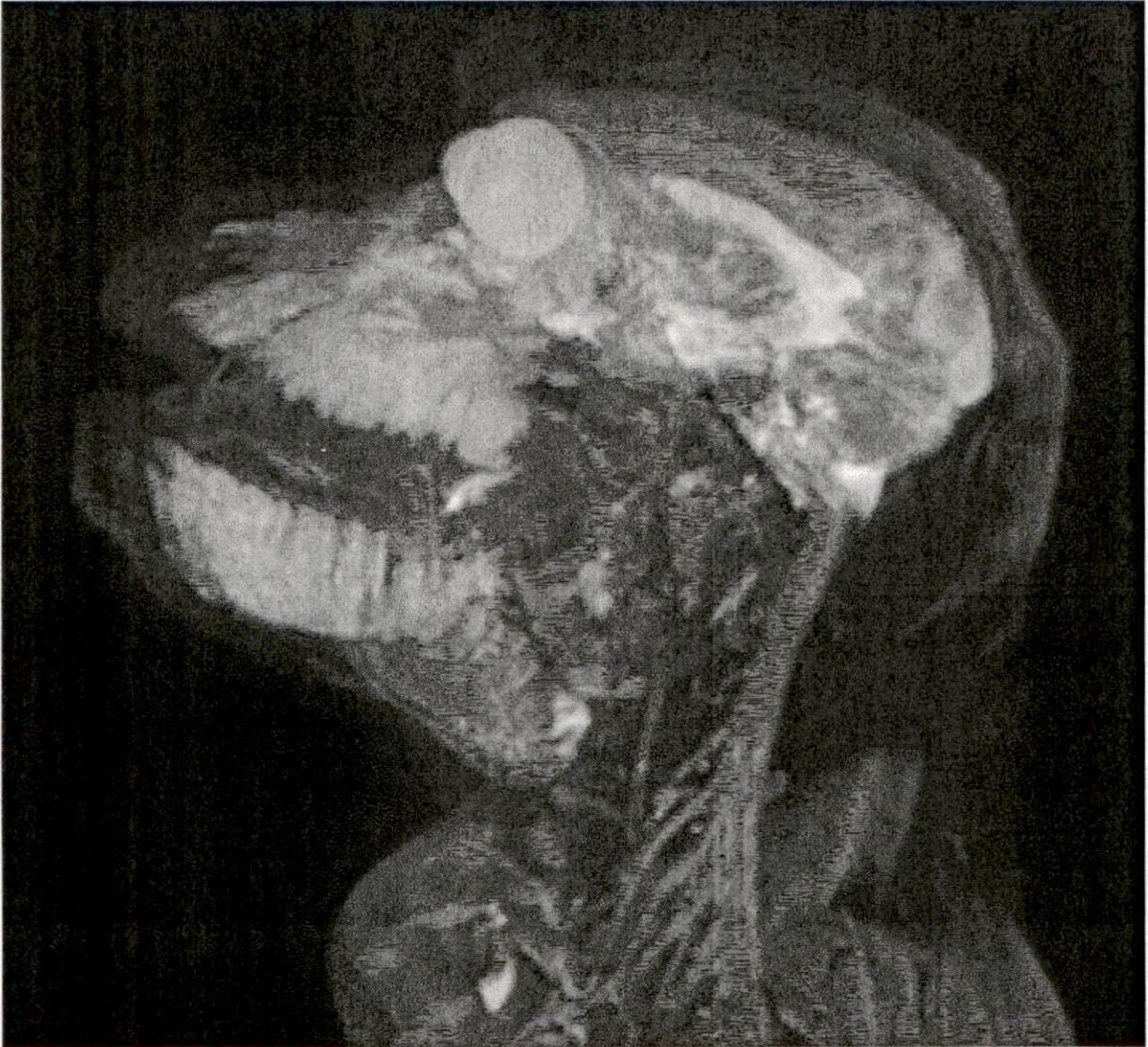


Fig. 50 Reconstrucción 3D de IRM T2W, se observa el área isquémica en el hemisferio derecho por debajo del cuerpo ventricular.

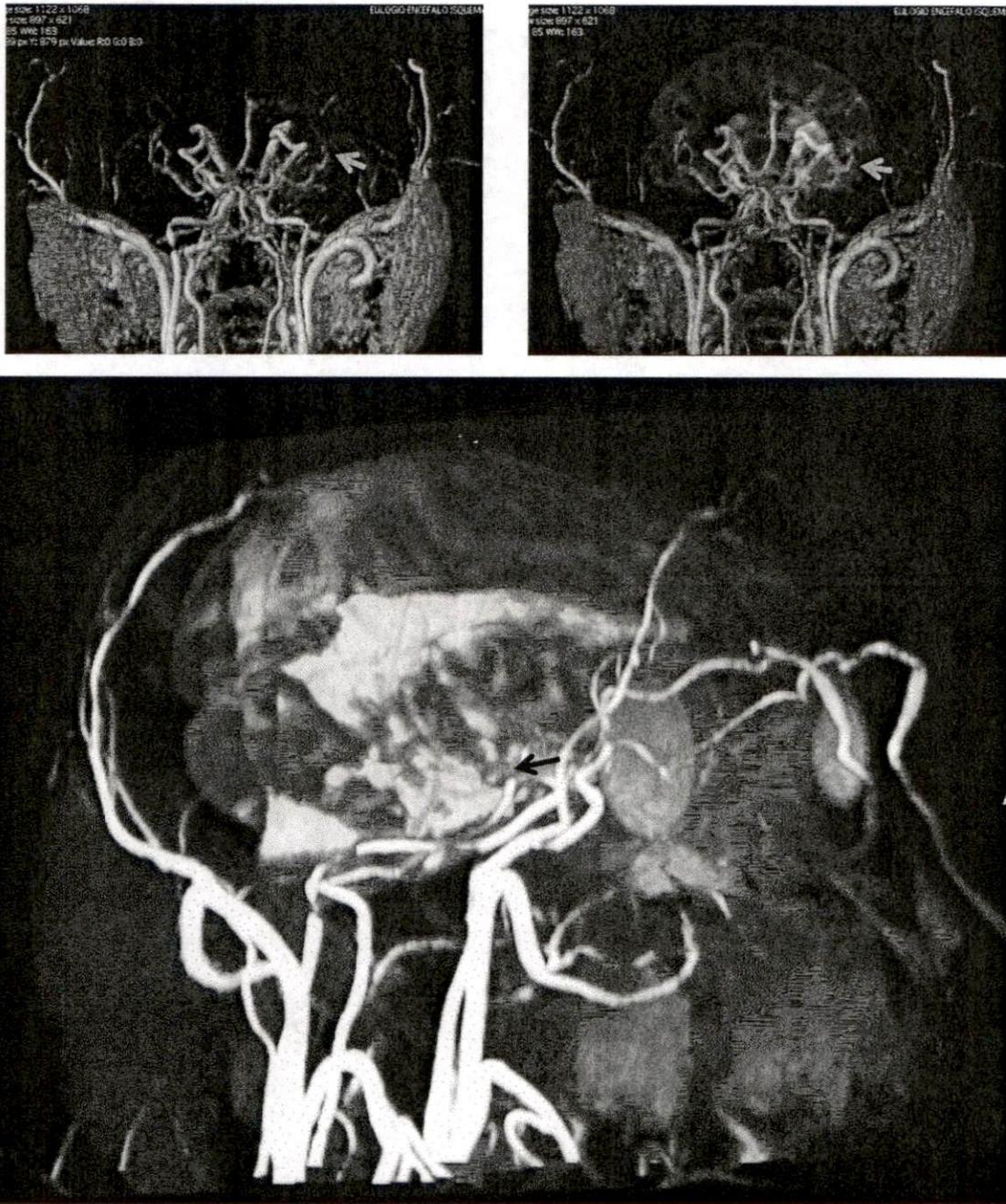


Fig. 51 Angioresonancia de Rhesus con ataque isquémico. Muestra estenosis en la arteria cerebral media punto inicial de la lesión. Vista coronal (superior izquierda) de angioresonancia, superposición de vista coronal e IRM ponderada en T2 (superior derecha). Reconstrucción 3D (inferior) de angioresonancia e IRM T2. La flecha indica el foco de la lesión.

La Angioresonancia (Fig. 51) muestra estenosis en la arteria cerebral media punto inicial de la lesión, marca en la figura con una flecha; La superposición de la

Angioresonancia con IRM-T2 muestra la penumbra isquémica a partir del foco de lesión hacia la parte media del cerebro; Reconstrucción 3D de Angioresonancia y MRI-T2, se reconstruyó la extensión de la lesión en tono hiperintenso, por debajo del cuerpo ventricular.

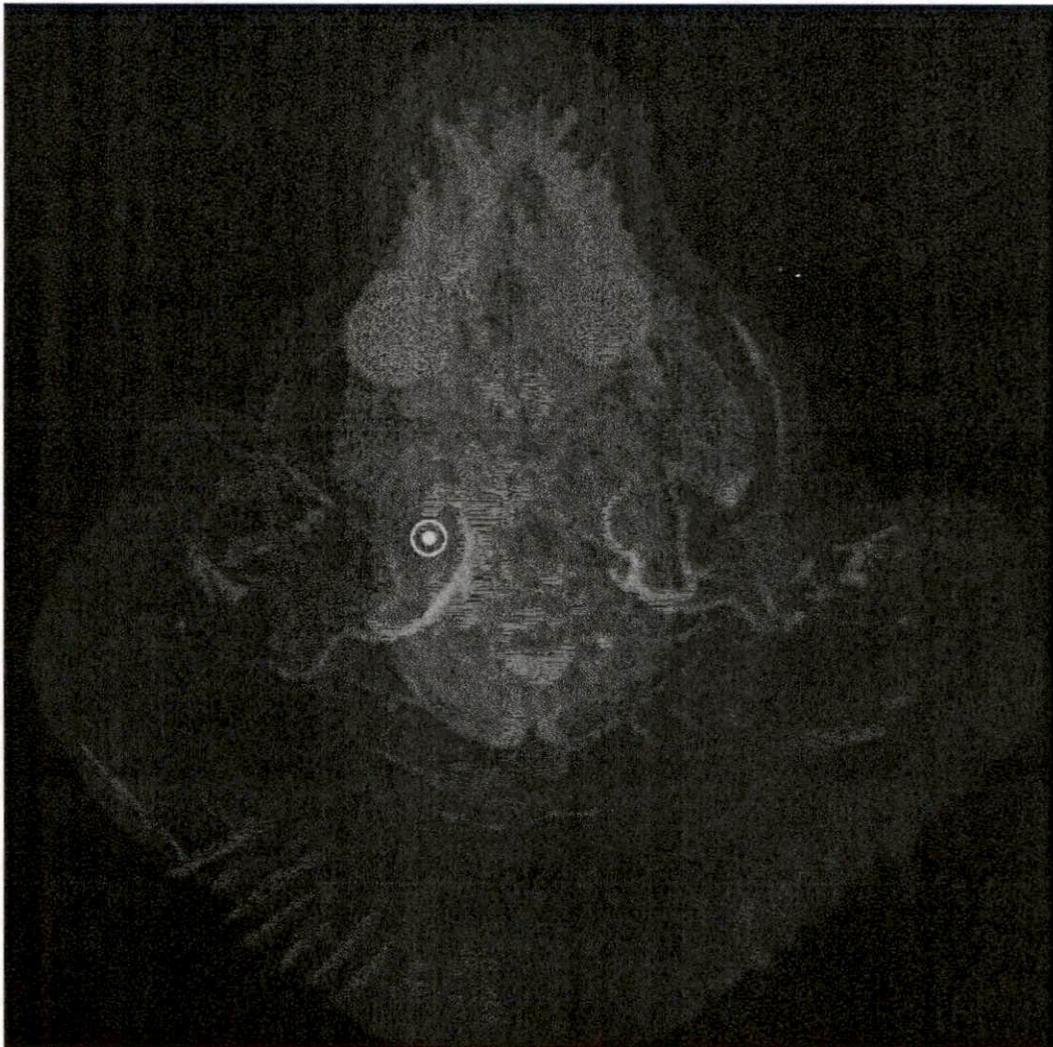


Fig. 52 Reconstrucción 3D Angioresonancia e IRM T2. El ROI muestra el foco inicial de la estenosis y alrededor de este ROI se observa la extensión de la lesión.

En la tractografía de cerebro de Rhesus Sano (Fig. 53), se observa una alta estructuración y orden en los tractos, es posible distinguir diversas estructuras conocidas como: Médula espinal (sumamente importante para este trabajo), Tracto

cortico-espinal, lemnisco medial, asa de Meyer, cuerpo calloso, radiaciones ópticas, cintillas ópticas y nervio óptico.



Fig. 53 Tractografía Cerebro de Rhesus Sano. Se observa una alta estructuración y orden en los tractos, materia blanca, se distinguen diversas estructuras conocidas como: Médula espinal (tracto azul en la parte baja de la imagen), asa de Meyer, cuerpo calloso, radiaciones ópticas, cintillas ópticas, por mencionar algunas.

En la tractografía de cerebro con ataque Isquémico (Fig. 54) es evidente la diferencia entre el hemisferio sano (izquierdo) y el hemisferio con penumbra (derecho), donde no existe la misma estructuración de los tractos, ni el mismo orden observado en el hemisferio sano o contra el cerebro de mono sano. En la zona de penumbra Isquémica no hay persistencia de tractos ni crecimiento a través de ella, de hecho los tractos envuelven la penumbra isquémica.

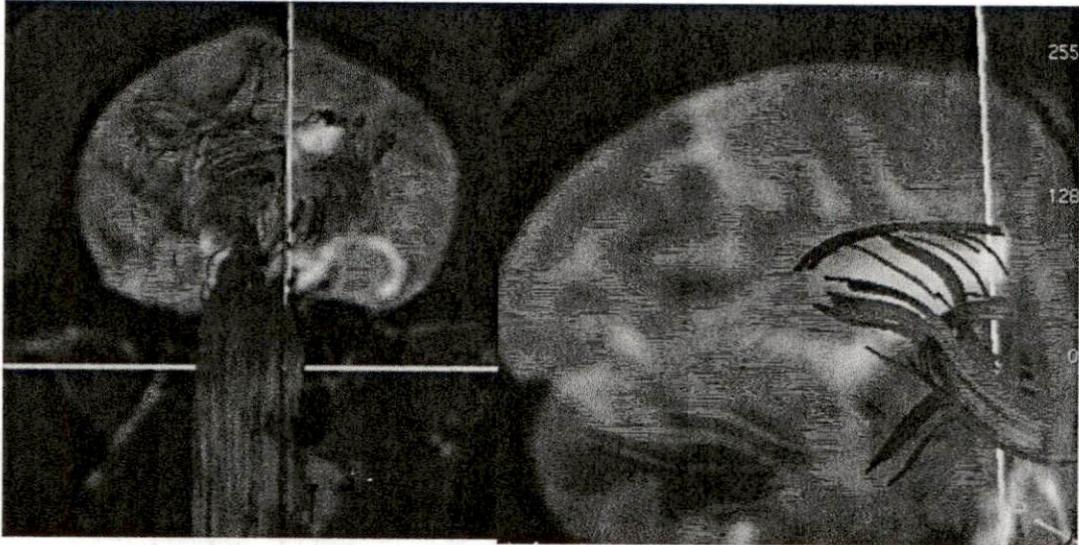


Fig. 54 Tractografía de Rhesus con ataque Isquémico. Se observa una clara asimetría en la estructuración de la materia blanca (imagen izquierda), con la variación de tractos en la zona isquémica donde los tractos rodean cambiando la dirección en ésta zona (derecha).

Tractografía DTI en lesión de médula espinal con implante de polímero PPy/I sintetizado por plasma en Mono Rhesus (Macaca Mulatta)

* *Estudios de Imágenes por Resonancia Magnética*

Mono Rhesus Control

En la Fig. 55 se ejemplifican IRM BASE para RH-C: IRM VISTA CLEAR (izq.), observamos la médula espinal intacta a través de la columna vertebral, se observa la estructura ordenada y definida de la médula espinal, la flecha indica la posición de la 9ª vertebra torácica; IRM PROSET CLEAR (der.) se observa la médula espinal intacta, la flecha indica los nervios espinales provenientes de las astas ventrales y dorsales con dirección al sistema nervioso periférico.

* Una versión de esta sección ganó el concurso estudiantil "DR. BONFIGLIO MUÑOZ BOJALIL" nivel posgrado, en el XXXVI Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica, Octubre 2013. "***Tractografía DTI en lesión de médula espinal con implante de polímero PPy/I sintetizado por plasma en Mono Rhesus (Macaca Mulatta)***". Axayacatl Morales-Guadarrama, Hermelinda Salgado-Ceballos, Israel Grijalva, Juan Morales, Camilo Ríos, Guillermo J. Cruz, Araceli Diaz-Ruiz, Maria-Guadalupe Olayo, Laura Alvarez-Mejia, Rodrigo Mondragón-Lozano, Roberto Olayo.

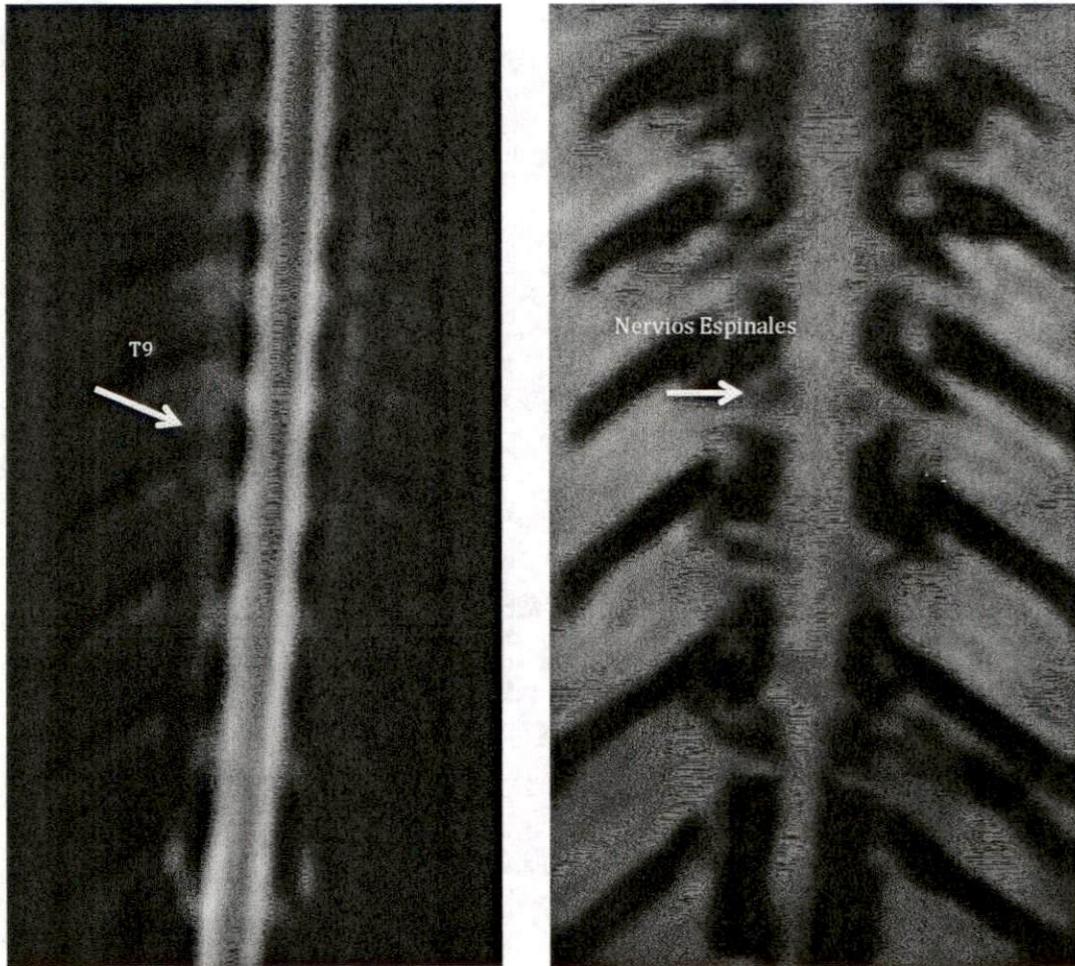


Fig. 55 IRM basal de Mono Rhesus Control: T2 y densidad de protones. En la imagen ponderada en T2 (izquierda) es posible observar la continuidad del tejido nervioso dentro del líquido cefalorraquídeo (hiperintenso), la flecha indica la 9^a vertebra torácica (T9), mientras que en la imagen de densidad de protones (izquierda) se pueden observar las raíces espinales que salen por el espacio paravertebral.

Una de las treinta y dos imágenes empleadas para determinar el tensor de difusión es mostrada en Fig. 56. En dos diferentes posiciones axiales, se observa la difusión de la médula espinal en ambas imágenes ponderadas en difusión, dentro de los círculos marcados en dichas imágenes. La FA se calcula a partir de los eigenvalores e eigenvectores para cada voxel determinado con 32 imágenes similares a éstas; pero con diferente dirección en los gradientes (Fig. 57).

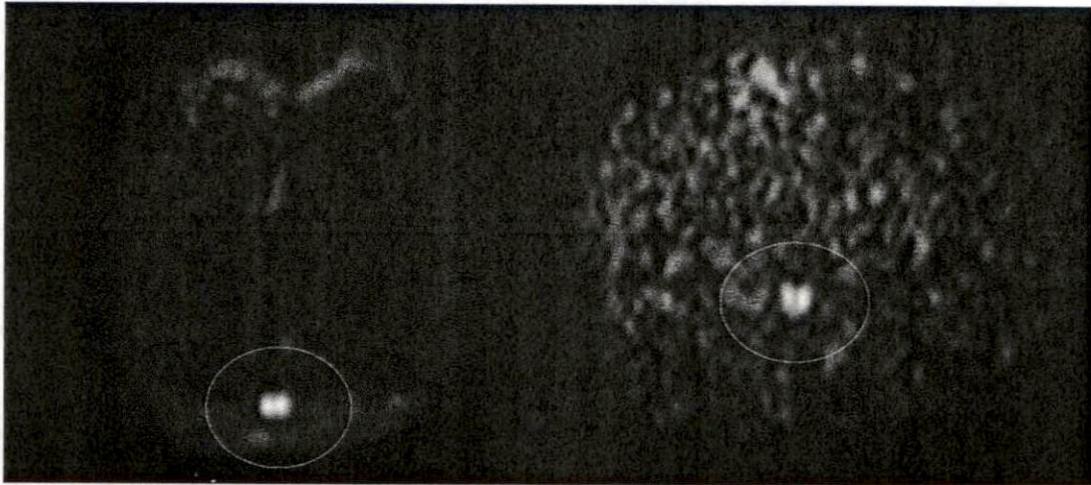


Fig. 56 Imágenes DTI en mono Rhesus control. Estas imágenes ejemplifican una de las 32 direcciones de los gradientes usados para el calculo de FA. Dentro del circulo la zona de médula espinal ponderada en difusión.

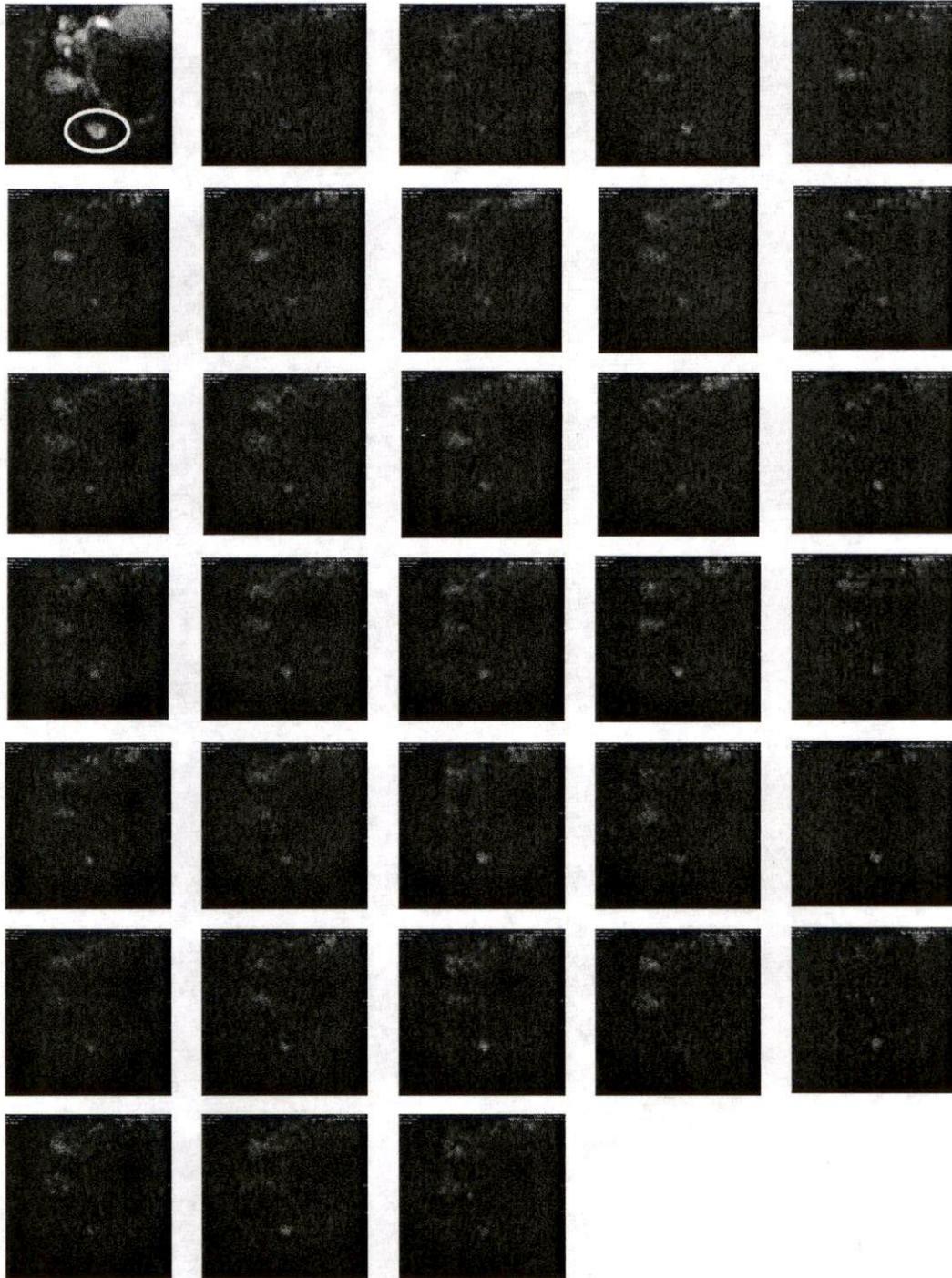


Fig. 57 Imágenes DTI empleadas para el calculo de FA. Las 33 imágenes corresponden a una misma rebanada axial, cada imagen es tomada con una intensidad diferente de los gradientes, todas ellas se emplean para calcular los eigenvalores y eigenvectores para cada pixel. En la primer imagen se indica dentro del circulo, la región de la médula espinal para esa vista axial, correspondientemente es la misma zona para cada imagen.

A continuación (Fig. 58) se muestran imágenes ponderadas en T2 para los tiempos t0 y t3 respectivamente. La IRM para t0 en el epicentro de lesión (izq.) muestra una deshomogeneización en los contrastes de la zona aledaña a la lesión, esto debido a la pérdida de la histoarquitectura de la médula espinal después de la lesión; a la derecha vemos la IRM para t3, donde se destaca con la flecha la formación de un macroquiste (siringomielia post traumática) en el extremo Rostral de la lesión y la extensión del mismo. Se puede distinguir por debajo del quiste la separación que existe entre los extremos caudal y rostral de la médula espinal. Se observa también la evolución de el proceso de cicatrización en la espalda (dentro del óvalo en ambas IRM) del sujeto experimental.

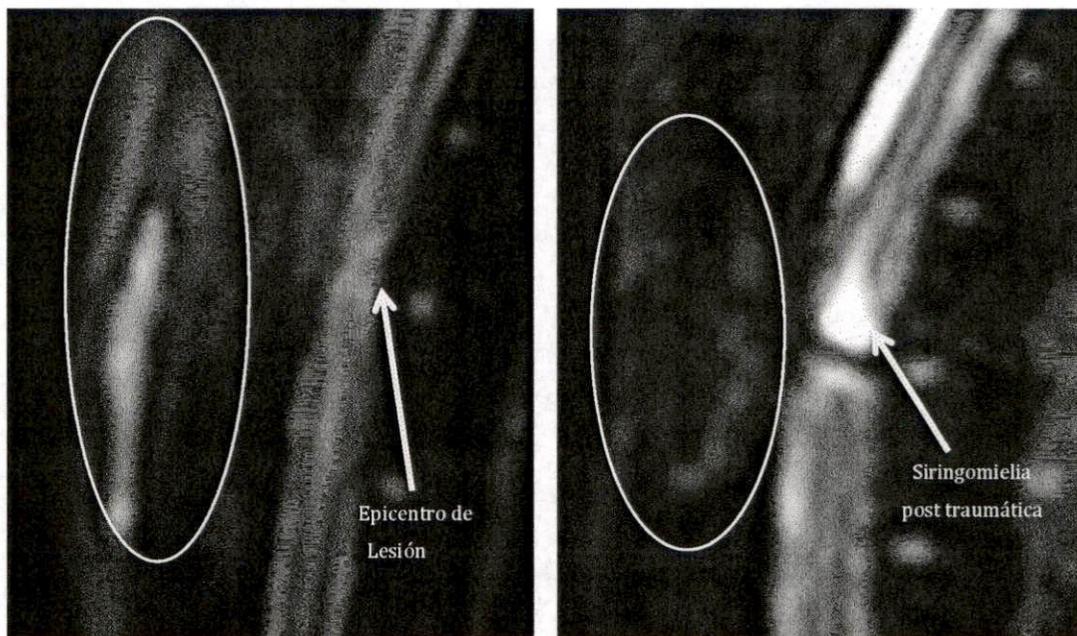


Fig. 58 IRM T2 para mono Rhesus control en la zona de lesión. Estudio tomado inmediatamente después de la lesión (izquierda), dentro del óvalo la zona por la cual se acceso a la médula espinal, la flecha indica el epicentro de la lesión, se observa un acinturamiento y la pérdida de la estructura basal (Fig. 55). En la derecha: estudio realizado tres meses post lesión. En el segmento cefálico de la lesión se observa la existencia de un macro quiste contenido de liquido (siringomielia post traumática) y dentro del óvalo amarillo la zona de tejido cicatrizal.

Mono Rhesus Implantado con pastilla PPy/I

IRM PROSET y VISTA (Fig. 59), se observa la posición específica del implante, comprobando el nivel de la lesión (9ª vertebra torácica) y la posición transversal de la pastilla respecto a la médula espinal, se confirma la lesión por sección completa de la médula espinal. La morfometría de la zona de lesión se discute más adelante. Se destaca también un efecto mecánico en la zona de lesión que provoca que la médula espinal este pegada a la pared ventral de la columna vertebral. La presencia del implante parece favorecer a que no se pierda la conformación inicial en la zona del implante, la cual se observa homogénea con respecto a su equivalente en el sujeto control. Se observa también la extensión de la laminectomía de 1.57 cm.

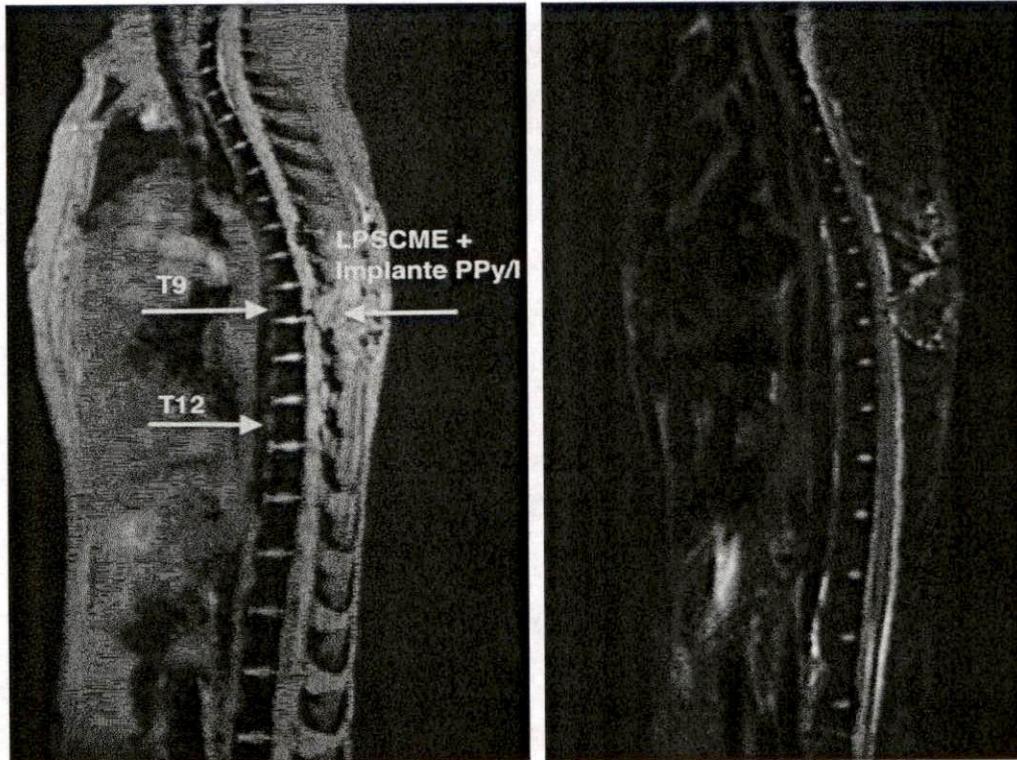


Fig. 59 IRM densidad de protones y T2 para mono Rhesus implantado. Donde se observa en ambas imágenes la lesión por sección completa de médula espinal y el implante en forma perpendicular al tejido medular al nivel de T9. También llama la atención el efecto mecánico debido a la intervención quirúrgica, que desplazó la médula espinal hacia la zona ventral del canal medular.

Para t3, IRM VISTA CLEAR (Fig. 60) se observa como se recupera el espacio entre la pared ventral de la columna vertebral y la médula espinal (zona hiperintensa izquierda). También se distinguen cambios en el epicentro de la lesión en comparación con t0(Fig. 59) donde el espacio ocupado por el implante (zona hipointensa) es contundente y en t3 existe un cambio en la intensidad de la imagen en esta zona. Esto se debe al comportamiento del material, aprendido del modelo en ratas [53], en el cual dentro de la médula espinal el material se disgrega y crece tejido a través de él; así pues, reduce la aportación neta del material a los voxeles en la zona de implante (en Fig. 60 la flecha indica esta zona).

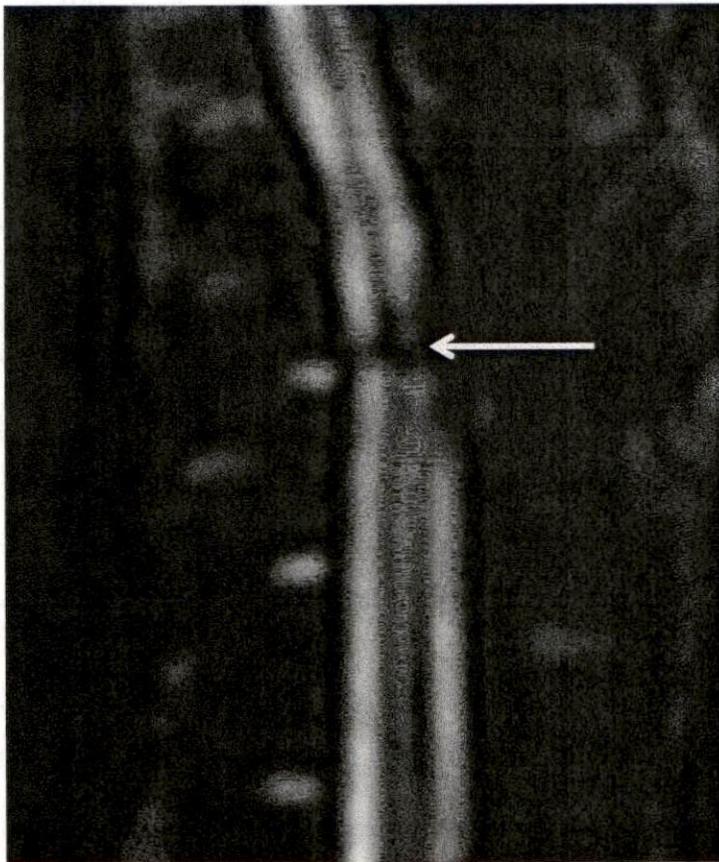


Fig. 60 IRM-T2 en mono Rhesus con implante en zona de lesión a tres meses post lesión. La flecha indica la zona en la que se implantó el material, se observa un cambio en la contribución del material a la señal de resonancia magnética, esto implica un cambio en la composición en la zona del material en contraste con la imagen del día de la lesión (Fig. 59) donde la pastilla es homogénea (completamente hipointensa).

Morfometría

Para su estudio se dividió el contenido dentro de la columna vertebral en 5 diferentes tipos de materiales:

- MÉDULA.- Tejido dentro de la zona de lesión con tiempos de relajación correspondientes a Materia Gris ó Materia Blanca.
- QUISTE.
- PPYI.- Implante de polímero PPy/I.
- ESPACIO.- Zonas con tiempos de relajación suficientemente rápidas para no ser caracterizados(fuera de la zona de implante) y del tamaño necesario para no tener efecto de borde.
- MNC.- Demás material contenido dentro de la columna vertebral. LCR, meninges, tejido no medular, etc.

Mono Rhesus Control

La evolución de los diferentes materiales implicados dentro de la columna vertebral de RH-C se enlistan en Tabla 3 y Tabla 4 las cuales están graficadas en Fig. 61 y Fig. 62. La Fig. 67 muestra imágenes de la morfometría realizada para cada estudio de IRM obtenido.

Se destaca la disminución de MÉDULA a través del tiempo, en t0 disminuyó el 52.21% y entre t2-t3 28.27%; coincidentemente con el tiempo(t2-t3) en el que se presenta el incremento de QUISTE hasta un 10% de toda la zona analizada, el cual aparece en t1 con un 3.1% no teniendo cambios significativos en t2. +M va incrementando, un aporte importante lo recibe por el efecto de borde, ya que por la resolución va englobando diferentes tipos de tejido en este tipo de Material.

Región	Base(mm ³)	t0(mm ³)	t1(mm ³)	t2(mm ³)	t3(mm ³)
MNC	579.57	749.11	733.58	736.13	749.82
MÉDULA	382.27	199.62	183.08	181.71	108.10
CICATRIZ	0	13.12	14.91	13.78	7.17
QUISTE	0	0.00	30.27	30.22	96.76

Tabla 3 Morfometría expresada en Volumen RH-C.

Región	Base	t0	t1	t2	t3
MNC	60.3%	77.9%	76.3%	76.5%	78.0%
MÉDULA	39.7%	20.8%	19.0%	18.9%	11.2%
CICATRIZ	0.0%	1.4%	1.6%	1.4%	0.7%
QUISTE	0.0%	0.0%	3.1%	3.1%	10.1%

Tabla 4 Morfometría expresada en Porcentaje RH-C

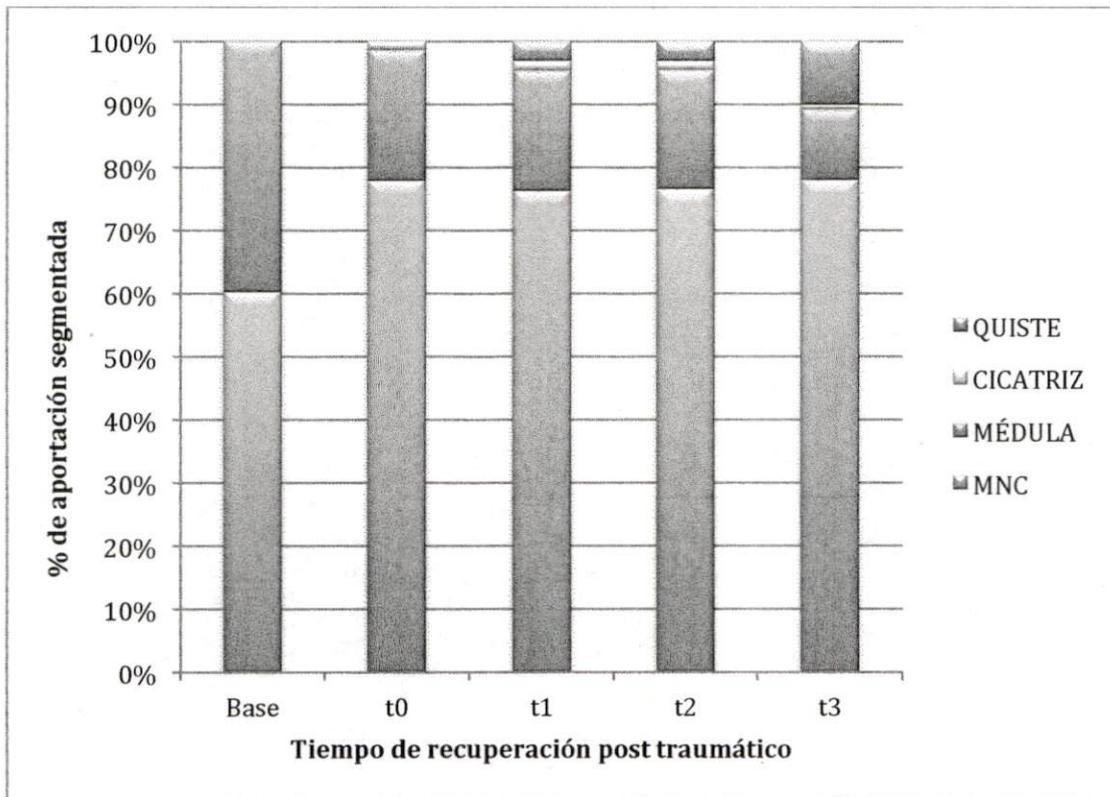


Fig. 61 Morfometría de la zona de lesión en mono Rhesus control a partir de IRM. Se observa el crecimiento del quiste a partir del primer mes (t1) post lesión hasta ocupar un 10.1% (96.76 mm³) del volumen total analizado. La cicatriz va disminuyendo su espesor a través del tiempo de 1.4% a 0.7%. El tejido medular sufre una disminución del 39.7% hasta el 11.2%, mientras que el tejido no caracterizado (MNC: meninges, liquido cefalorraquídeo, micro quistes, entre otros) incrementa del 60.3% hasta el 78%.

Haciendo énfasis para el material de bajo porcentaje, observamos como QUISTE crece entre t2-t3 hasta un 10.1% de todo el material, la señal a correspondiente a la CICATRIZ tiende a tener menos aportación a partir de t2 (Fig. 62).

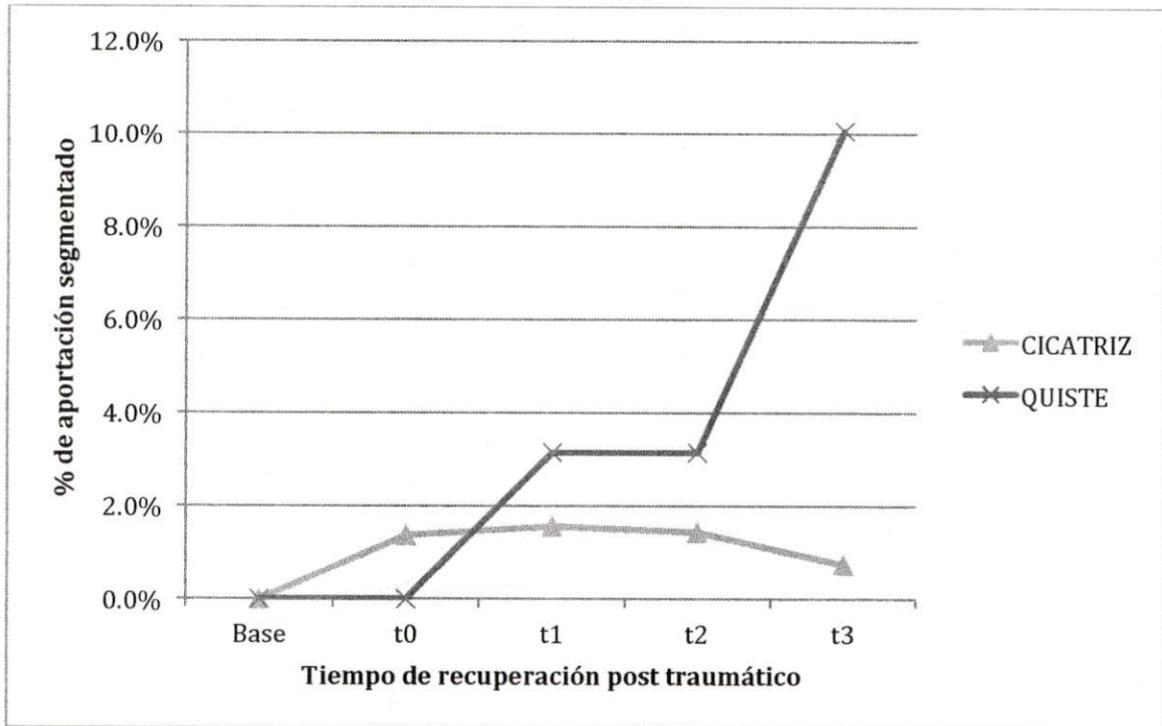


Fig. 62 Morfometría de cicatriz y quiste en mono Rhesus control. En esta gráfica se presentan solo los porcentajes segmentados presentes en el comportamiento a través del tiempo de la cicatriz y el quiste. En esta grafica se puede observar el crecimiento del quiste en el 2 mes post lesión y en el mismo periodo la disminución de la cicatriz.

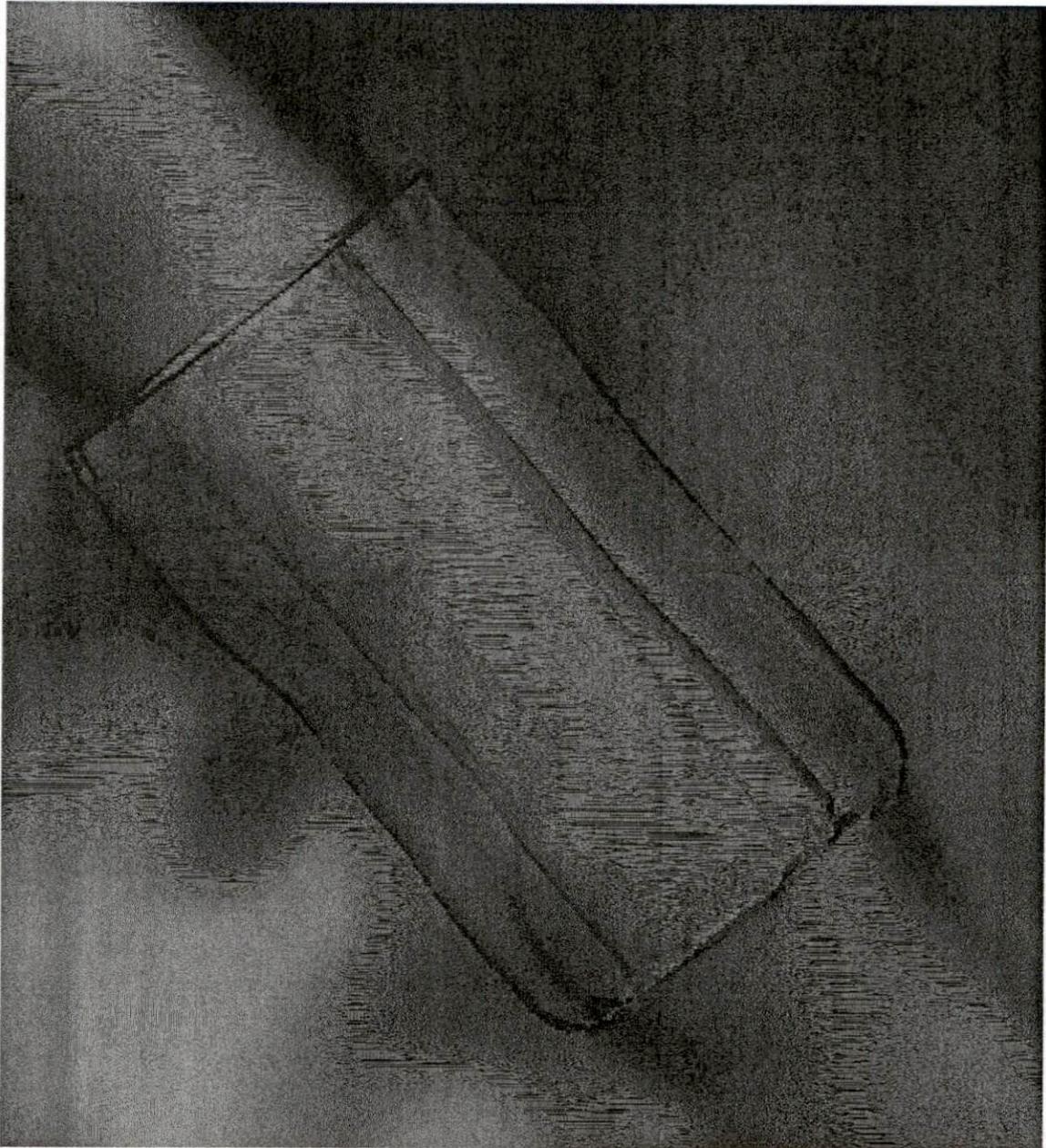


Fig. 63 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus control sano. En esta imagen se observa en el cilindro exterior (morado) la segmentación del líquido cefalorraquídeo y el cilindro interior (verde) la segmentación de la médula espinal. Se observa estructurado y homogénea la organización del tejido. En la esquina baja izquierda se muestra en blanco la 9ª vertebra torácica (T9).

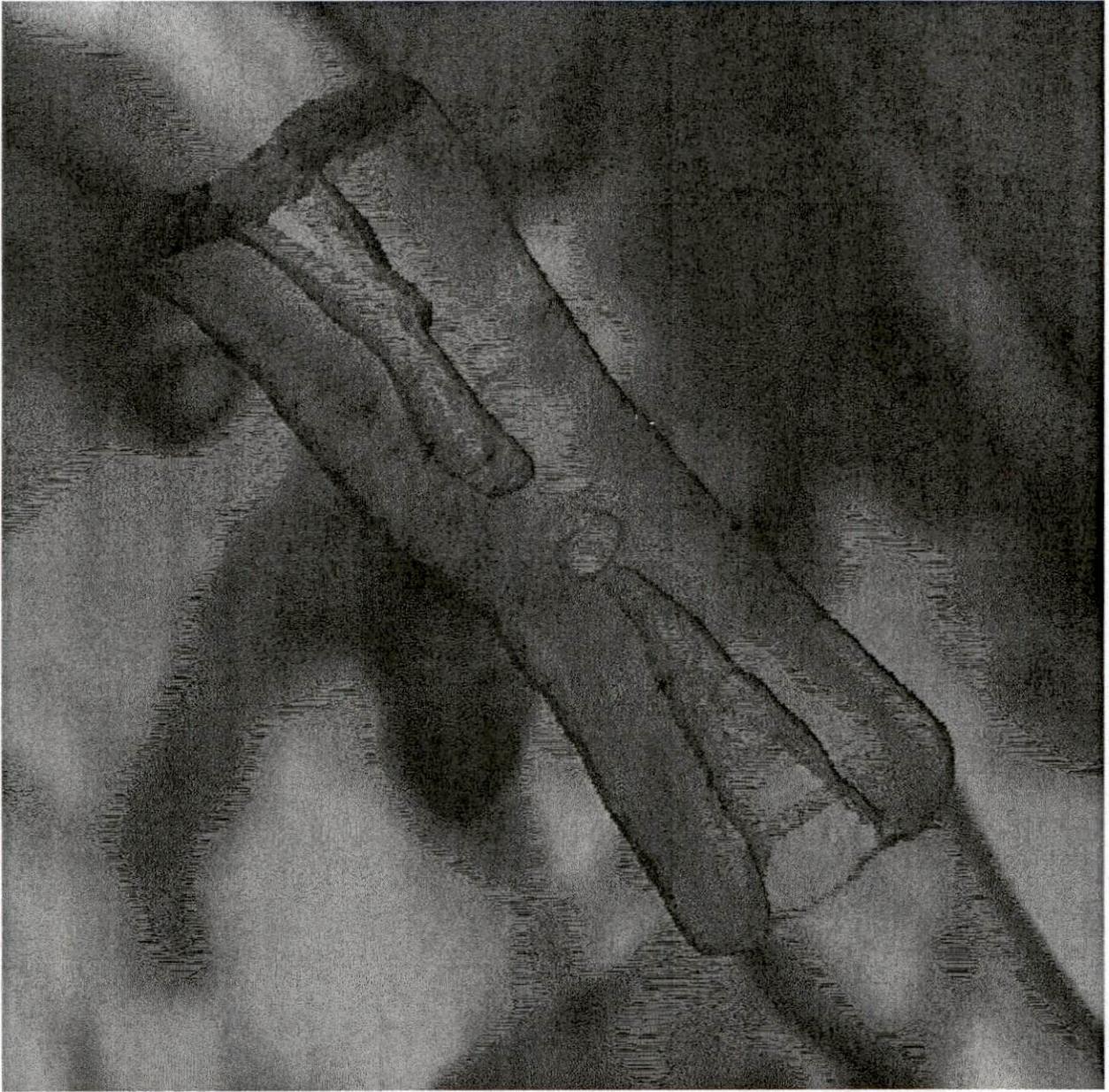


Fig. 64 Segmentación de médula espinal en mono Rhesus control el día de la lesión. En el centro en forma semiesférica (amarillo) se observa la cicatriz generada por la lesión por sección completa, así como la discontinuidad del tejido medular (verde).



Fig. 65 Segmentación de médula espinal en mono Rhesus control un mes post lesión. La cicatriz incrementa en tamaño (en color amarillo), se aprecia la formación de un quiste, la separación de los extremos caudal y cefálico de la médula espinal se ve incrementada.

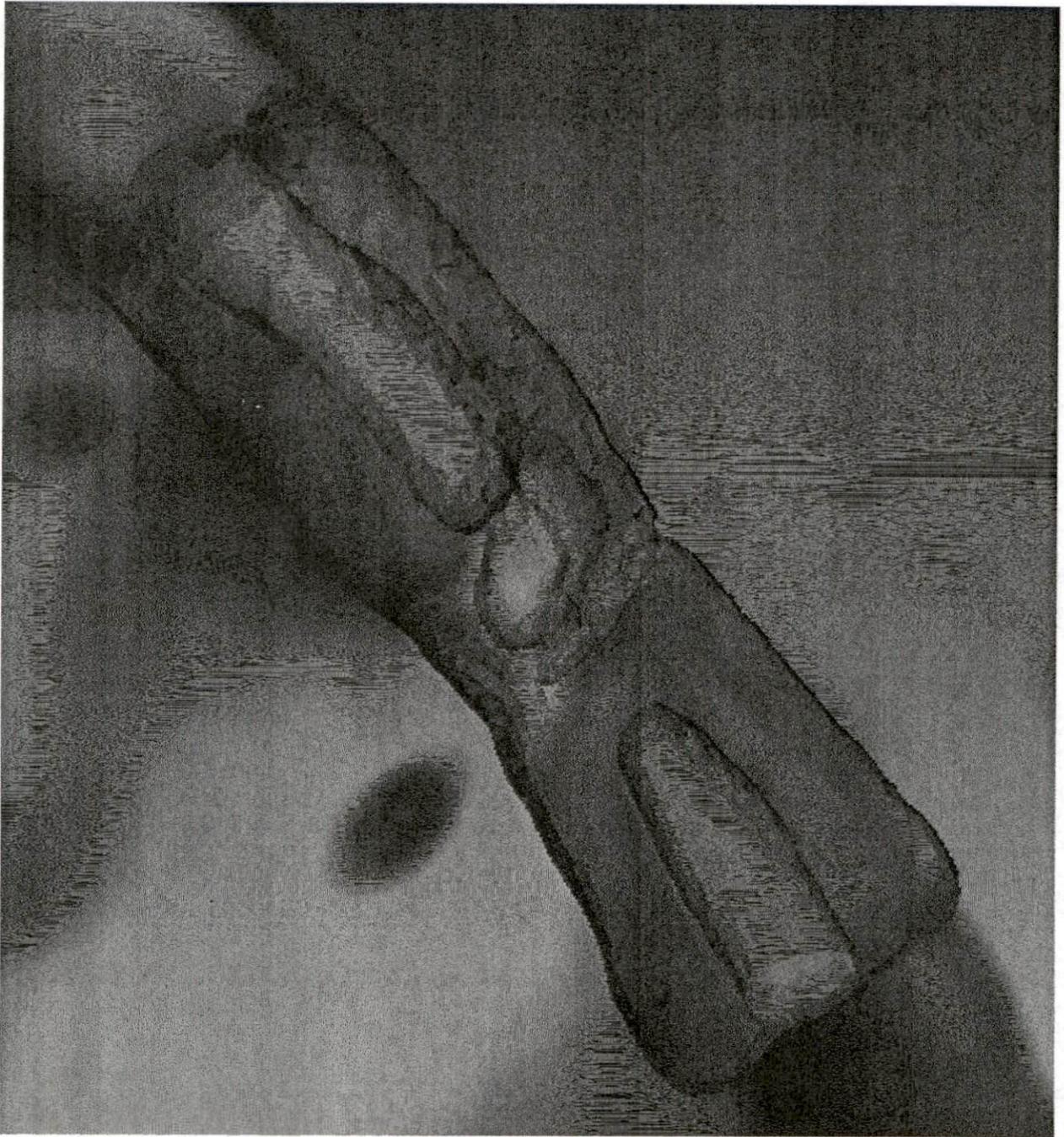


Fig. 66 Segmentación de médula espinal en mono Rhesus control dos meses post lesión. Existe un acinturamiento en el extremo caudal de la médula espinal (extremo derecho, color verde). Se mantiene la tendencia a separar los extremos de la médula espinal.

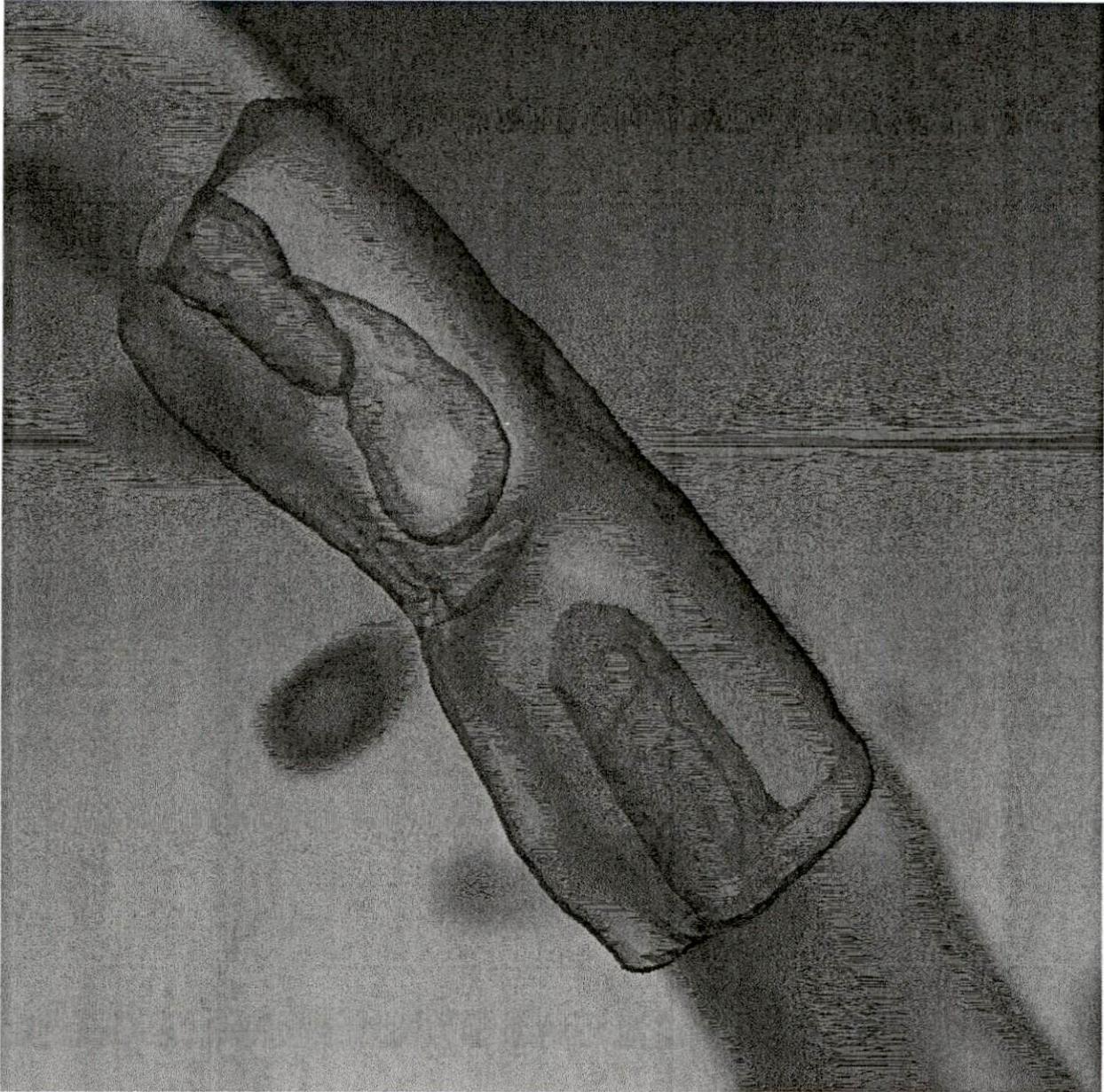


Fig. 67 Segmentación de médula espinal en mono Rhesus control tres meses post lesión. Disminuye el volumen calculado de la cicatriz (amarillo), el quiste formado alcanza el 10.1% del volumen total (rojo) y la separación entre los extremos caudal y cefálico de la médula espinal (verde) es mayor.

Mono Rhesus con implante PPy/I

Las tablas Tabla 5 y Tabla 6 contienen la morfometría de los materiales implicados en RH-I graficados en Fig. 68, Las imágenes de la morfometría realizadas se muestran en Fig. 74.

En RH-I el material MEDULA en t0 disminuye un 81.84% y en t1 79.85; en t2 comienza a tender hacia sus valores basales, para t2 recupera a 83.31 y en t3 91.89% de su valor basal.

El valor de material +M creció en t0 107.53% y tiene una tendencia a regresar a su estado basal para t3 tiene un valor de 104.72%.

Región	Base(mm ³)	t0(mm ³)	t1(mm ³)	t2(mm ³)	t3(mm ³)
MNC	579.57	623.24	644.63	638.59	606.98
MEDULA	382.27	312.86	305.28	318.49	351.30
PPYI	0	25.74	11.93	4.77	3.56

Tabla 5 Morfometría expresada en Volumen RH-I.

Región	Base	t	t1	t2	t3
MNC	60.3%	64.8%	67.0%	66.4%	63.1%
MEDULA	39.7%	32.5%	31.7%	33.1%	36.5%
PPYI	0.0%	2.7%	1.2%	0.5%	0.4%

Tabla 6 Morfometría expresada en Porcentaje RH-I

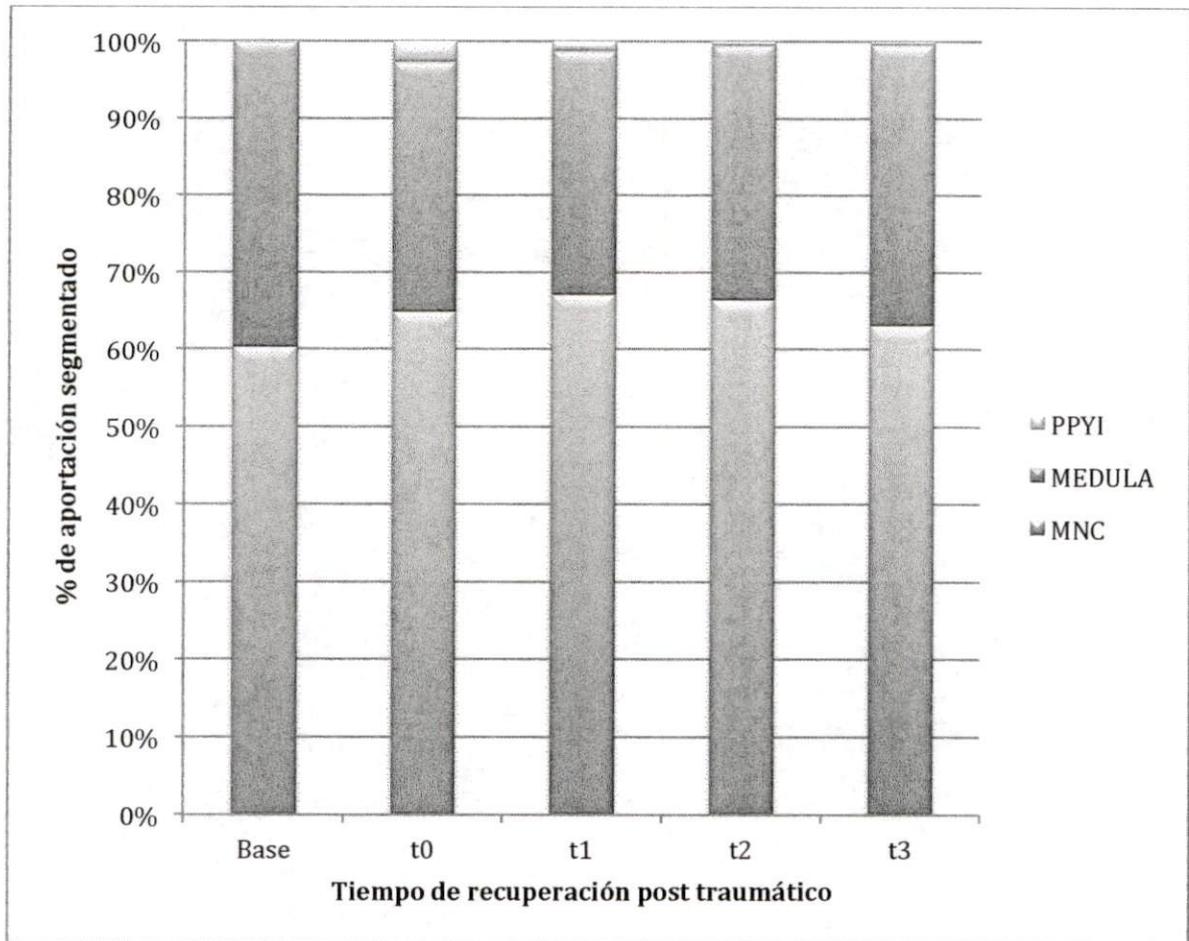


Fig. 68 Morfometría de la zona de lesión en mono Rhesus con implante a partir de IRM. En su estado basal (Base) el tejido se encuentra distribuido por un 39.7% de médula y un 60.3% entre meninges y líquido cefalorraquídeo principalmente (MNC). El día de la lesión esta proporción se modifica llevando al tejido medular a un 32.5%, aparece la proporción del material implantado (PPYI) con un 2.7% y el MNC en un 64.8%. En este caso no se afecta mucho la proporción aun tres meses después de la lesión: la médula tiene 36.5%, el MNC 63.1% y la aportación del material disminuye a un 0.4% del volumen total.

PPYI disminuye a través del tiempo, esto es coincidente con la experiencia obtenida en el modelo de ratas donde el material tiende a disgregarse y permitir que tejido crezca a través de éste [53], para t3 disminuye hasta 13.83% de su valor inicial.

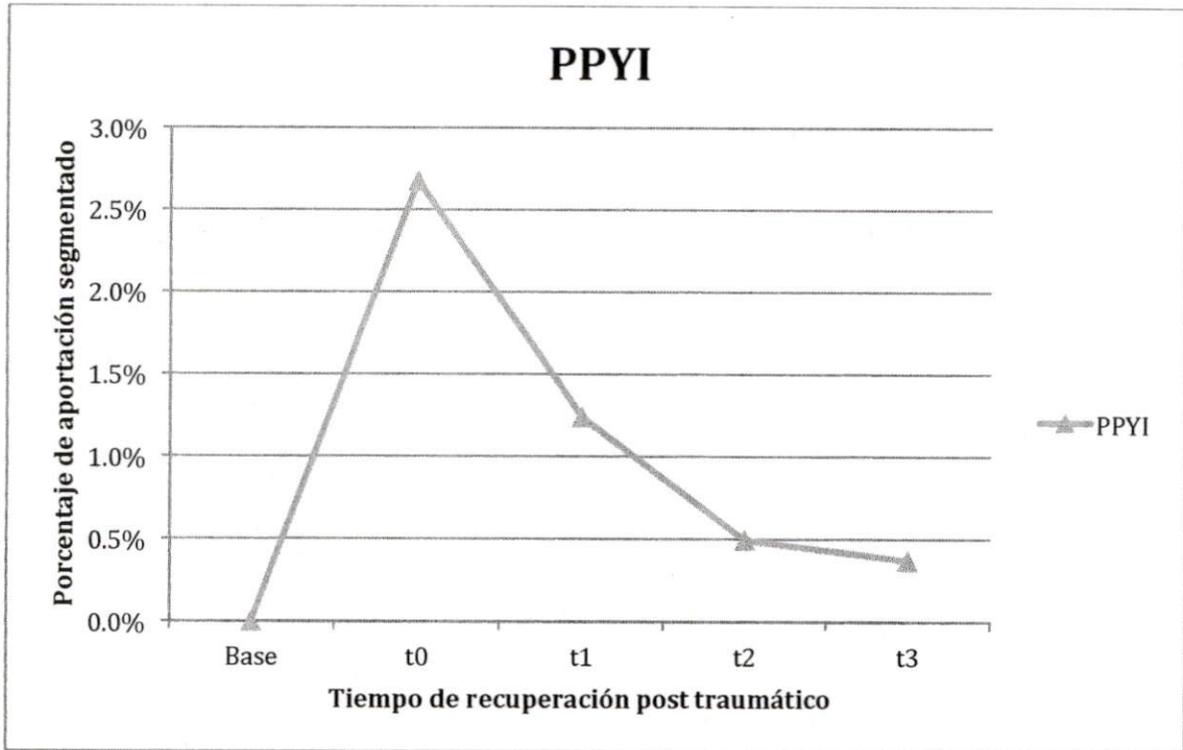


Fig. 69 Morfometría de PPy/I en mono Rhesus implantado. Se observa la tendencia a disminuir la cantidad de aportación de polímero en la señal de IRM. Esto se interpreta como el crecimiento de tejido a través de él.



Fig. 70 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus para implante, antes de la lesión. El cilindro exterior muestra el tejido no caracterizado, el cual se conforma principalmente por líquido cefalorraquídeo (morado), y el cilindro interior (verde) corresponde la tejido medular que representa el 39.7% del volumen total.

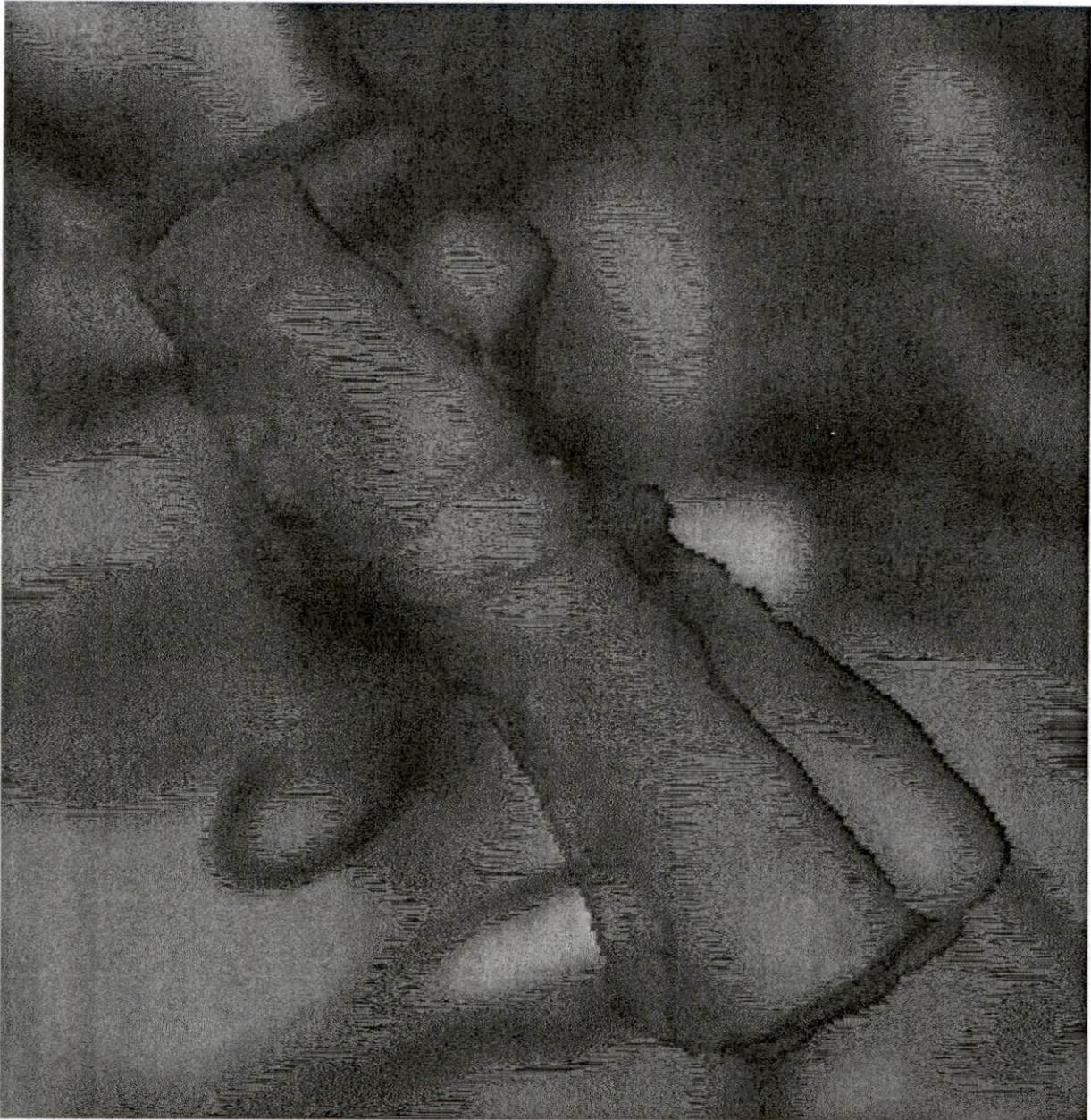


Fig. 71 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus implantado, el día de la lesión. Se observa el efecto mecánico debido a la lesión donde la médula espinal es desplazada hacia la pared ventral del espacio medular, en el centro de la médula espinal (verde) se identifica la pastilla de polímero (de forma elíptica) separando los extremos caudal y cefálico de la lesión por sección completa de la médula espinal.

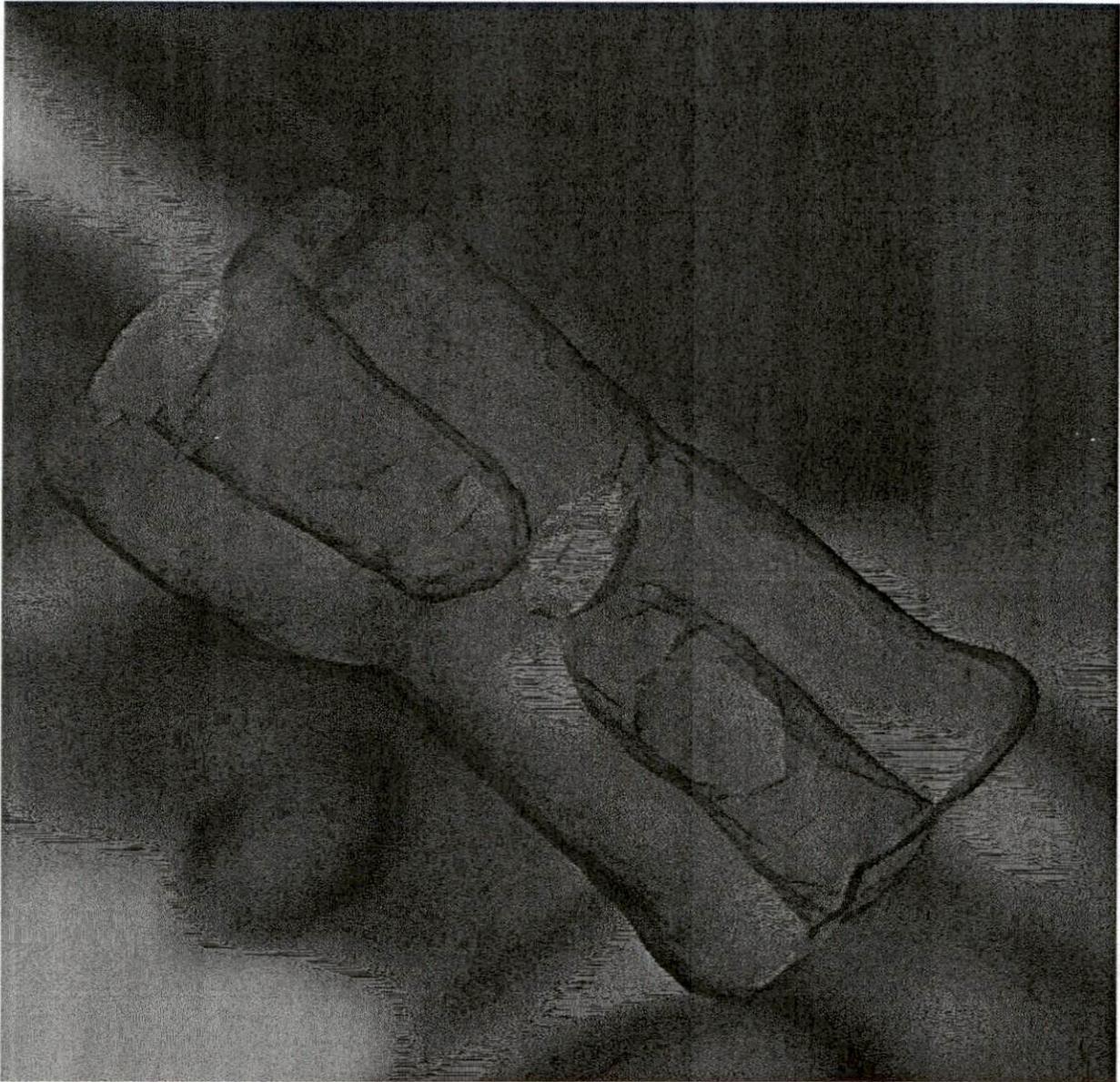


Fig. 72 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus implantado, un mes post lesión. En esta imagen se observa como el líquido cefalorraquídeo ha regresado la médula espinal (verde) a su ubicación original (centro), se observa la pastilla que fue desplazada hacia la parte posterior del canal medular, no existe una pérdida de tejido medular tan marcada como en la Fig. 64

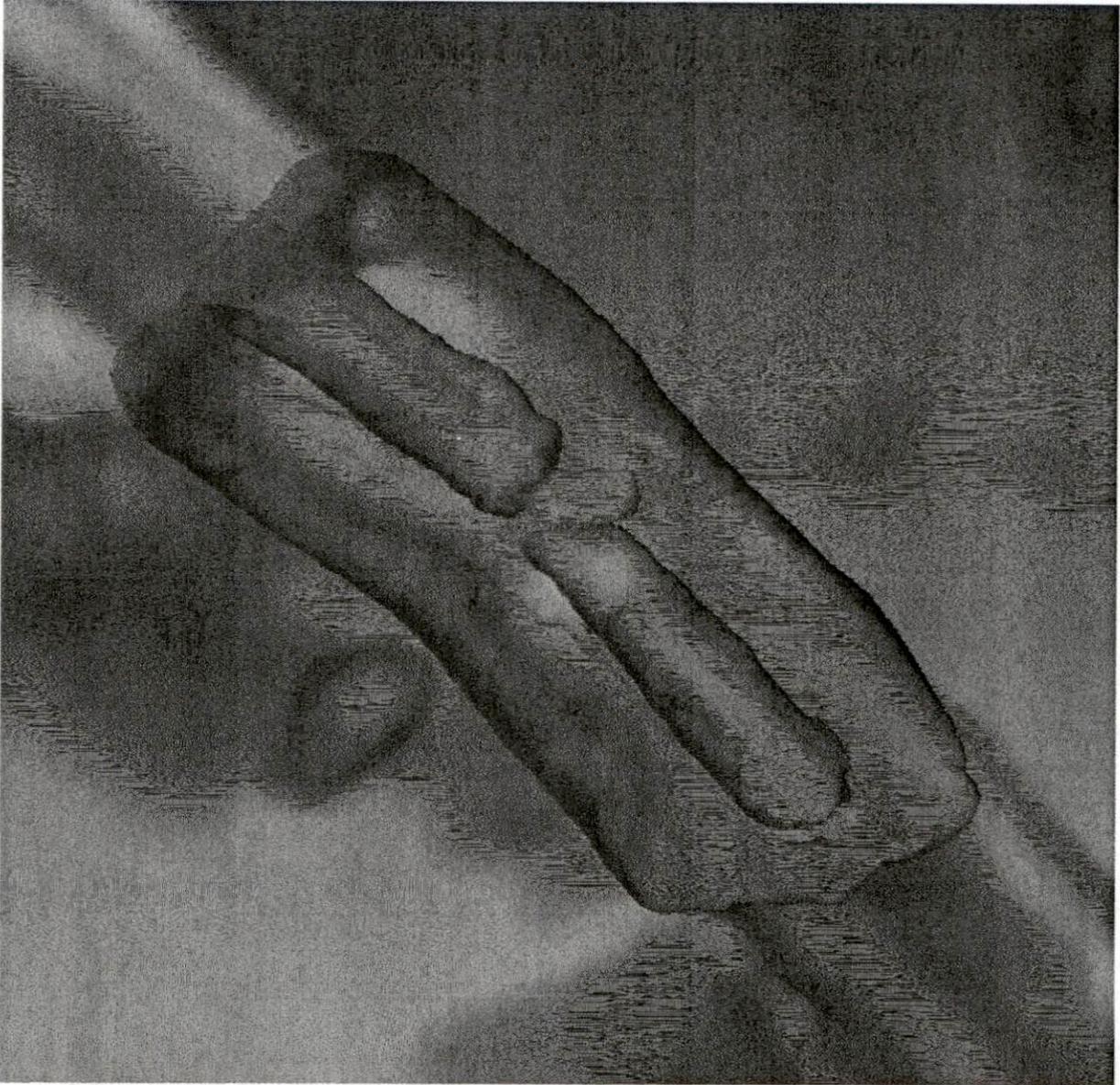


Fig. 73 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus implantado, dos meses post lesión. Se puede observar una interacción en los bordes del tejido medular (verde) y la pastilla de polímero (amarillo), lo cual es correspondiente a la experiencia obtenida en el modelo de ratas (Fig. 38, Fig. 44 y Fig. 47).



Fig. 74 Segmentación de médula espinal de mono Rhesus implantado, tres meses post lesión. Se observa una mayor integración del implante (amarillo) y el tejido medular (verde) respecto a la Fig. 73. En este momento la proporción de tejido medular es de 36.5%.

Imágenes por Tensor de Difusión

Mapas de anisotropía fraccional (FA) derivadas de DTI fueron procesados usando un método similar descrito en [58], se midieron los valores de FA en regiones específicas de interés (ROI) dentro de la médula espinal (Fig. 75 y Fig. 76).

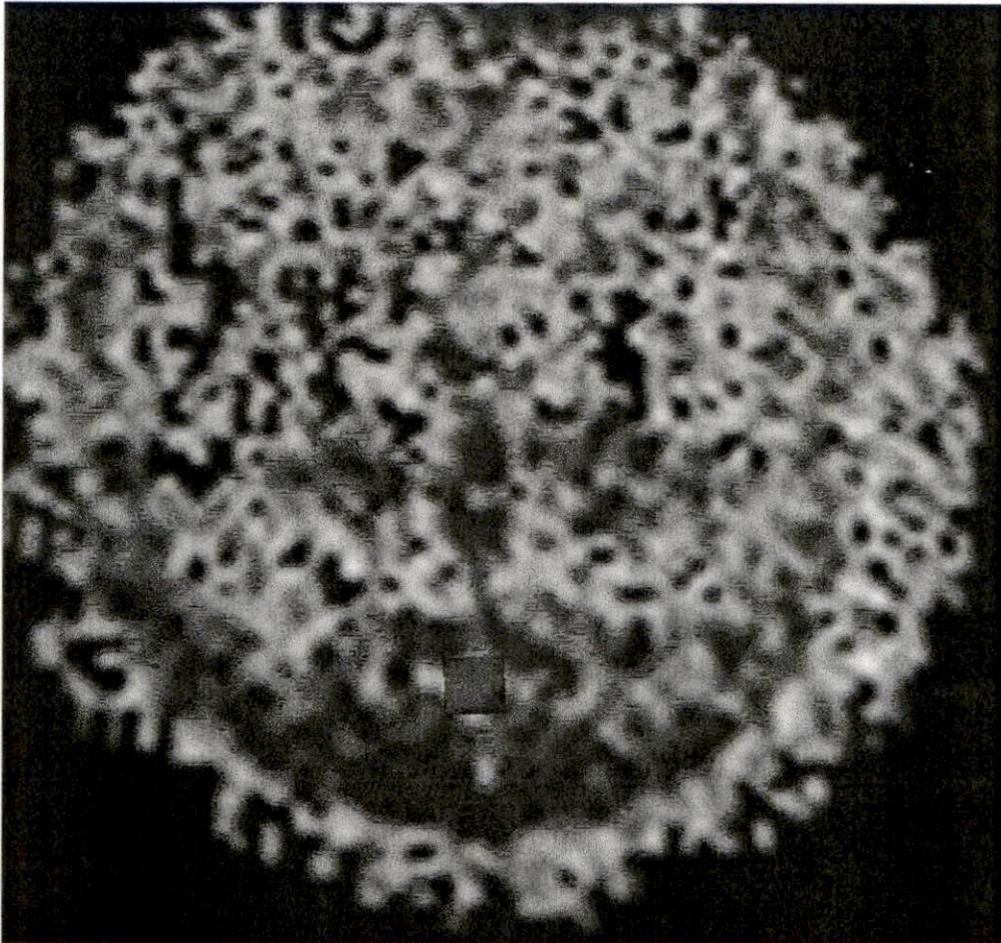


Fig. 75 ROI definido para medir Fracción de Anisotropía. Vista axial de la región de interés asignada para medir la fracción de anisotropía en la zona de lesión (recuadro azul).

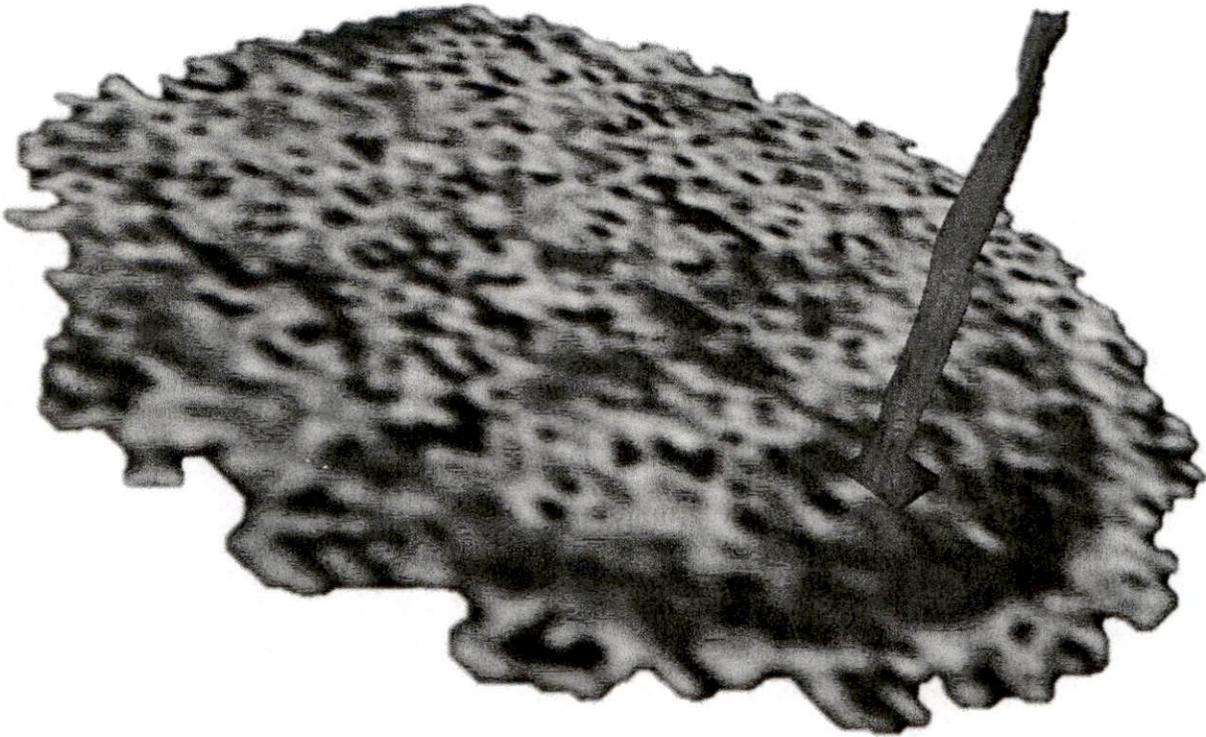


Fig. 76 Tractografía de la médula espinal proyectada a través del ROI asignado. Vista axial de una imagen de fracción de anisotropía, se observa el ROI asignado de acuerdo a la Fig. 75 y a través de éste se observa la tractografía de la médula espinal (azul) en la dirección caudal-cefálica

Para su análisis, la médula espinal se dividió en nueve regiones, cada una conteniendo una rebanada de 1mm. Las nueve regiones incluyen: región Rostral (R1,R2 y R3), Epicentro de la LPSCME (EC1, EC-2 y EC3) y región Caudal (C1, C2 y C3) como se muestra en Fig. 77.

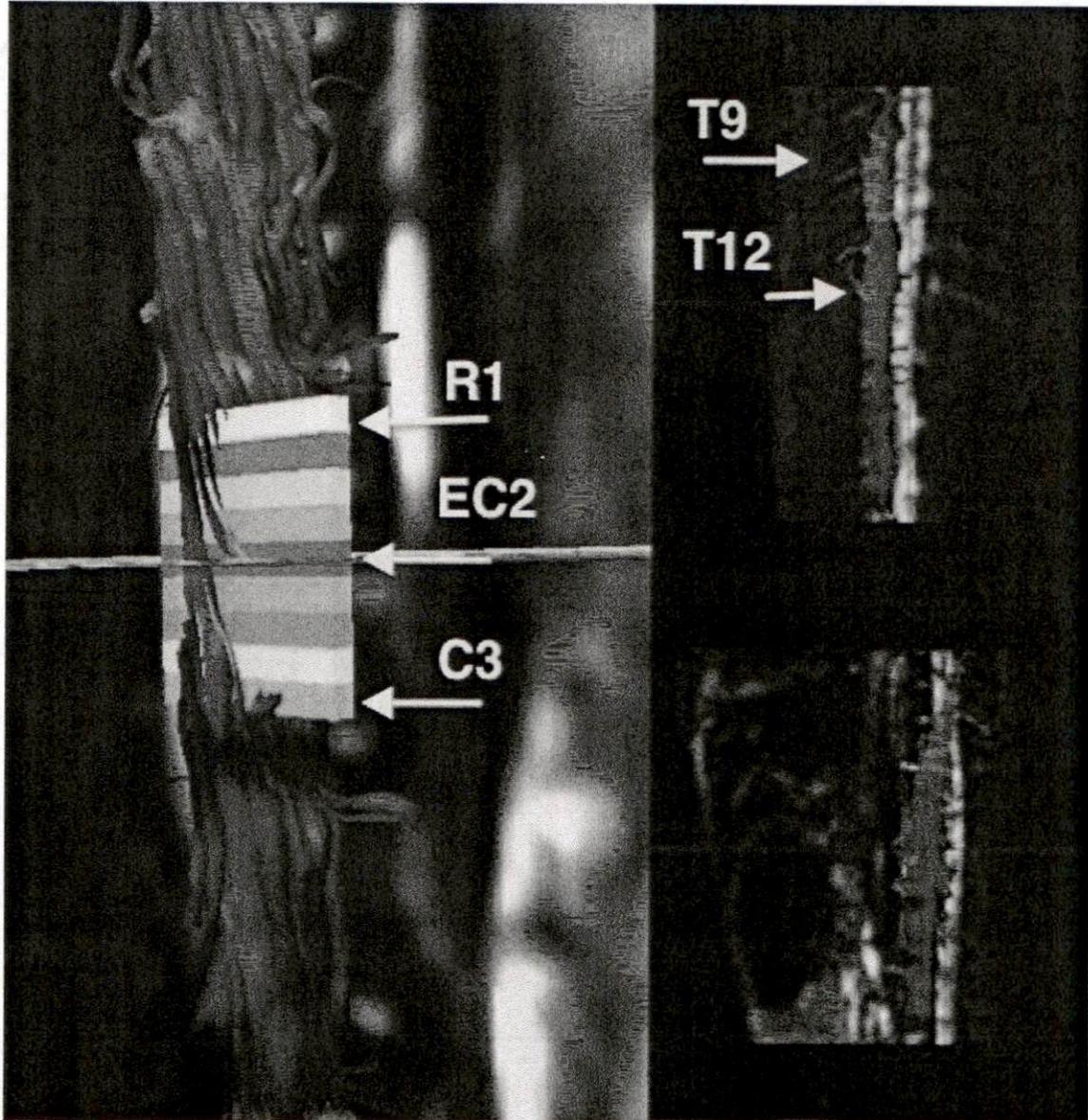


Fig. 77 Regiones asignadas para evaluar la Fracción de Anisotropía en la lesión por sección completa de la médula espinal. Vista sagital de la zona de lesión, el ROI amarillo se asigna al extremo en dirección rostral del epicentro de lesión (R1), al epicentro de lesión se asigna el ROI azul oscuro (EC2) y para el extremo caudal se asigna el ROI azul claro (C3). En los recuadros del lado derecho se observa la posición de la vista podemos distinguir la 9ª y 12ª vertebra torácica.

Los valores de FA y la Tractografía muestran cambios en todas las regiones a través del tiempo.

Fracción de Anisotropía

Los valores tomados de FA se muestran en Tabla 7 Fracción de Anisotropía para y Tabla 8; en los diferentes tiempos donde se realizaron estudios de IRM. En Fig. 78 y Fig. 79 se muestran las gráficas de la evolución de FA en RH-C y en RH-I respectivamente.

Región	Base(FA)	t0(FA)	t1(FA)	t2(FA)	t3(FA)
R1	0.853	0.621	0.493	0.332	0.312
R2	0.822	0.638	0.377	0.302	0.237
R3	0.835	0.54	0.394	0.223	0.201
EC1	0.867	0.487	0.345	0.216	0.183
EC2	0.831	0.42	0.324	0.242	0.136
EC3	0.844	0.495	0.419	0.281	0.254
C1	0.859	0.529	0.459	0.315	0.291
C2	0.846	0.512	0.51	0.422	0.295
C3	0.853	0.675	0.515	0.434	0.306

Tabla 7 Fracción de Anisotropía para mono Rhesus control.

Región	Base(FA)	t0(FA)	t1(FA)	t2(FA)	t3(FA)
R1	0.889	0.576	0.636	0.702	0.789
R2	0.876	0.563	0.596	0.695	0.796
R3	0.883	0.551	0.534	0.675	0.765
EC1	0.897	0.478	0.482	0.644	0.759
EC2	0.86	0.402	0.411	0.642	0.746
EC3	0.874	0.317	0.376	0.669	0.753
C1	0.883	0.436	0.496	0.697	0.772
C2	0.851	0.531	0.516	0.702	0.783
C3	0.864	0.567	0.624	0.745	0.779

Tabla 8 Fracción de Anisotropía para mono Rhesus implantado.

En RH-C y RH-I la Fracción de Anisotropía (FA) disminuye el día de la lesión y al primer mes comparada con su respectivo estudio base.

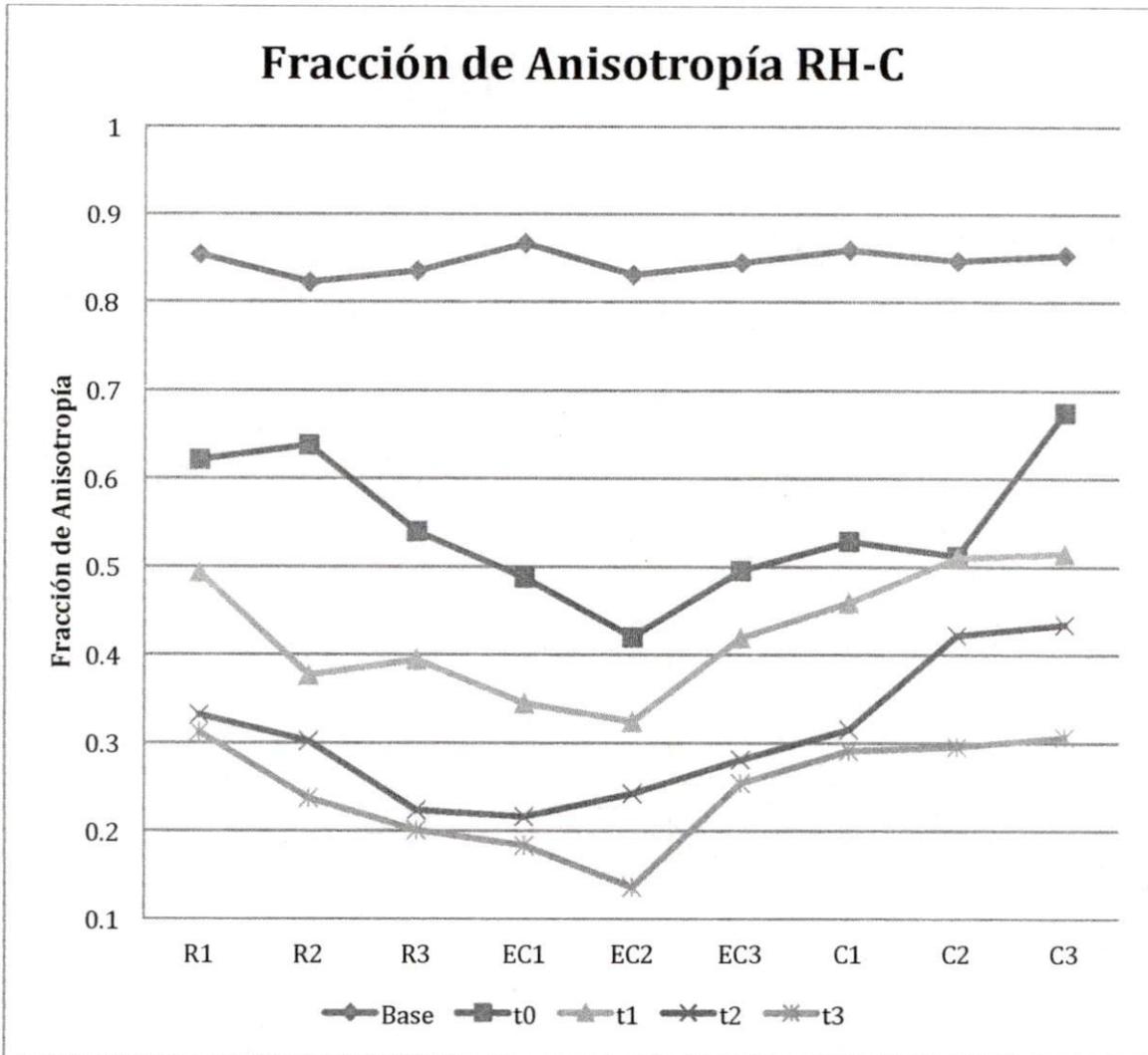


Fig. 78 Seguimiento de fracción de anisotropía en mono Rhesus control. La fracción de anisotropía fue disminuyendo a través del tiempo, incluso el valle generado por la disminución de la fracción de anisotropía se fue propagando tanto en dirección rostral como caudal, lo cual es concordante con la morfometría mostrada en la Fig. 67. Para tres meses post lesión (t3) se observa mayor extensión de la meseta de baja fracción de anisotropía en la zona correspondiente a la extensión del quiste (región cefálica de la lesión).

En el epicentro de la lesión la diferencia entre RH-C y RH-I es contrastante, llegando a tener en RH-I un restablecimiento de la FA 5.43 veces mayor que RH-C en t3 (tres meses después de la lesión).

En todas las regiones definidas, los valores de FA son más pequeños en RH-C que en RH-I a través de todo el estudio.

Para RH-C el valle graficado debido a la lesión fue incrementando su extensión a través del tiempo y disminuyendo su valor hasta tener en el epicentro de la lesión un valor de 16% respecto al inicial. En la zona R2 se disminuye la FA en t1 debido al crecimiento del macro-quiste formado mostrado en la morfometría realizada, su contraparte C2 no muestra este comportamiento. La FA marca una tendencia a decaer en ambos extremos del epicentro de la lesión.

En RH-I el valle presentado debido a la lesión va desapareciendo hasta formar una meseta en t2 manifestando una tendencia hacia el valor base.

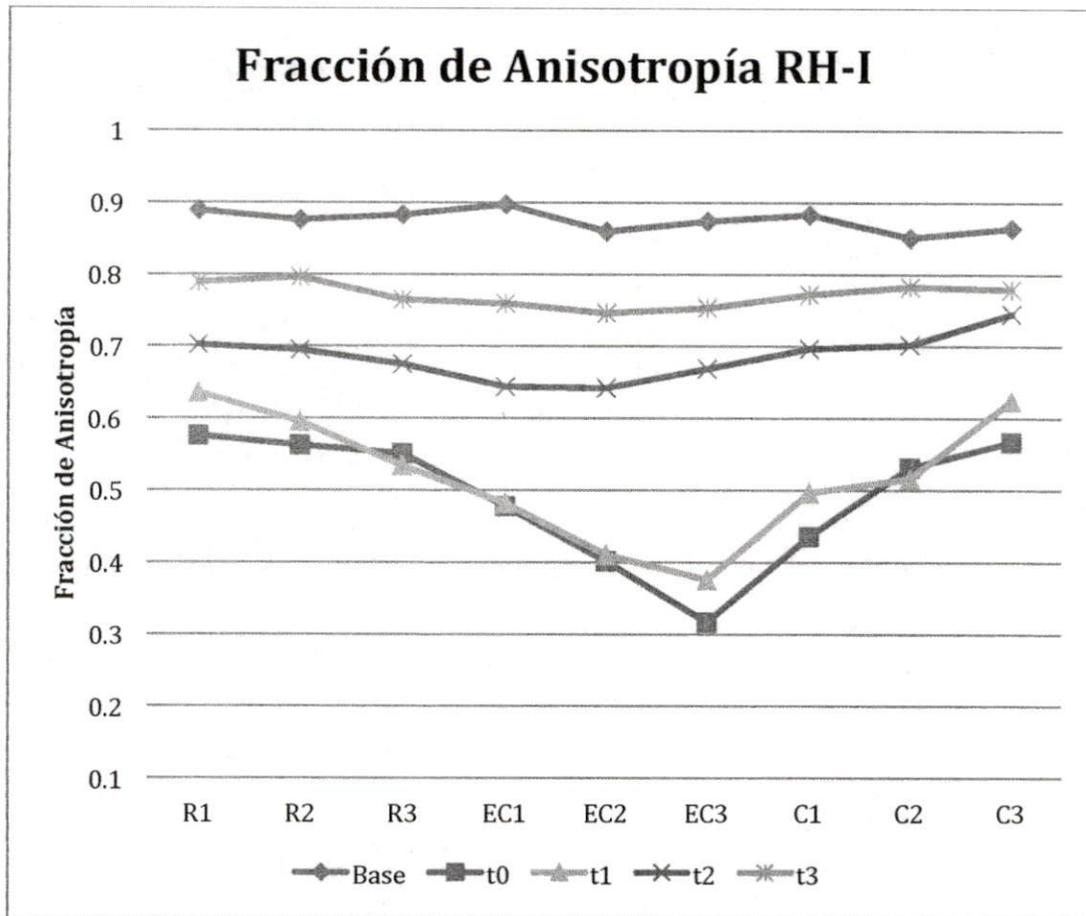


Fig. 79 Seguimiento de fracción de anisotropía en mono Rhesus implantado. El día de la lesión (t0) la fracción de anisotropía cae inclusive por debajo de los valores observados en el mono control (Fig. 78), esto se le atribuye al estado compactado del implante. Un mes después (t1) el comportamiento de la fracción de anisotropía no denota mucha variación, pero al segundo mes (t2) la fracción de anisotropía indica una reestabilización de la difusión preferente y marca una tendencia de regresar a sus valores basales (base) en el tercer mes (t3).

Tractografía

La tractografía, una interpretación gráfica de la Fracción de Anisotropía. Con ella fue posible visualizar el comportamiento de la difusión en la lesión de médula espinal a través del tiempo.

En los estudios Base se observa la continuidad de la médula espinal, en ambos sujetos (RH-C y RH-I) Fig. 80. En la Fig. 80 izquierda se visualizan los axones correspondientes a las astas ventrales y dorsales de la médula espinal.

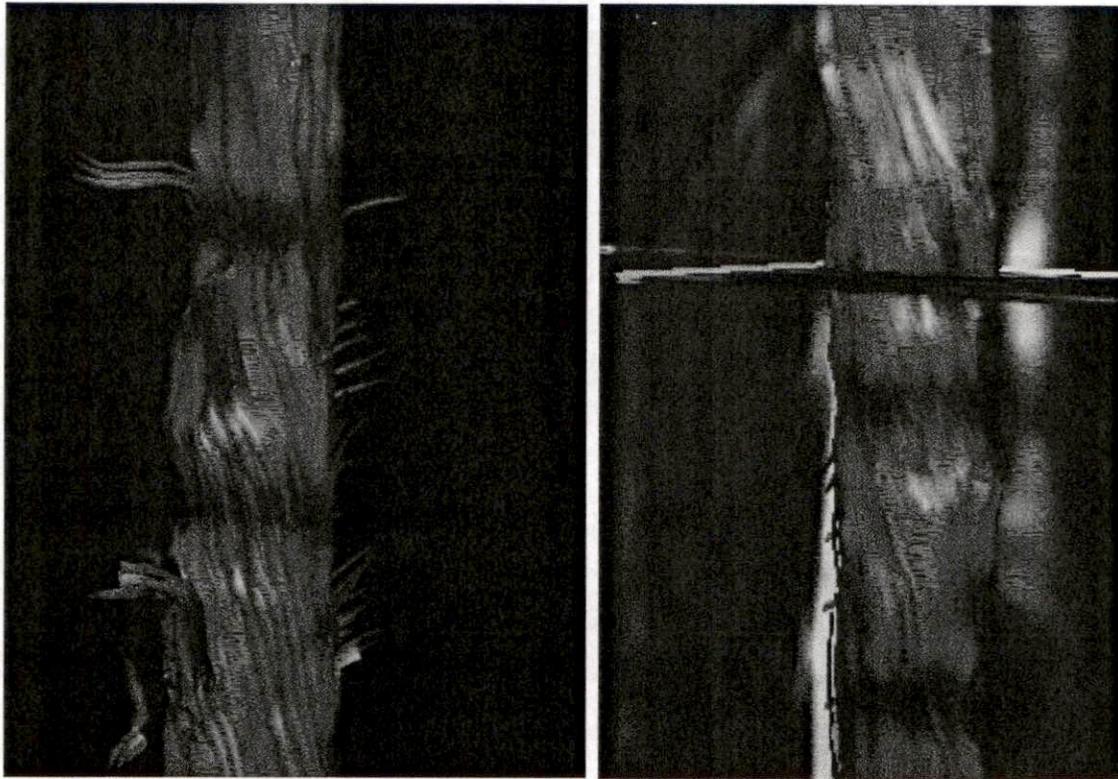


Fig. 80 Tractografía al nivel de la 9ª vertebra torácica antes de la lesión. Mono Rhesus control (izquierda) y mono Rhesus para implante (derecha). Se observa la alta integración de los tractos, así como las raíces ventrales y dorsales (en verde).

La Fig. 81 muestra la discontinuidad de la médula espinal un mes después de la lesión (t1), En ambos casos se observa la separación de la zona rostral y caudal.



Fig. 81 Tractografía tomada un mes post lesión de la médula espinal. Mono Rhesus control (izquierda) y mono Rhesus implantado (derecha), en ambas imágenes se observa una separación similar de los extremos caudal y cefálico de la médula espinal de acuerdo al seguimiento de la fracción de anisotropía (Fig. 78 y Fig. 79) y a la morfometría (Fig. 65 y Fig. 72);

En el segundo mes (t2) para RH-C continua la separación existiendo una tendencia en los extremos de la médula espinal a separarse, mientras que en RH-I existe un proceso de reconexión en la difusión, concordante al comportamiento de la FA. La Fig. 82 Muestra los extremos Rostral (izquierda) y Caudal (derecha) de la tractografía de RH-I donde se observa un cambio en la dirección de difusión en la zona de lesión, también se observan las proyecciones de la FA hacia el extremo alterno, después de la zona de lesión. En la Fig. 82 izquierda, el extremo Rostral con su proyección con dirección Caudal y a la derecha, el extremo Caudal con la proyección con dirección Rostral.

En la Fig. 83 observamos otra perspectiva de la tractografía del extremo Rostral con las proyecciones hacia el extremo caudal a través del material en el epicentro de la zona de lesión.

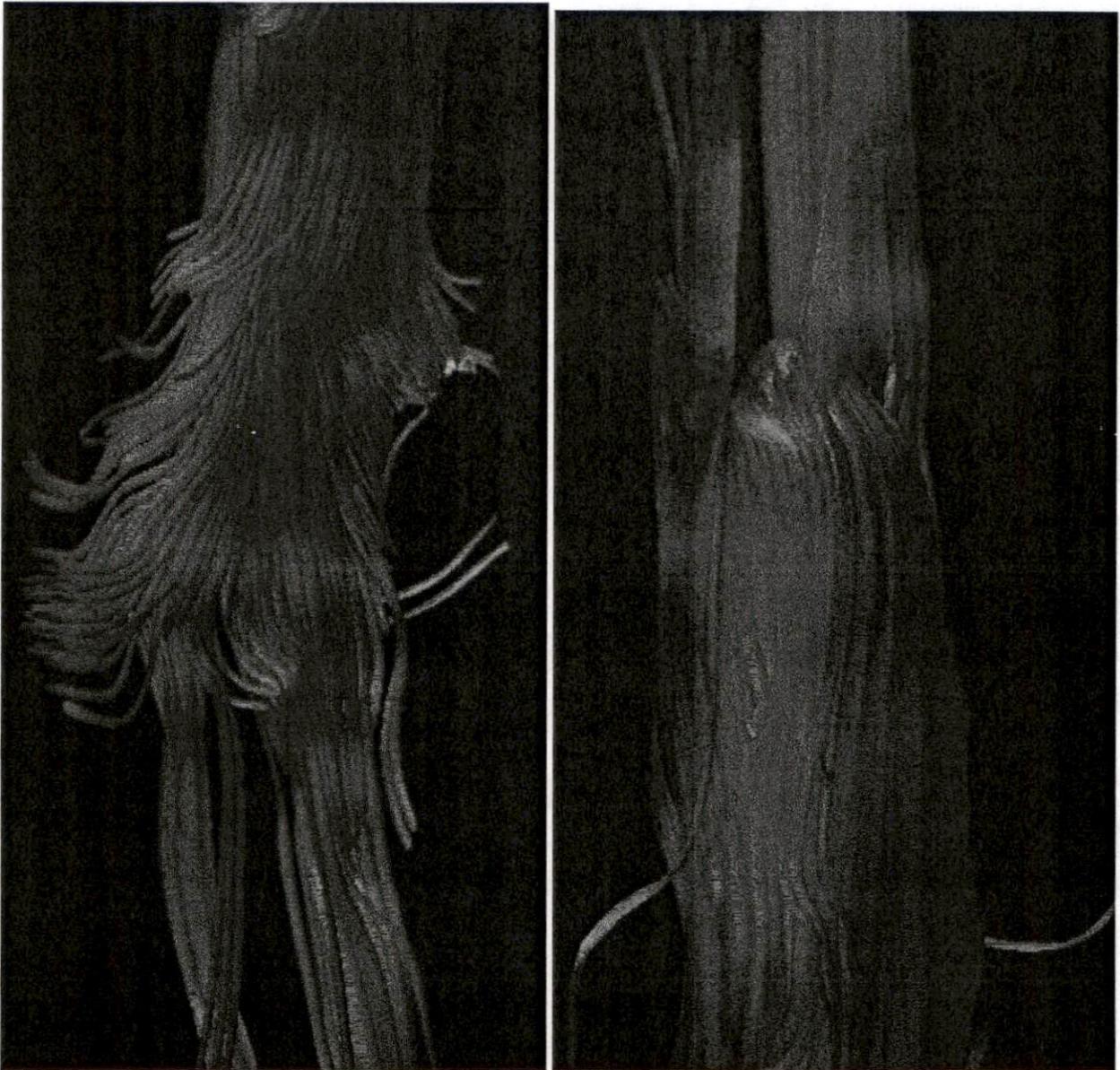


Fig. 82 Tractografía tomada 2 meses en mono Rhesus implantado. Extremo rostral (izquierda) y caudal(derecha). Se observa reconexión parcial de los tractos trazados, se aprecia cambio de la dirección en la preferencia de difusión (color verde y rojo en el epicentro de ambas tractografías)

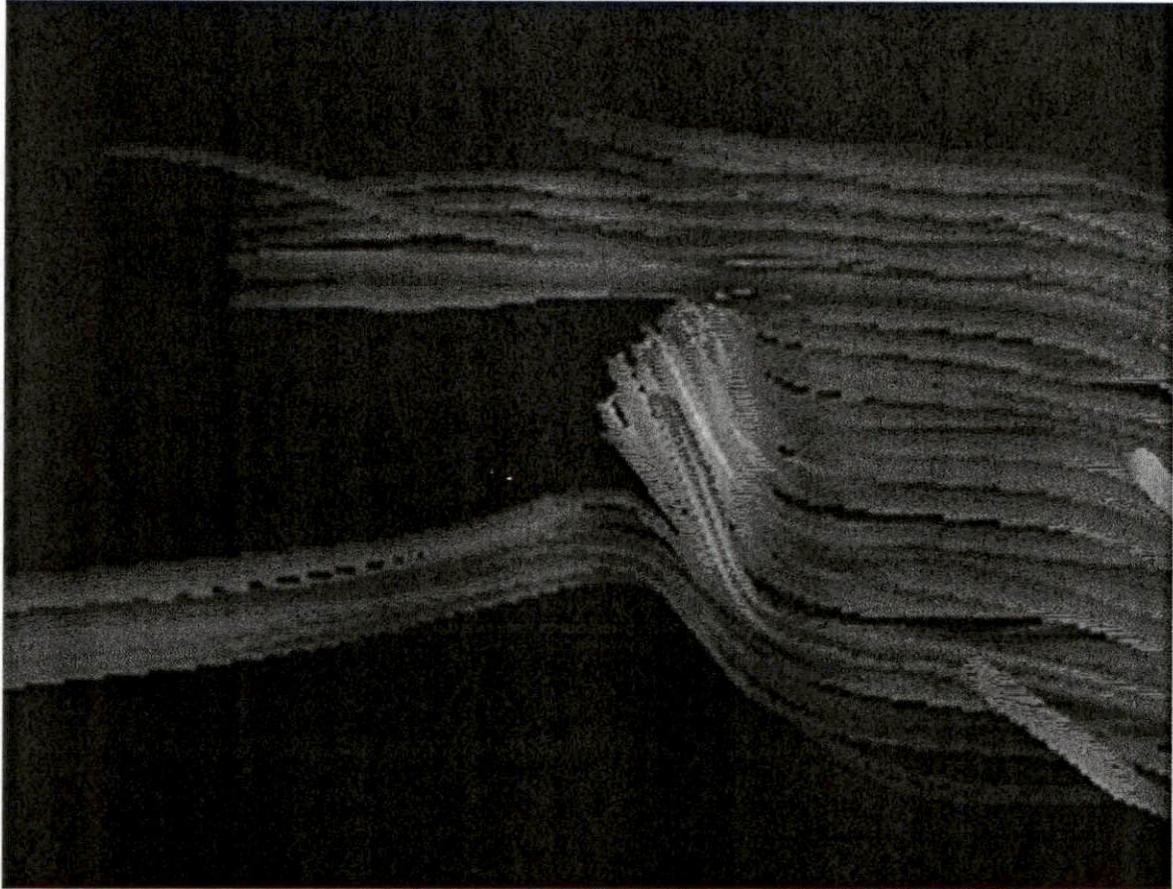


Fig. 83 Tractografía del extremo caudal de mono Rhesus con implante dos meses post lesión de la médula espinal. Se destaca el cambio en la dirección de difusión en el epicentro de lesión (región de color verde en el centro de la imagen).

En t3 (tres meses post-lesión) la separación de los extremos Rostral-Caudal se amplía para RH-C, concordantemente con la FA, y siendo más evidente la separación en la zona correspondiente al macro-quiste generado en el extremo Rostral (Fig. 84 izquierda). Mientras que RH-I muestra una reconexión de la difusión de manera uniforme a través del material implantado en la lesión (Fig. 84 derecha).

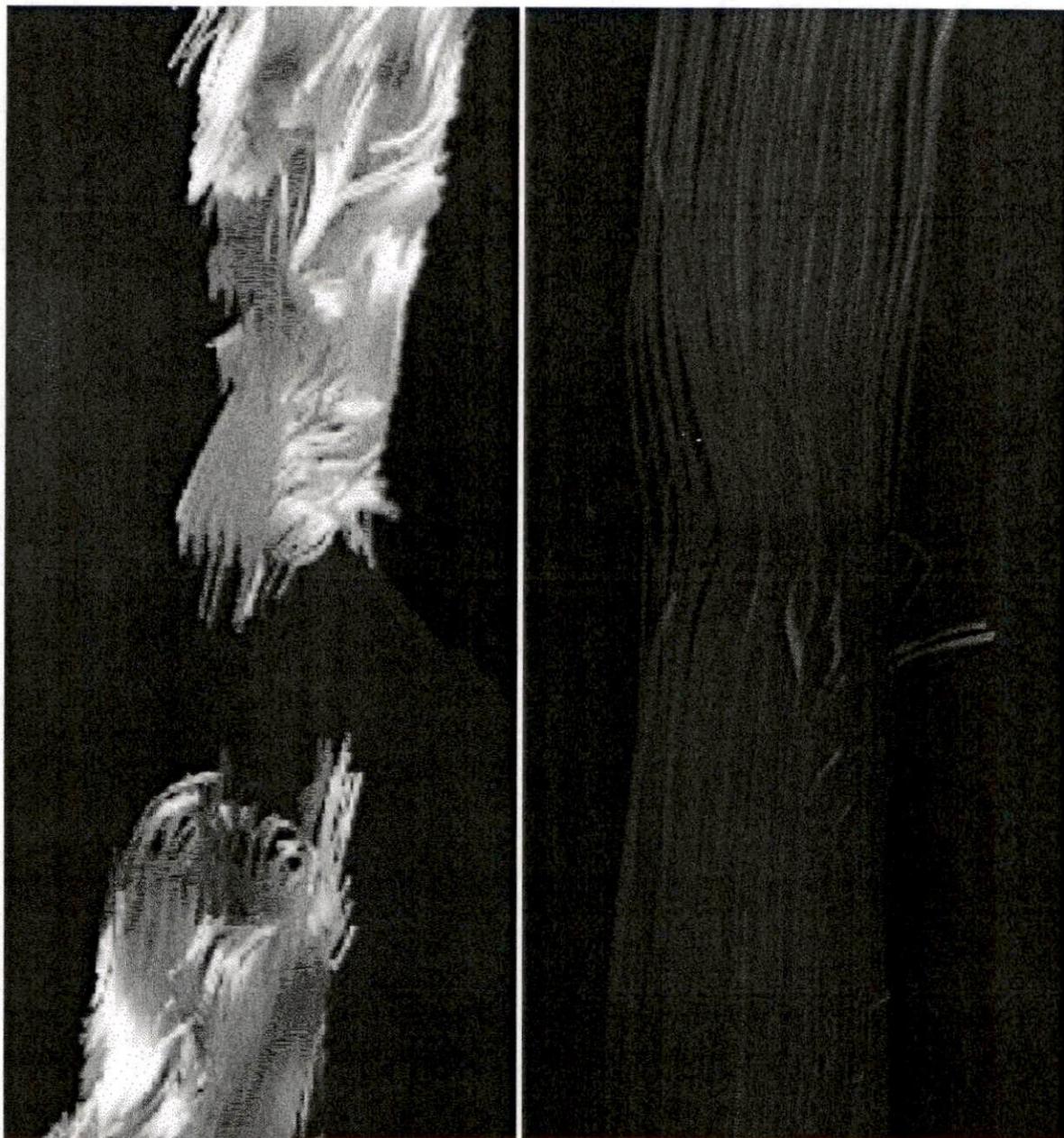


Fig. 84 Tractografías correspondientes a tres meses post lesión. Mono Rhesus control (izquierda) y mono Rhesus con implante (derecha). Para el mono control se emplea este color por que la inhomogeneidad de las dirección hace confusa la interpretación, donde la separación entre los extremos caudal y cefálico de la lesión esta incrementada. En el mono implantado se observa la reconexión de los tractos, existe un cambio en la dirección aunque reconectados en el epicentro de la lesión.

Discusión

El uso de imágenes por resonancia magnética (IRM) y de imágenes por tensor de difusión (DTI) se han aplicado en una gran cantidad de estudios en enfermedades del sistema nervioso central [59]. Dentro de estos, existen estudios que buscan realizar un seguimiento *in vivo* de la evolución en diferentes modelos de lesión traumática de la médula espinal (LTME), aunque la mayoría se basan en un modelo de lesión por contusión [60-62] o en modelos menos severos como la hemisección [63], estudios con un modelo de Lesión por Sección Completa de la Médula Espinal (LPSCME) han sido menos reportados [64].

Este trabajo tiene como objetivo principal realizar un seguimiento de los cambios en la LPSCME *in vivo* y su integración con el implante de Polipirrol-Yodo (PPy/I) a través del tiempo, en el modelo de ratas hasta 8 semanas post LPSCME y en primates no humanos (PNH) hasta 3 meses post LPSCME. Las IRM nos permitieron evaluar cambios en la zona aledaña a la lesión. Con la combinación de secuencias estándares de IRM, secuencias especiales como DTI y el post procesamiento de los estudios obtenidos, fue posible analizar la morfometría en IRM de la zona de lesión para cuantificar sus cambios a través del tiempo.

El tejido medular preservado presentó una mayor prevalencia en los sujetos implantados respecto a los sujetos no implantados, tanto en el modelo de ratas como en el modelo de PNH. Lo cual es concordante con lo reportado por Olayo et al. [23] y Cruz et al. [34] donde también se implanta PPy/I después de una lesión traumática de médula espinal. Los sujetos control se comportan de acuerdo a lo descrito por T. Weber et al. [62] quienes analizaron el comportamiento de la zona de lesión después de una LTME con IRM de 17.6 Teslas *in vivo* y *ex vivo*. En el caso del PNH no implantado el tejido medular fue de ocupar el 39.7% del tejido analizado, a 20.8% el día de la lesión, 19% a un mes post lesión, 18.9% dos meses post lesión y tres meses después de la lesión se redujo al 11.2%, esto quiere decir que disminuyó un 82.79% de su existencia inicial; mientras que en el PNH implantado fue de ocupar el 39.7% del tejido inicial, al 36.5% tres meses después de la lesión, por lo tanto disminuyó 10.11% de su existencia inicial.

La proliferación de quistes en los PNH fue más abundante en el PNH control respecto al PNH implantado, en el primero se conformó paulatinamente un quiste (proceso denominado siringomielia post traumática, Schwartz et al. estudia siringomielia post traumática después de LTME [65]) que ocupa 96.76 mm^3 de 749.82 mm^3 de tejido analizado. Lo que indica que el quiste ocupó un 10.1% del tejido analizado.

El material fue disminuyendo su homogeneidad con el paso del tiempo, lo cual es consistente con el comportamiento esperado debido a la disgregación del mismo, permitiendo así el crecimiento de tejido a través de él. Olayo et al. [23] y [34] et al. observaron el mismo comportamiento. El implante en el PNH el día de la lesión midió 25.74 mm^3 (2.7% del total de tejido), un mes post lesión se cuantificó 11.93 mm^3 , dos meses después 4.77 mm^3 y a tres meses post lesión 3.56 mm^3 , esto representa el 0.4% del total analizado o bien la pérdida de el 86.16% de la cantidad inicial. Además, las histologías mostradas de el modelo en ratas, confirman la disgregación paulatina del material a partir de la primer semana post lesión y el crecimiento del tejido a través del implante.

Se cuantificó el resto del material contenido en el espacio analizado, el cual esta conformado por meninges, liquido ceforraquídeo, astrocitos, microglía, fibroblastos, etc. [66]. Éste incrementó en ambos casos marcando una tendencia a estabilizarse, y es mayor el cambio en la etapa aguda de la lesión en el sujeto control, incrementando el 29.35% de su aportación inicial. Mientras que el PNH implantado solo incremento 4.64% de su cuantificación original.

El análisis de las Imágenes DTI mostraron que la fracción de anisotropía (FA) disminuyó después de la LPSCME en ambos sujetos, indicando que la histoarquitectura fue modificada, lo cual implica, que la continuidad axonal se ha interrumpido y la difusión de agua ya no es tan restringida o bien no existe (tal cual lo definen Budde et al. [67]). Con el paso del tiempo el comportamiento de la FA cambia en ambos sujetos: la FA en el sujeto implantado tiende hacia los valores basales, anteriores a la LPSCME, coincidiendo con la recuperación mostrada en las ratas que han sido implantadas con el PPy-I [23,34,53], contrario con el PNH control, donde los valores de FA van disminuyendo en el epicentro de la lesión (Kamble et al. señalan la reducción de la FA a 0.367 [68] en diversos modelos de lesión) inclusive

la meseta en los valores de FA se amplía, esto indica degeneración Walleriana, lo cual implica pérdida progresiva en la histoarquitectura de la médula espinal tanto en dirección rostral como en dirección caudal. MacDonald et al. observaron la disminución de la FA con el tiempo hasta valores por debajo de 0.3 después de 1 semana en un modelo de lesión por contusión en ratones [61].

Mientras que la FA da una medida general de la organización del tejido, no proporciona información específica sobre la patología subyacente, por lo que será necesario hacer análisis respecto a los eigenvalores, Budde et al. estudiaron la relación de los eigenvalores con la fisiopatología de la LTME [67]. Varios estudios han encontrado una correlación entre la difusión longitudinal y transversal con la integridad axonal [69,70]. Las mediciones DTI también se ven afectadas por la desmielinización, ya que la mielina intacta ayuda a restringir la difusión de agua perpendicular a los axones. Algunos estudios sugieren cambios en las mediciones de DTI asociadas con la recuperación funcional [69] lo cual es concordante con la recuperación de la FA en las especies con PPy-I.

A través del tiempo existe una diferencia en la medición de los parámetros DTI en la evolución de la LPSCME, comparando el PNH lesionado e implantado con el PNH que sólo fue lesionado, lo que indica un proceso de crecimiento de tejido en el PNH implantado, que es concordante con la experiencia obtenida en el modelo en ratas [23,34]. Por ejemplo, en el epicentro de la LPSCME en el PNH control el día de la lesión se midió una FA de 0.42, un mes post lesión se obtuvo 0.324, dos meses después de la LPSCME la FA midió 0.242 y para el tercer mes post quirúrgico fue de 0.136. Para el PNH implantado la FA tuvo un valor de 0.402 al día de la LPSCME, 0.411 un mes después de la lesión, 0.642 dos meses post lesión y 0.746 el último mes de recuperación.

La tractografía nos aporta de manera gráfica una interpretación a los valores de DTI. En el PNH control, donde la tractografía evidencia la degeneración progresiva de la médula espinal, mostrando las zonas rostral y caudal cada vez más separadas. Esto hace evidente el proceso de degeneración Walleriana. Inclusive es posible observar la separación de los extremos de la lesión debido a la siringomielia post traumática en el extremo rostral de la lesión, en contraste con los resultados para el PNH implantado donde a partir del segundo mes después de la lesión, se observó

una reconexión en el eje principal de la difusión entre la zona rostral y la zona caudal, a través del epicentro de lesión.

Conclusiones

En ambos modelos, roedores y primates no humanos, la morfometría permitió observar el contraste que existe en la histoarquitectura entre los diferentes sujetos:

- Sujetos control.- hay una gran destrucción de la histoarquitectura en la zona de lesión.
- sujetos implantados.- existe una mayor conservación de la histoarquitectura aleadaña a la zona de lesión.

Para los primates no humanos, la recuperación de la fracción de anisotropía en la zona de lesión del sujeto implantado indica recuperación de la difusión estructurada a través del tiempo, en contraste con la disminución de la fracción de anisotropía en el sujeto no implantado.

Con el calculo de la tractografía se pudo observar la reconexión en la difusión de agua en el primate no humano implantado; reconstruyendo tridimensionalmente la estructura de la materia blanca se observó la reconexión de paquetes de tractos nerviosos a diferencia de el sujeto control, el cual muestra un incremento en la separación de los extremos caudal y cefálico respecto al epicentro de la lesión por sección completa del médula espinal así como la formación de siringomielia post traumática.

El implante de polipirrol dopado con Yodo mostró contribuir, también en primates no humanos, a la conservación de la histoarquitectura en la zona de lesión al ser implantado después de un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal, promoviendo a su vez el crecimiento de tejido a través de él.

Con el procedimiento de imágenes de resonancia magnética mostrado en éste trabajo es posible dar seguimiento *in vivo* al estado de el tejido circundante a la zona de lesión tanto en modelo de ratas como en modelo de primates no humanos, sin importar el modelo específico de lesión, inclusive es posible extrapolar los estudios y el procesamiento a la clínica para dar seguimiento a lesiones de médula espinal en humanos.

Se recomienda el uso de alguna terapia de rehabilitación para estudios posteriores con primates no humanos, en este caso se cumple el objetivo, de

comprobar la efectividad del implante per se, pero la dependencia que generaron los sujetos en su cuidado, debido a ser bípedos, fue fundamental en la respuesta motora.

Perspectivas

Implementar el modelo de lesión crónica con implante, para poder aplicarlo a pacientes que estén fuera de la ventana aguda en el tratamiento de lesión traumática de médula espinal.

Implementar el modelo de lesión por contusión de la médula espinal, aunque es menos agudo, este modelo de lesión es el más común en pacientes con lesión traumática de médula espinal.

Implementar de manera rutinaria al seguimiento de lesión traumática de médula espinal los estudios de IRM: DTI y Tractografía.

Incluir al seguimiento por IRM secuencias BOLD para cerebro y para médula espinal, para el análisis de respuesta funcional en la corteza cerebral (área sensitiva y motora) y en médula espinal. Se recomienda el post procesamiento del tipo *Resting State*.

Se recomienda el uso de alguna terapia de rehabilitación para estudios posteriores con primates no humanos, en este caso se cumple el objetivo, de comprobar la efectividad del material per se, pero la dependencia que generaron los sujetos en su cuidado, debido a ser bípedos, fue fundamental en la respuesta motora. La terapia podría inclusive ser estimulación magnética transcraneal.

Bibliografía

- [1] Strauss D., DeVivo M., Shavelle R., Brooks J., and Paculdo D, 2008, "Economic factors and longevity in spinal cord injury: a reappraisal," *Arch Phys Med Rehabil*, **89**, p. 532.
- [2] Wyndaele J. J., and Wyndaele M., 2006, "Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey?," *Spinal Cord*, **44**, pp. 523-529.
- [3] 2013, THE 2012 ANNUAL STATISTICAL REPORT for the SPINAL CORD INJURY MODEL SYSTEMS, National Spinal Cord Injury Statistical Center, Birmingham, Alabama.
- [4] Kandel E. R., Schwartz J H., and Jessell T M., 1997, *Neurociencia y conducta*, Editorial Prentice Hall, Madrid.
- [5] Shepherd Center, 2011, *Understanding Spinal Cord Injury*, The American Trauma Society.
- [6] Ropper A. H., 2001, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, New York.
- [7] Maynard M. F. Jr, Bracken B. M., G C., Ditunno J. F., Donovan H., Ducker B., Garber L., J M., L S., Tator H., Waters R. L., EJ W., and Young W., 1997, "International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury.," *American spinal injury association. Spinal Cord*, **35**, p. 266.
- [8] International Campaign for Cure of Spinal Cord Injury Paralysis.
- [9] Tator C. H., 1998, "Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury," *Neurosurgery*, **42**, p. 696: 708.
- [10] Hulsebosch C. E., 2002, "Advances in pathophysiology and treatment recent of siponal cord injury.," *Advances in Physiology Education*, p. 19.
- [11] Tator C. H., and Fehlings G. M., 1991, "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms.," *J Neurosurg*, **75**.
- [12] Thuret S., Moon L. D. F., and Gage F. H., 2006, "Therapeutic interventions after spinal cord injur," *Nature Publishing Group*, **7**, pp. 628-643.
- [13] Profyris C., Cheema S.S., Zang D., Azari M., Boyle K., and Petratos S., 2004, "Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury.," *Neurobiology of Disease*, **15**, pp. 415-436.
- [14] David S., 2002, "Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury.," *Prog. Brain Res.*, p. 407-414.
- [15] Quencer R. M., 2002, "Advances in imaging of spinal cord injury: implications for treatment and patient evaluation," *Prog. Brain Res.*, p. 3-8.
- [16] Bradbury E. J., and McMahon S. B., 2006, "Spinal cord repair estrategies: why do they work?," *Nat Rev Neurosci*, p. 10.
- [17] Xiang S., Pan W., and Kastin A. J., 2005, "Strategies to Create a Regenerating Environment for the Injured Spinal Cord" *Current Pharmaceutical Design*, **11**(10), pp. 1267-1277.
- [18] Barakat D. J., Gaglani S. M., Neravetla S. R., Sanchez A. R., Andrade C. M., Pressman Y., Puzis R., Garg M. S., Bunge M. B., and Pearse D. D., 2006, "Survival, Integration, and Axon Growth Support of Glia Transplanted Into the Chronically Contused Spinal Cord," *Cell Transplantation*, **14**, pp. 225-240.

- [19] Nakamura M., Okano H., Toyama Y., Dai H. N., Finn T. P., and Bregman B. S., 2005, "Transplantation of embryonic spinal cord-derived neurospheres support growth of supraspinal projections and functional recovery after spinal cord injury in the neonatal rat" *Journal of Neuroscience Research*, **81**, pp. 457-468.
- [20] Straley K. S., Foo C. W. P., and Heilshorn S. C., 2010, "Biomaterial Design Strategies for the Treatment of Spinal Cord Injuries," *Journal of Neurotrauma*, **27**, pp. 1-20.
- [21] T K., M D., and S S., 1991, "Carbon filament implants promote axonal growth across the transected rat spinal cord," *Brain Research*, pp. 139-145.
- [22] Nomura H., Katayama Y., Shoichet M. S., and Tator C. H., 2006, "Complete Spinal Cord Transection Treated by Implantation of a Reinforced Synthetic Hydrogel Channel Results in Syringomyelia and Caudal Migration of the Rostral Stump," *Neurosurgery*, **59**(1), pp. 183-192.
- [23] Olayo R., Ríos C., Salgado-Ceballos H., Cruz G., JJ M., Olayo G., Alvarez L., Mondragón R., Morales-Guadarrama A., Guizar-Sahagun G., and Diaz-Ruiz A., 2007, "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma," *J Mater Sci: Mater Med*, **19**, pp. 817-826.
- [24] Cruz G. J., Morales J., and Olayo R., 1999, "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole," *Thin Solid Films*, **342**, pp. 119-126.
- [25] Zhang Z., Roy R., Dugre F. J., Tessier D., and Le H Dao, 2001, "*In vitro* biocompatibility study of electrically conductive polypyrrole-coated polyester fabrics," *Journal of Biomedical Materials Research*, **57**(1), pp. 63-71.
- [26] Jiang X., Tessier D., Le H Dao, and Zhang Z., 2002, "Biostability of electrically conductive polyester fabrics: An *in vitro* study," *Journal of Biomedical Materials Research*, **62**, pp. 507-513.
- [27] Shi G., Rouabhia M., Wang Z., Dao L. H., and Zhang Z., 2004, "A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide," *Biomaterials*, **25**(13), pp. 2477-2488.
- [28] Li X., and Kolega J., 2002, "Effects of Direct Current Electric Fields on Cell Migration and Actin Filament Distribution in Bovine Vascular Endothelial Cells," *J Vasc Res*, **39**, pp. 391-404.
- [29] Brown M. L., and Loew L. M., 1994, "Electric Field-directed Fibroblast Locomotion Involves Cell Surface Molecular Reorganization and Is Calcium Independent," *the Journal of Cell Biology*, **127**(1), pp. 117-128.
- [30] Ozawa H., Abe E., Shibasaki Y., Fukuhara T., and Suda T., 1989, "Electric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) by a mechanism involving calcium ions," *Journal of Cellular Physiology*, **138**(5), pp. 477-483.
- [31] Lee J. Y., Bashur C. A., Goldstein A. S., and Schmidt C. E., 2009, "Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications," *Biomaterials*, **30**(26), pp. 4325-4335.
- [32] Olson H. E., Rooney G. E., Gross L., Nesbitt J. J., Galvin K. E., Knight A., Chen B., Yaszemski M. J., and Windebank A. J., 2009, "Neural Stem Cell- and Schwann Cell-Loaded Biodegradable Polymer Scaffolds Support Axonal Regeneration in the Transected Spinal Cord," *TISSUE ENGINEERING: Part A*, **15**(7), pp. 1797-1805.
- [33] BASSO D. M., BEATTIE M. S., and BRESNAHAN J. C., 1995, "A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats," *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*, **12**(1), pp. 1-21.
- [34] 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-Guadarrama A., Méndez-Armenta M., Plascencia N., del Carmen Fernandez M., and Ríos C., 2012, "*Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord guttransection,*" *J Mater Sci: Mater Med.*
- [35] Torres S. M. S., 2013, "Efecto bioquímico, morfométrico y funcional de la administración combinada de perfluorocarbonos e implantes poliméricos después de una lesión traumática aguda de médula espinal en ratas," INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA.
- [36] Morales J., Mondragón-Lozano R., Alvarez-Mejía L., Morales-Guadarrama A., Ríos C., Diaz-Ruiz A., Cruz G. J., Olayo M.-G., Salgado-Ceballos H., and Olayo R., 2013, "USE OF PLASMA-SYNTHETISISED PYRROLE-DERIVED POLYMERS FOR THE NEUROPROTECTION AND RECONNECTION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM," pp. 1-24.
- [37] Morales J., Mondragón-Lozano R., Alvarez-Mejía L., Morales-Guadarrama A., Ríos C., Diaz-Ruiz A., Cruz G. J., Olayo M.-G., Salgado-Ceballos H., and Olayo R., 2013, "USE OF PLASMA-SYNTHETISISED PYRROLE-DERIVED POLYMERS FOR THE NEUROPROTECTION AND RECONNECTION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM," pp. 1-20.
- [38] Morales J., Mondragón-Lozano R., Alvarez-Mejía L., Morales-Guadarrama A., Ríos C., Diaz-Ruiz A., Cruz G. J., Olayo M.-G., Salgado-Ceballos H., and Olayo R., 2010, "USE OF PLASMA-SYNTHETISISED PYRROLE-DERIVED POLYMERS FOR THE NEUROPROTECTION AND RECONNECTION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM," pp. 1-15.
- [39] Valentini R. F., Sabatini A. M., Dario P., and Aebischer P., 1989, *Brain Res.*
- [40] Al B. E., 1988, *Rev. San. Mil. Ma.*
- [41] Bloch F., 1946, "Nuclear Induction," *Physical Review*, **70**, p. 460.
- [42] Purcell E. M., Pound H. C., and R T. V., 1946, "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid," **69**, p. 37.
- [43] Bronzino J. D., 2007, *Biomedical Engineering Handbook.*
- [44] Contreras Lizardo O. A., 2009, "Secuencias funcionales en resonancia magnética (difusión, DTI, espectroscopia)," *Arch Neurocién*, **14**, pp. 56-68.
- [45] Hahn E. L., 1950, "Spin Echoes," *Physical Review*, **80**, pp. 580-602.
- [46] Winston G. P., 2012, "The physical and biological basis of quantitative parameters derived from diffusion MRI," *Quant Imaging Med Surg*, **2**, pp. 254-265.
- [47] Stejskal E. O., and Tanner J. E., 1965, "Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient," *J. Chem. Phys.*, **42**(1), p. 288.
- [48] Winston G.P., 2012, " The physical and biological basis of quantitative parameters derived from diffusion MRI," *Quant Imaging Med Surg*, **2**, pp. 254-265.
- [49] Tanner J. E., and Stejskal E. O., 1968, " Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method," *Journal of Chemical Physics*, **49**, pp. 1768-1777.
- [50] Rosenbloom M., Sullivan E.V., and Pfefferbaum A., 2003, "Using Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Imaging to Assess Brain Damage in Alcoholics," *Alcohol Res Health*, **27** pp. 146-152.
- [51] Ennis D. B., and Kindlmann G., 2005, "Orthogonal tensor invariants and the analysis of diffusion tensor magnetic resonance images," *Magn. Reson. Med.*, **55**(1), pp. 136-146.
- [52] Susumu M., Crain B. J., Chacko V. P., and van Zijl P. C. M., 1999, "Three-Dimensional Tracking of Axonal Projections in the Brain by Magnetic

- Resonance Imaging," *Ann Neurol*, pp. 265–269.
- [53] Morales-Guadarrama A., Salgado-Ceballos H., JJ M., Ríos C., Cruz G. J., Diaz-Ruiz A., Olayo M. G., Alvarez-Mejia L., Mondragón-Lozano R., and Olayo R., 2013, "CAT and MRI Studies of Spinal Cord Injured Rats Implanted with PPy/I," *RMIB*, **34**, pp. 145–155.
- [54] Courtine G., Bunge M. B., Fawcett JW Hodgson J., McKay H., Yang H., Zhong H., Tuszynski M. H., and Edgerton V. R., 2007, "Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans?," *Nat Med*, **13**, p. 561.
- [55] Iwanami A., Yamane J., Katoh H Nakamura M., Momoshima S., Ishii H., Tanioka Y., Tamaoki N., Nomura T., Toyama Y., and Okano H., 2005, "Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate: the common marmoset," *Journal of Neuroscience Research*.
- [56] Gufzar-Sahagún G., Grijalva I., Hernández-Godínez B., Franco-Bourland R. E., Cruz-Antonio L., Martínez-Cruz A., and Ibañez-Contreras A., 2011, "New approach for graded compression spinal cord injuries in Rhesus macaque: method feasibility and preliminary observations," *J Med Primatol*, **40**, pp. 401–413.
- [57] Morales-Guadarrama A., Mejía-González I., Hernández-Godínez B., Ibañez-Contreras A., Reyes-Pantoja S. A., and Olayo R., 2013, "DTI tractography and MRI in chronic cerebral ischemia in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in vivo," *Images in Neurology*, p. 134.
- [58] Deo A. A., Grill J. R., Hasan M. K., and Narayana A. P., eds., 2006, "In vivo serial diffusion tensor imaging of experimental spinal cord injury," *Journal of Neuroscience Research*, **83**, pp. 801–810.
- [59] Hulkower M. B., Poliak D. B., Rosenbaum S. B., Zimmerman M. E., and Lipton M. L., 2013, "A Decade of DTI in Traumatic Brain Injury: 10 Years and 100 Articles Later," *American Journal of Neuroradiology*, **34**(11), pp. 2064–2074.
- [60] Cheung M. M., Li D. T. H., Hui E. S., Fan S., Ding A. Y., Hu Y., and Wu E. X., 2012, "In vivo Diffusion Tensor Imaging of Chronic Spinal Cord Compression in Rat Model," pp. 2715–2718.
- [61] Mac Donald C. L., Dikranian K., Bayly P., Holtzman D., and Brody D., 2007, "Diffusion Tensor Imaging Reliably Detects Experimental Traumatic Axonal Injury and Indicates Approximate Time of Injury," *Journal of Neuroscience*, **27**(44), pp. 11869–11876.
- [62] Weber T., Vroemen M., Behr V., Neuberger T., Jakob P., Haase A., Schuierer G., Bogdahn U., Faber C., and Weidner N., 2006, "In Vivo High-Resolution MR Imaging of Neuropathologic Changes in the Injured Rat Spinal Cord," *American Journal of Neuroradiology*, pp. 598–604.
- [63] Schwartz E. D., Chin C.-L., Shumsky J. S., Jawad A. F., Brown B. K., Wehrli S., Tessler A., Murray M., and Hackney D. B., 2005, "Apparent Diffusion Coefficients in Spinal Cord Transplants and Surrounding White Matter Correlate with Degree of Axonal Dieback After Injury in Rats," *American Journal of Neuroradiology*, pp. 7–18.
- [64] Paulina Rosicka, Liu J., Yung A. C., Tetzlaff W., and Piotr Kozłowski, 2014, "In vivo longitudinal Myelin Water Imaging in rat spinal cord following Dorsal Column transection injury," *Magnetic Resonance Imaging*, pp. 250–258.
- [65] Schwartz E. D., Yeziarski R. P., Pattany P. M., Quencer R. M., and Weaver R. G., 1999, "Diffusion-Weighted MR Imaging in a Rat Model of Syringomyelia after Excitotoxic Spinal Cord Injury," *American Journal of Neuroradiology*, **20**, pp. 1422–1428.
- [66] Thuret S., Moon L. D. F., and Gage F. H., 2006, "Therapeutic interventions after

- spinal cord injury," *Nat Rev Neurosci*, **7**(8), pp. 628-643.
- [67] Budde M. D., Xie M., Cross A. H., and Song S. K., 2009, "Axial Diffusivity Is the Primary Correlate of Axonal Injury in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Spinal Cord: A Quantitative Pixelwise Analysis," *Journal of Neuroscience*, **29**(9), pp. 2805-2813.
- [68] Kamble R., Naik A., Venkataramana N., and Rao S., 2011, "Diffusion tensor imaging in spinal cord injury," *Indian J Radiol Imaging*, **21**(3), p. 221.
- [69] Budde M. D., Kim J. H., HF L., RE S., JH R., Cross A. H., and Song S. K., "Toward accurate diagnosis of white matter pathology using diffusion tensor imaging." *Magn. Reson. Med.*, **57**, pp. 688-695.
- [70] Kozlowski P., Raj D., Liu J., Lam C., Yung C. A., and W T., 2008, "Characterizing white matter damage in rat spinal cord with quantitative MRI and histology," *J. Neurotrauma*, **25**, pp. 653-676.