



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias
-Ingeniería Biomédica –

**Implante de un polímero semiconductor sintetizado por
plasma en combinación con rehabilitación física para
restablecer la función motora después de una
lesión traumática de la médula espinal**

M. en C. Ana Laura Alvarez Mejía

Ciudad de México, Marzo 2018



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 –

**Implante de un polímero semiconductor sintetizado por plasma en combinación
con rehabilitación física para restablecer la función motora después
de una lesión traumática de la médula espinal.**

Presenta:

M. en C. Ana Laura Alvarez Mejía

Directores de tesis:

Dr. Juan Morales Corona

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Comité evaluador:

Dr. Humberto Vázquez Torres

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dr. José Efrén Israel Grijalva Otero

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Dra. Sandra Orozco Suárez

Ciudad de México, Marzo 2018

Dedicatoria

A mi amado esposo por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A mí amado hijo por ser mi fuente de motivación para superarme cada día más.

A mi madre porque siempre creíste en mí y soy quien soy por ti.

A mis compañeros y amigos.

A mis maestros y asesores por su apoyo, paciencia y por siempre creer en mí.

A todos los integrantes del grupo de investigación, ya que sin su apoyo y colaboración, no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Por su apoyo y colaboración



**Universidad Autónoma Metropolitana
UAM-Iztapalapa**

Dr. Juan Morales Corona
Dr. Roberto Olayo González
Dr. Juan Carlos Axayacalt Morales Guadarrama
M. en C. Stephanie Maricela Sánchez Torres
M. en C. Omar Felipe Fabela Sánchez

Proyecto Camina A. C.

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

**Instituto Mexicano del Seguro Social
IMSS-Centro Médico Siglo XXI**

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos
Dr. Rodrigo Mondragón Lozano
Beca de estudiante No. 99094416
Proyecto No. FOFOI 2005/1/I/149

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
INNN**

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Dra. Ma. De los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

**Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
ININ**

Dra. Guadalupe Olayo González
Dr. Guillermo Jesús Cruz Cruz

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONACYT**

Beca para estudios de posgrado No. 172211
Beca de Proyecto No. 155239

Índice

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Fisiología y anatomía de la médula espinal.....	2
1.3 Neuropatología de la LTME.....	7
1.3.1 Fases de la LTME.....	7
1.3.1.1 Fase aguda	8
1.3.1.2 Fase subaguda.....	8
1.3.1.3 Fase crónica	8
1.3.2 Mecanismos de daño secundario.....	11
1.4 Estrategias para restablecer la función neurológica	18
1.4.1 Rehabilitación física	20
1.4.2 Materiales poliméricos como tratamiento después de una LTME	22
1.5 Polipirrol (PPy)	23
1.5.1 Aplicaciones biológicas y biomédicas.....	23
1.5.2 Síntesis	23
1.6 Polimerización por plasma	24
1.7 Implantes derivados del pirrol sintetizados por diferentes métodos en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas.....	27
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 General	33
2.2.2 Particulares.....	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1 Obtención de nanopartículas de PPy/I.....	34
5.2 Obtención de mesopartículas de PPy/I	35
5.3 Caracterización de las partículas	36
5.3.1 Espectroscopía IR.....	36
5.3.2 Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental	36
5.3.3 Distribución de tamaño de partícula	37
5.4 Fabricación de los implantes	37
5.5 Grupos experimentales	38
5.6 Procedimientos quirúrgicos	39
5.6.1 Anestesia	39
5.6.2 Lesión por contusión moderada de la médula espinal.....	39
5.6.3 Colocación del implante.....	40
5.7 Rehabilitación física.....	40

5.8 Evaluación funcional.....	41
5.9 Análisis histológico y morfométrico	42
5.10 Análisis estadístico	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Caracterización de las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I	44
6.1.1 Morfología.....	44
6.1.2 Espectroscopia IR.....	46
6.1.3 Análisis elemental.....	48
6.2 Efecto de los implantes de NPs y MPs de PPy/I en un modelo de LPCMME en ratas	48
6.2.1 Estudio piloto 1. Selección del implante.....	48
6.2.1.1 Recuperación de la función motora.....	48
6.2.1.2 Análisis histológico	50
6.2.2 Estudio Piloto 2. Tamaño del implante	52
6.2.2.1 Recuperación de la función motora.....	52
6.2.2.2 Análisis histológico	54
6.3 Efecto del PPy/I en combinación con rehabilitación física sobre la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional.....	56
6.3.1 Recuperación funcional	56
6.3.2 Análisis histológico y morfométrico	59
7. DISCUSIÓN.....	63
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXO 1. PATENTE	96
ANEXO 2. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.....	101
ANEXO 3. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.....	115
ANEXO 4. DICTAMEN DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3601 DEL IMSS.....	126
ANEXO 5. ESCALA BBB PARA EVALUAR LA FUNCIÓN LOCOMOTORA	127
ANEXO 6. PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN. MÉTODO DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE HARRIS.....	129

Índice de figuras

Figura 1. Descripción esquemática de algunos de los tractos espinales ascendentes y descendentes. (A) Tracto ascendente espinotalámico lateral que lleva información sensorial (impulsos de dolor y temperatura) de la periferia al cerebro. (B) Tractos descendentes corticoespinales motores. Este tracto motor contiene axones que pasan desde el giro precentral de la corteza cerebral hacia la médula espinal para hacer sinapsis con interneuronas espinales y neuronas motoras inferiores. (Figura modificada de [17]).	3
Figura 2. Anatomía comparativa de la médula espinal de rata y humano. (A) Diferencias en tamaño y forma en secciones transversales de la médula espinal a nivel cervical en ratas y humanos. (B) Localización aproximada de los tractos ascendentes y descendentes en cada especie. S= Tractos ascendentes (sensoriales), M=Tractos descendentes (motores). (Figura modificada de [20]).	5
Figura 3. Localización de los 31 nervios espinales. (Figura modificada de [22]).	6
Figura 4. Representación esquemática de la lesión de médula espinal, en un corte longitudinal. (Figura modificada de [33]).	9
Figura 5. Diagrama de reactor de polimerización por plasma.	35
Figura 6. Caminadora comercial modelo pawwws pet treadmill 42 inch con adaptación de carriles.	41
Figura 7. Morfología de nanopartículas de PPy/I, (a), (b) y (c). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de PPy/I sintetizadas por el método de plasma, (d) Distribución de tamaño.	45
Figura 8. Morfología de mesopartículas de PPy/I, (a), (b) y (c). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las películas de PPy/I molidas (mesopartículas) sintetizadas por el método de plasma, (d) Distribución de tamaño.	46
Figura 9. Espectro infrarrojo. a) Nanopartículas de PPy/I y b) Mesopartículas de PPy/I.	47
Figura 10. Figura 10. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; NPs60: animales implantados con 60µl de nanopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I) ; MPs60: animales implantados con 60 µL de mesopartículas de PPy/I. Los resultados se expresan como medias ±EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos NPs60 yMPs60 (No se observó diferencia significativa).	50
Figura 11. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI) y el tamaño de los quistes (Q) formados. A y B) Control: animales sin implante; C y D) NPs: animales implantados con 60µL de nanopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); E y F) MPs60: animales implantados con 60µL de mesopartículas de PPy/I. Barra de calibración: 1 mm (A, C y E) y 50 µm (B, D y F). Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).	52
Figura 12. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva medida por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; MP _{S60} : animales implantados con mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I) a un volumen de 60 µL; MP _{S30} : animales implantados con mesopartículas de PPy/I a un volumen de 30 µL; MP _{S10} : animales implantados con mesopartículas de PPy/I a un volumen de 10 µL. Los resultados se expresan como medias ±EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos MP _{S30} y MP _{S10} (p<0.009 y 0.008, respectivamente).	53
Figura 13. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI) y el tamaño de los quistes (Q) formados. A y B) Control: animales sin implante; C y D) MP _{S10} : animales implantados con 10 µL mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); E y F) MP _{S30} : animales implantados con 30 µl de mesopartículas de PPy/I; G y H) MP _{S60} : animales implantados con 60µL mesopartículas de PPy/I. Barra de calibración: 1mm (A, C, E y G) y 50µL (B, D, F y H). Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).	55

Figura 14. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; MP30: animales implantados con 30µL de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); Control-RF: animales sin implante más rehabilitación física usando una caminadora; MP30-RF: animales implantados con mesopartículas de PPy/I a un volumen de 30 µL más rehabilitación física sobre una caminadora. Los resultados se expresan como medias ±EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos Control-RF y MP30-RF (p<0.017 y 0.011, respectivamente) y entre el grupo Mps30 y el grupo MP30-RF (p<0.037).	58
Figura 15. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. SS: animales a los que se les administro 30µl de solución salina (vehículo); MP30: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); SS-RF: animales a los que se les administro 30µl de solución salina (vehículo) más rehabilitación física usando una caminadora; MP30-RF: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Los resultados se expresan como medias ±EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo SS y los grupos MP30 y MP30-RF (p<0.015 y 0.000, respectivamente) y entre el grupo MP30 y MP30-RF (p<0.013)	59
Figura 16. Análisis morfométrico del tejido preservado después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. SS: animales a los que se les administro 30µl de solución salina (vehículo); MP30: animales implantados con 30µL de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); SS-RF: animales a los que se les administro 30µl de solución salina (vehículo) más rehabilitación física usando una caminadora; MP30-RF: animales implantados con 30µL de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Los resultados se expresan como medias ±EE. Prueba Kruskal–Wallis seguida de la prueba Mann–Whitney. *Diferencia significativas entre el grupo SS y los grupos MP30 y MP30-RF (p<0.034 y 0.05, respectivamente).....	60
Figura 17. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso y el tamaño de los quistes (Q) formados. A)Control: animales sin implante; B)Control-RF: animales sin implante y rehabilitación física usando una caminadora; C) SS: animales a los que se les administro 30 µL de solución salina (vehículo); D) SS-RF: animales a los que se les administro 30 µL solución salina más rehabilitación física usando una caminadora; E) MP30: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de PPy/I; F) MP30-RF: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Barra de calibración: 1mm. Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6)	61
Figura 18. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI), la destrucción del tejido nervioso y el tamaño de los quistes (Q) formados. A) Control: animales sin implante; B) Control-RF: animales sin implante y rehabilitación física sobre una caminadora; C) SS: animales a los que se les administro 30µL de solución salina (vehículo); D) SS-RF: animales a los que se les administro 30 30µL de solución salina más rehabilitación física usando una caminadora; E) MP30: animales implantados con 30µL de mesopartículas de PPy/I; F) MP30-RF: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física susando una caminadora. Barra de calibración 50µm. Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).....	62

Índice de tablas

Tabla I. Principales características fisiopatológicas de las tres fases de la LTME.....	10
Tabla II. Porcentaje atómico en las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I	48

Abreviaturas

BBB	Basso, Beattie y Bresnahan
Ca⁺⁺	Calcio
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
GABA	ácido gamma-aminobutírico
IR	Infrarrojo
K⁺	Potasio
LPCMME	Lesión por contusión moderada de la médula espinal
LTME	Lesión traumática de la médula espinal
MPs	Mesopartículas de PPy/I
MPs-RF	Mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física
Na⁺	Sodio
NPs	Nanopartículas de PPy/I
PPy	Polipirrol
PPy/I	Polipirrol/yodo
PPy/PEG	Polipirrol/polietilenglicol
RF	Rehabilitación física
SS	Solución salina como vehículo
SS-RF	Solución salina más rehabilitación física

Resumen

Actualmente no existe un tratamiento universalmente aceptado para la lesión traumática de la médula espinal (LTME), patología que puede causar paraplejia o cuadriplejia dependiendo el sitio y gravedad de la lesión. Debido a la complejidad de la LTME, más de una estrategia terapéutica puede ser necesaria para recuperar las funciones perdidas.

Después de una LTME, el tratamiento que se aplica es en gran medida paliativo, e incluye terapias de rehabilitación para mantener el tono muscular, prevenir la espasticidad, conservar la densidad ósea y mantener el buen estado de las articulaciones. Sin embargo, dependiendo de la severidad de la lesión, de la actividad física aplicada, de la cantidad y del momento en que se inicie la terapia, esta puede ofrecer otros efectos benéficos como la inducción de la plasticidad en la médula espinal, aumentar los niveles de factores neurotróficos en el músculo y la médula espinal, regular los niveles de neurotransmisores y favorecer la función sensitiva y motora. La rehabilitación física usando una caminadora es la más utilizada en área clínica y en área experimental. No obstante, los beneficios que aporta la rehabilitación física, los efectos son limitados; por lo que, se propone su uso en combinación con otra estrategia terapéutica que también haya demostrado efectos benéficos sobre la recuperación funcional y que además tenga un efecto neuroprotector, con la finalidad de obtener un mejor resultado funcional.

En estudios previos, realizados en nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que los implantes derivados del pirrol, como tratamiento en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal (LPSCMME), tienen un efecto neuroprotector y favorecen la recuperación funcional. Sin embargo, este efecto benéfico sólo se obtiene cuando los materiales son sintetizados por el método de polimerización por plasma, y no así cuando se obtiene por métodos químicos y electroquímicos.

A pesar de los resultados obtenidos con los implantes derivados del pirrol sintetizados por plasma, En el área clínica, una LTME rara vez resulta en una LPSCME y el tratamiento no podría aplicarse por medio de una pastilla, ni tampoco inmediatamente después de la lesión. Con el fin de acercarse a los casos médicos en el área clínica, en el presente estudio se evaluó el efecto de un implante de PPy/I (polipirrol/yodo) sintetizado por polimerización por plasma en un modelo de lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME), el cual, se aplicó 48 h después de la lesión, para dar tiempo para que el edema causado por la lesión primaria haya disminuido. Además, se evaluó el efecto del tratamiento combinado del implante de PPy/I con rehabilitación física (RF) por medio de una caminadora, sobre la protección del tejido nervioso y sobre la recuperación funcional.

Para poder aplicar el tratamiento en una LPCMME, este debía poder administrarse por medio de una inyección, para lo cual, se desarrollaron dos estudios pilotos y se determinó el tipo de implante, su morfología y su tamaño. Se sintetizaron por el método de plasma, nanopartículas de PPy/I (NPs), partículas esféricas de entre 40 a 200 nm de diámetro y mesopartículas de PPy/I (Mps), películas delgadas molidas hasta obtener partículas de diferente tamaño y forma de entre 0.6-25.9 μm de diámetro. Las NPs y MPs se suspendieron en solución salina a una concentración de 5 mg/mL y se implantaron 60 μL en un modelo de LPCMME en ratas, 48 h después del traumatismo en el sitio de lesión.

Los animales fueron evaluados por la escala BBB por ocho semanas y se observó que los animales implantados con NPs no mostraron un efecto diferente a los animales Control, mientras que las MPs tendieron a tener una mejor recuperación funcional en comparación a los animales Control y los implantados con NPs. Posteriormente, se evaluó el efecto de tres diferentes tamaños de implante de MPs: 10 μL , 30 μL y 60 μL . Aunque todos los tratamientos presentaron una recuperación funcional similar, se eligió el tratamiento a 30 μL , porque a un volumen de 10 μL , se ingresa una cantidad muy pequeña de material al sitio de lesión y podría perderse el efecto y un volumen de 60 μL , al ser tan grande la muestra, generar un mayor daño a la médula espinal, por efecto de compresión.

Después de determinar el tipo de implante y la terapia de rehabilitación sobre una caminadora, se desarrolló el siguiente modelo experimental. Ratas con LPCMME se dividieron en seis grupos experimentales (n=5): grupo Control, animales con LPCMME; grupo SS, animales con LPCMME más 30 μ L de solución salina; grupo MPs, animales con LPCMME más 30 μ L de mesopartículas; grupo Control-RF, animales con LPCMME más rehabilitación física; grupo SS-RF, animales con LPCMME más 30 μ L de solución salina en combinación con rehabilitación física y grupo MPs-RF, animales con LPCMME más 30 μ L de mesopartículas en combinación con rehabilitación física. La solución salina o las MPs se inyectaron en el sitio de lesión 48 h después de la LTME. Cuatro días más tarde, se inició la terapia de RF, cinco días a la semana por un período de dos meses. La recuperación funcional se evaluó semanalmente usando la escala motora BBB durante nueve semanas y se evaluó la protección de tejido nervioso por medio de análisis histológico y morfométrico. En los animales implantados con MPs, se observó que el implante se integró al tejido nervioso sin respuesta de rechazo, así como un aumento en la cantidad de tejido preservado, también mostró una mejor recuperación funcional en comparación a los animales Control y SS. Todos los animales que recibieron RF, mostraron un incremento en su recuperación funcional y el tratamiento combinado de MPS más RF incrementó el efecto benéfico sobre la recuperación funcional en comparación al uso de los tratamientos por separado.

1. Antecedentes

1.1 Epidemiología

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un desorden neurológico devastador que afecta a miles de personas cada año. En las últimas décadas se ha logrado una mejor comprensión de los eventos fisiopatológicos generados después de una LTME, aportando ideas sobre los mecanismos fundamentales que contribuyen en el daño al tejido y a la baja capacidad de regeneración de las neuronas lesionadas. Las opciones de tratamientos actuales para la LTME incluyen el uso de fármacos como altas dosis de metilprednisolona [1-5], intervenciones quirúrgicas para estabilizar y descomprimir la médula espinal [6-7] y rehabilitación física (RF) [8-9]. No obstante, la LTME sigue siendo una condición devastadora para quien la padece, y para la cual aún no existe cura. Debido a lo anterior, se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas en modelos animales las cuales han mostrado resultados prometedores. Sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer, para determinar si alguna de estas estrategias podría de manera segura y eficaz, mejorar el estado del paciente con una LTME [10-12].

A la fecha, el tratamiento de la LTME es en gran medida paliativo, e incluye la prevención de la progresión de la lesión, el manejo de la espasticidad, el control de la disautonomía (trastornos provocados por el mal funcionamiento del sistema nervioso autónomo) y la desafrentación ante los síndromes de dolor, la implementación de regímenes de entrenamiento para intestino y vejiga, la gestión de las complicaciones de la pérdida de la sensibilidad y la educación a los pacientes para enfrentar su discapacidad. No obstante lo anterior, los continuos avances en la investigación en el área neurológica prometen cambiar este paradigma de paliación por intervenciones con posibilidad de cura [10].

A nivel mundial, se estima que 2.5 millones de personas viven con LTME, a los cuales se suman 130,000 nuevos casos cada año [12]. Se ha reportado que en la ciudad de México, se presentan alrededor de 18.1 casos por millón de habitantes [13]. Entre las principales causas se encuentran

los accidentes automovilísticos (38%), eventos violentos (26%), caídas (22%) y accidentes deportivos (7%), donde las principales víctimas son personas jóvenes de entre 15 a 35 años de edad [14].

Esta condición por lo general produce déficit neurológico y discapacidades que provocan pérdida de las capacidades sensitivas y motoras por debajo del sitio de lesión causando paraplejia o tetraplejia y también otros problemas comunes relacionados con la LTME tales como infecciones en la vejiga y riñones, problemas intestinales y cardíacos y disfunciones respiratorias, que en conjunto tienen un fuerte impacto en el comportamiento fisiológico, psicológico y social de los pacientes que la padecen, por lo que es importante desarrollar una estrategia terapéutica que se enfoquen directamente a este problema [10,15].

1.2 Fisiología y anatomía de la médula espinal

La médula espinal proporciona un medio de comunicación entre el cerebro y el resto del organismo; se extiende desde la base del cerebro en el bulbo raquídeo, pasa a través del foramen magnum del cráneo y se encuentra contenida dentro del conducto raquídeo donde finaliza en las primeras vértebras lumbares. La médula se extiende hasta la vértebra lumbar 1 (L1) en los humanos, o hasta L3 en el caso de las ratas, porque la columna vertebral crece más rápido que la médula espinal [16-17].

Como se mencionó previamente, la médula espinal se encuentra protegida por la columna vertebral, la cual está compuesta de vertebras individuales. Al igual que el cerebro, está protegida por tres membranas de tejido conectivo llamadas meninges que de afuera hacia adentro las meninges son la duramadre, aracnoides y piamadre. Finalmente y ayudando a proteger la médula espinal, entre la aracnoides y la piamadre se encuentra el espacio subaracnoideo, el cual está lleno de líquido cefalorraquídeo, y entre la dura madre y el periostio se encuentra el espacio epidural, el cual está lleno de tejido fibroso y adiposo conectivo [16-17].

La estructura interior de la médula espinal se caracteriza por la forma de H de la sustancia gris al centro rodeada de sustancia blanca. La sustancia gris está compuesta de interneuronas, cuerpos celulares y dendritas de neuronas eferentes, de la entrada de fibras de neuronas sensoriales y de células gliales. La sustancia blanca (excepto cuando los cuernos dorsales tocan los márgenes de la médula espinal), se compone principalmente de grupos de axones mielinizados. Estos grupos de axones, llamados tractos de fibras o vías, corren longitudinalmente a través de la médula espinal. Algunos son descendentes, para transmitir información desde el cerebro hasta la periferia y otros son ascendentes, para transmitir la información de la periferia al cerebro (Fig. 1) [10, 18-19].

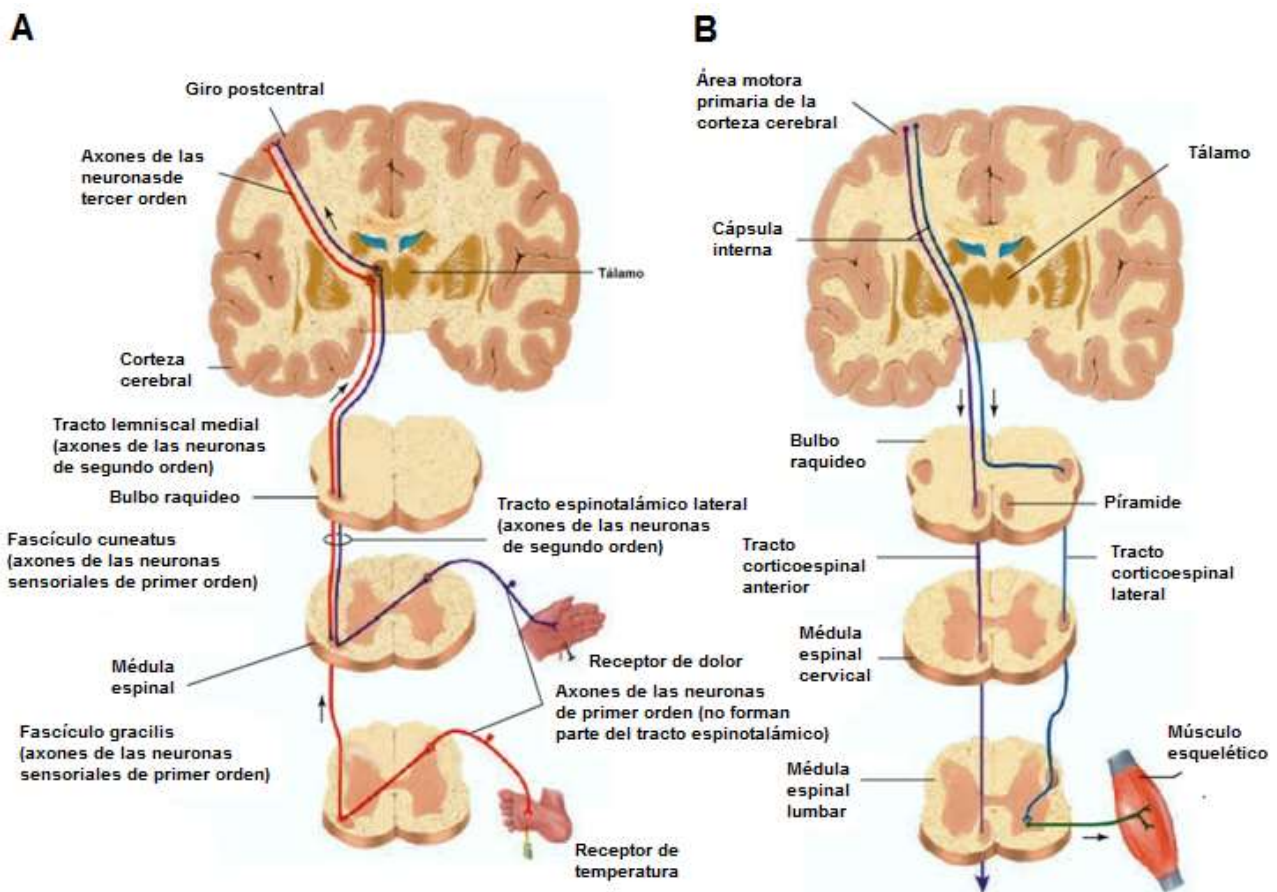


Figura 1. Descripción esquemática de algunos de los tractos espinales ascendentes y descendentes. (A) Tracto ascendente espinotalámico lateral que lleva información sensorial (impulsos de dolor y temperatura) de la periferia al cerebro. (B) Tractos descendentes corticoespinales motores. Este tracto motor contiene axones que pasan desde el giro precentral de la corteza cerebral hacia la médula espinal para hacer sinapsis con interneuronas espinales y neuronas motoras inferiores. (Figura modificada de [17]).

Los nombres de los tractos ascendentes generalmente empiezan con el prefijo espino- y terminan con el nombre de la región del cerebro donde las fibras de la médula espinal hacen su primera sinapsis. Por ejemplo, el tracto espinotalámico anterior, el cual conduce los primeros impulsos hacia el tálamo; desde ahí la información sensorial se transmite a la corteza cerebral. Los nombres de los tractos motores descendentes, a la inversa de los ascendentes, comienzan con un prefijo que indica la región del cerebro que da lugar a las fibras y termina con el sufijo espinal. El tracto corticoespinal, por ejemplo, inicia en la corteza cerebral y desciende a lo largo de la médula espinal. Es importante destacar que la localización de los tractos en la médula espinal puede variar entre las especies y que hay una diferencia significativa en la posición de las fibras de los tractos corticoespinales (responsables de los movimientos voluntarios cualificados) en humanos y roedores. En los seres humanos, el principal haz corticoespinal se encuentra en la columna lateral, mientras que en los roedores se encuentra en la parte ventral del funículo dorsal (Fig 2) [20].

Los tractos de fibras antes mencionados son cruciales en la comunicación entre la médula espinal y el cerebro. En el ser humano grupos de fibras aferentes (sensoriales) que ingresan en la médula espinal de los nervios periféricos entran en el lado dorsal de la médula a través de las raíces dorsales. Pequeñas protuberancias en las raíces dorsales y ganglios de la raíz dorsal, contienen cuerpos celulares de las neuronas aferentes. Los axones de las neuronas eferentes (motores) salen de la médula espinal a través de las raíces ventrales. Cerca de la médula, las raíces dorsales y ventrales desde el mismo nivel se combinan para formar nervios espinales, uno a cada lado de la médula espinal. Los nervios espinales son designados de acuerdo a los cinco niveles vertebrales de los cuales ellos salen: cervical, torácico, lumbar, sacro y coccígeo. En el hombre la médula espinal consta de treinta y un nervios espinales (Fig 3): ocho nervios cervicales que controlan los músculos y glándulas y reciben información o entrada sensorial del cuello, hombro, brazos y manos; doce nervios torácicos asociados con el pecho y las paredes abdominales; cinco nervios lumbares asociados con la cadera y piernas; cinco nervios sacros asociados con los genitales y el tracto digestivo inferior; y un nervio coccígeo que inerva la piel sobre el cóccix [21]. Mientras que en la rata, la médula espinal comprende treinta y cuatro nervios espinales: ocho cervicales,

trece torácicos, seis lumbares, cuatro sacros y tres coccígeos y las funciones asociadas generalmente son similares [10].

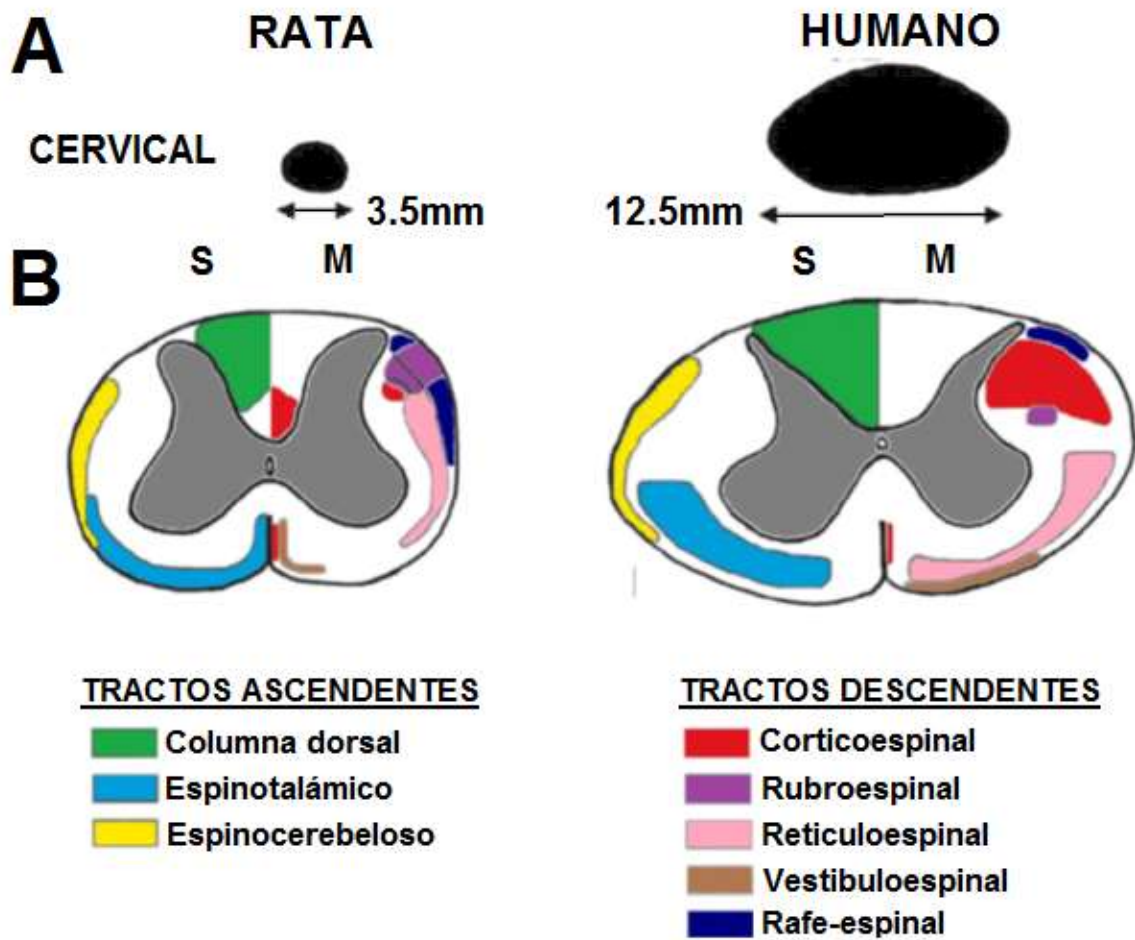


Figura 2. Anatomía comparativa de la médula espinal de rata y humano. (A) Diferencias en tamaño y forma en secciones transversales de la médula espinal a nivel cervical en ratas y humanos. (B) Localización aproximada de los tractos ascendentes y descendentes en cada especie. S= Tractos ascendentes (sensoriales), M=Tractos descendentes (motores). (Figura modificada de [20]).

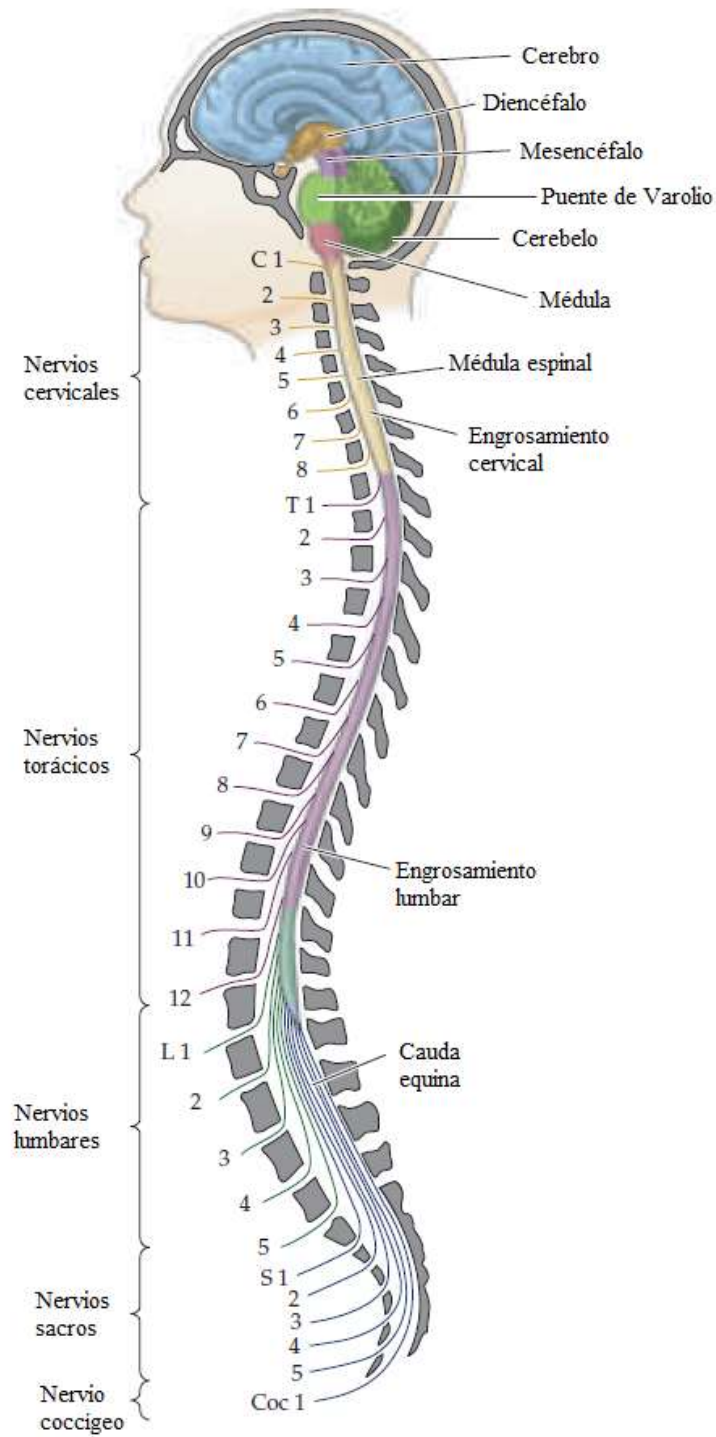


Figura 3. Localización de los 31 nervios espinales. (Figura modificada de [22]).

1.3 Neuropatología de la LTME

1.3.1 Fases de la LTME

Después de una lesión primaria en la médula espinal, ya sea por laceración, contusión, compresión o sección completa, el traumatismo causa alteraciones vasculares y metabólicas que desencadenan una cascada de eventos fisiopatológicos denominados mecanismos de daño secundario [23-25], los cuales, causan daño y muerte a las células que sobrevivieron al traumatismo, con lo que se incrementa el daño original [26] y se producen diversos grados de disfunción incluyendo parálisis permanente por debajo del sitio de lesión.

Aunque las neuronas sobrevivientes cercanas al sitio de lesión tienen la habilidad de reorganizar su anatomía y conectividad funcional [27], esta reconexión puede tomar varios años, o no ocurrir, debido al ambiente adverso producido por los mecanismos de daño secundario, los cuales limitan la plasticidad espontánea, disminuyen la supervivencia neuronal y la recuperación funcional [28].

La respuesta biológica después de una LTME tiene una secuencia temporal (Tabla I) dividida en tres fases: aguda, con una duración de segundos a minutos después de la LTME; subaguda, con una duración de minutos a semanas después de la LTME y crónica, con una duración de meses a años después de la LTME [26]. Diversos grupos de células y moléculas del sistema nervioso, inmunológico y vascular están involucradas en cada fase. La mayoría de las células participantes residen en la médula espinal, pero otras son convocadas al sitio de lesión desde el sistema circulatorio [29]. Algunos eventos de la fase aguda se continúan en la fase subaguda, y algunos eventos de la fase subaguda siguen desarrollándose durante la fase crónica.

1.3.1.1 Fase aguda

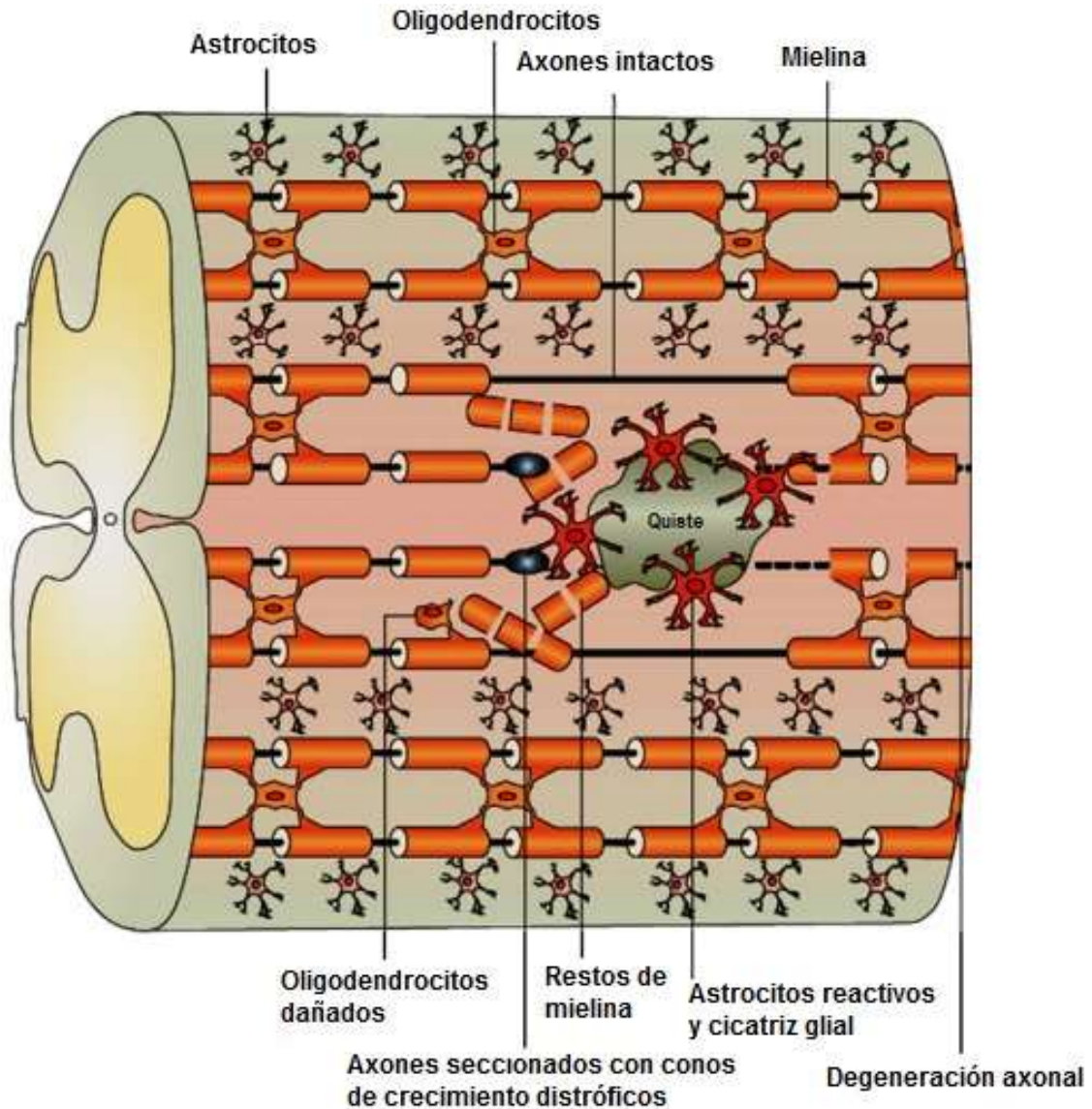
El daño primario producido por el traumatismo causa hemorragia y daño vascular inmediato y cambia la estructura y morfología de la médula espinal debido a las alteraciones físicas y bioquímicas de las células. Estas alteraciones comienzan pocos segundos después de la LTME (Tabla I) y se ven reflejadas por eventos sistémicos y locales [30-31], entre los que destacan la hipotensión sistémica, el shock medular, el vasoespasmo, la muerte celular en el sitio de lesión, el edema y la isquemia, el compromiso de la membrana plasmática, las alteraciones en la homeostasis iónica y la acumulación de neurotransmisores [26].

1.3.1.2 Fase subaguda

Es en donde se llevan a cabo principalmente los mecanismos de daño secundario. Esta fase se establece minutos después de la lesión y pueden durar semanas o meses y se caracteriza principalmente porque el sitio de lesión se agranda y porque se continúan algunos eventos de la fase aguda como cambios en los electrolitos, el edema y la muerte celular por necrosis. Aunado a lo anterior se presentan nuevos eventos (Tabla I), tales como la formación de radicales libres, la respuesta del sistema inmune y/o inflamación y la muerte por apoptosis, entre otros [29].

1.3.1.3 Fase crónica

Se presenta meses a años después de la LTME, conduce a deficiencias neurológicas en ambas direcciones ortógrada y retrograda (Fig. 4), incluyendo regiones del cerebro [32-33].



En esta fase (Tabla I), continúan algunos eventos de la fase subaguda tales como la muerte por apoptosis y la desmielinización de los axones sobrevivientes cercanos al sitio de lesión. Sin embargo, aunque en esta fase el daño al tejido medular ya es muy grande, en esta etapa se forma una cicatriz glial que trata de limitar el daño al tejido nervioso, también se presentan procesos de regeneración y alteraciones en los neurocircuitos que tratan de recuperar algunas de las funciones perdidas a partir de los axones sobrevivientes [33].

Tabla I. Principales características fisiopatológicas de las tres fases de la LTME

Aguda	Subaguda	Crónica
Desregulación iónica		
Hemorragia		
Daño vascular		
Cambios en la estructura y morfología de la médula espinal		
Hipotensión sistémica y shock medular		
Vasoespasmo	Vasoespasmo	
Muerte celular en el sitio de lesión	Muerte celular en el sitio de lesión	
Edema	Edema	
Necrosis	Necrosis	
Isquemia	Isquemia	
Alteraciones en la homeostasis iónica	Alteraciones en la homeostasis iónica	
Acumulación de neurotransmisores	Acumulación de neurotransmisores	
Excitotoxicidad	Excitotoxicidad	
Alteraciones en la membrana plasmática	Alteraciones en la membrana plasmática	
	Producción de radicales libres	
	Lipoperoxidación (peroxidación lipídica)	
	Bloqueo de la conducción	
	Falla energética y disminución de ATP (adenosín trifosfato)	
	Invasión de células inmunes y liberación de citocinas	
	Muerte celular mediada por la inflamación	
	Desmielinización de los axones sobrevivientes	Continúa la desmielinización
	Apoptosis	Continúa la apoptosis
	Iniciación de la cavitación central	Continúa la cavitación central
	Inicio de la cicatriz astrogliar	Cicatriz glial
		Plasticidad (procesos de regeneración y alteración de los neurocircuitos)
		Siringomielia

*Las partes sombreadas en color verde corresponden a los eventos comunes entre la fase aguda y la subaguda ó entre la fase subaguda y la crónica.

1.3.2 Mecanismos de daño secundario

La comprensión de los eventos bioquímicos y celulares que componen las fases post-lesión es de suma importancia, ya que proporcionan información que podría conducir a terapias prometedoras que reduzcan al mínimo la extensión de la lesión y promuevan la regeneración nerviosa. Estos eventos secundarios consisten en:

- **Desregulación iónica:** La lesión primaria ocasionada por el impacto a la médula espinal causa daño en la microcirculación sanguínea, lo que genera una falla energética que se traduce en la pérdida de la regulación iónica. Este evento involucra la movilización de iones potasio (K^+) y sodio (Na^+) al exterior de la células, con lo que se ocasiona un incremento en las concentraciones extracelulares y la movilización de calcio (Ca^{++}) al interior de la célula, lo cual causa un incremento en las concentraciones intracelulares de este ión, y conlleva al shock medular [31].
- **Daño vascular e isquemia:** Inmediatamente después del impacto la disrupción vascular causa hemorragia, vasoespasmos, trombosis, pérdida de la autorregulación, hipotensión sistémica (shock neurogénico) y ruptura de la barrera hematoencefálica. Estos cambios conducen a la formación de edema, necrosis e isquemia [34-36].

Las hemorragias graves que se presentan predominantemente en la sustancia gris, conducen a hemorragia necrótica y subsecuentemente a mielomalacia en el sitio de lesión [37]. Aunque las arterias grandes permanecen aparentemente intactas, se producen cambios en la microcirculación local principalmente en los capilares y vénulas, lo cual disminuye importantemente el flujo sanguíneo en el sitio de lesión [34, 38-39]. Dicha isquemia empeora progresivamente en la primeras horas [36], llevando a la formación de edema medular local [37, 40], el cual es perjudicial para el tejido [41-42]. Por lo que para contrarrestarlo se liberan varios factores vasoactivos incluyendo tromboxanos, leucotrienos, factores de agregación plaquetaria, serotonina y opioides endógenos, lo que conduce a un incremento de la isquemia

por hipoperfusión, hipoxia e hipoglucemia [43-45], lo que en conjunto incrementa la muerte celular por necrosis en el sitio de lesión [46]. Después de la isquemia se continúa un periodo de reperfusión, el cual aumenta el daño al tejido y contribuye a la exacerbación de la cascada de eventos secundarios [47-48]. El daño tisular inducido por la isquemia y reperfusión está mediado a través de radicales libres y otros subproductos tóxicos [49]. Los radicales libres derivados de oxígeno incluyen al radical superóxido, el hidroxilo y el óxido nítrico, además de otros oxidantes de alta energía como el peroxinitrito, se producen durante la isquemia [50-51] con una subida más pronunciada durante el periodo de reperfusión temprana [52-53]. Estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente) contribuyen a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (ácido desoxirribonucleico), resultando en una disfunción molecular, denominada estrés oxidativo [50]. El estrés oxidativo a su vez impide la función de proteínas claves para la homeostasis celular como son las bombas iónicas y los transportadores de glucosa [54]. La oxidación de lípidos ocasiona pérdida de la integridad de las membranas en las células adyacentes a la lesión [50, 55]. Por otro lado, la hipoxia e hipoglucemia local disparan un incremento en la liberación de glutamato y otros aminoácidos excitadores que conducen a la muerte celular por excitotoxicidad [36-37,56].

- **Radicales libres y peroxidación lipídica:** Un proceso patológico que ocurre en etapas tempranas de la LTME es la formación de ERO y ERN [57-58], las cuales causan peroxidación lipídica, daño oxidativo y nitrativo a las proteínas y ácidos nucleicos [56]. En la peroxidación lipídica, los radicales libres absorben un electrón de una molécula lipídica, la cual a su vez se vuelve menos estable, de este modo se induce una reacción en cadena que conduce a la disrupción de la membrana celular y muerte por necrosis [26]. Además, el daño oxidativo incrementa la disfunción mitocondrial [59] y contribuye al exceso de Ca^{++} intracelular el cual activa proteasas dando como resultado la descomposición de las proteínas del citoesqueleto [58]. Aunado a lo anterior, la peroxidación lipídica conduce a la formación de productos aldehído que deterioran la función de las enzimas clave del metabolismo, tales como la $Na^+ K^+$ -ATPasa (Adenosintrifosfatasa) [60]. Esta actividad de la enzima es crítica para el mantenimiento de la excitabilidad neuronal y su falla conduce a la pérdida de la

función neuronal, que en última instancia puede llevar a la disolución del tejido [61].

- **Excitotoxicidad:** La disrupción de la membrana celular, la muerte celular primaria y la isquemia dan lugar a un incremento en las concentraciones extracelulares de glutamato y otros aminoácidos excitadores (6-8 veces mayores que las concentraciones normales), como consecuencia del incremento en las concentraciones de Ca^{++} intracelular por la despolarización de la membrana plasmática [62]. Los neurotransmisores glutamato y aspartato se unen a sus receptores metabotrópicos o ionotrópicos del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA/kainato (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico/kainato), los cuales tiene asociado un canal de $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$. Durante este proceso se incrementa aún más las concentraciones del Ca^{++} intracelular y diversas enzimas dependientes de Ca^{++} son activadas, como la sintasa del óxido nítrico constitutiva, la fosfolipasa C, la fosfolipasa A_2 , diversas cinasas y fosfatasas, entre otras, iniciándose así la señalización de segundos mensajeros y la generación de radicales libres que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo, donde se pierde el balance entre la generación de radicales libres y la capacidad de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) para contrarrestarlos [63-64]. Así mismo, se activan proteasas como la calpaína que destruyen la mielina, favoreciendo un proceso desmielinizante [65] lo que conduce a una reducción o pérdida de transmisión axonal (bloqueo de la conducción), provocando la desconexión entre el cerebro y la médula espinal por debajo del nivel donde ocurrió la LTME, lo que produce motor, autonómico y sensitivo [26].
- **Respuesta inflamatoria:** La inflamación es uno de los eventos claves después de una LTME, se produce de inmediato y persiste durante varias semanas o meses después de la LTME [66]. De forma inicial, se activa la microglía residente, mientras que la infiltración de leucocitos rápidamente comienza a liberar una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, incluyendo la interleucina 1β (IL- 1β), interleucina-6 (IL-6), factor de crecimiento tumoral - α (TNF- α) - y radicales libres [67], lo que permite una mayor extravasación de leucocitos y mayor daño al tejido nervioso [47, 68-69]. La respuesta inflamatoria es esencial para la eliminación de restos

celulares, lo cual puede promover la regeneración de las neuronas sobrevivientes. Sin embargo, la sobreactivación de la respuesta inflamatoria puede dañar el tejido sano y exacerbar la lesión [26]. Algunos estudios han demostrado que la inflamación juega un papel importante en la reparación del tejido neuronal [70]. El reto para los investigadores es aprender cómo controlar la interacción entre los nervios y el sistema inmune para minimizar los fenómenos de neurodegeneración retardados mientras se promueve la regeneración axonal. Por ejemplo, Klusman y Schwab (1997) demostraron que la administración de un cóctel proinflamatorio (TNF- α , IL-1 β e IL-6) cuatro días después de la LTME reduce la infiltración de macrófagos, la activación de microglía y la pérdida de tejido. Sin embargo, el suministro de un cóctel de citocinas un día después de la lesión condujo a una mayor pérdida de tejido [71]. Esto sugiere que la temporalidad de la respuesta inflamatoria puede ser una variable crítica que determina si una respuesta inflamatoria es destructiva o constructiva [10].

La respuesta inflamatoria después de una LTME atrae a cuatro categorías principales de células inflamatorias: neutrófilos, monocitos, microglía y linfocitos T [35,72]. Los neutrófilos son las primeras células inmunes que llegan al sitio de lesión desde el sistema circulatorio, especialmente de células vasculares endoteliales, las cuales regulan y expresan moléculas de adhesión en sus membranas celulares para guiar a los neutrófilos para que lleguen al sitio de lesión. Los neutrófilos en el tejido espinal remueven intrusos microbianos y restos de tejido además de liberar citocinas, proteasas y radicales libres, los cuales en conjunto activan otras células inflamatorias y gliales que conducen a la lesión de neuronas y su muerte [29].

Poco después del efecto mecánico de la LTME, se infiltran monocitos en la médula espinal que se diferencian en macrófagos. La microglía residente y los macrófagos también secretan citocinas proinflamatorias, radicales libres y factores de crecimiento, los cuales a su vez afectan a la células cercanas de forma positiva y negativa [72-74]. Los factores de crecimiento son críticos para la sobrevivencia de las neuronas y para reparar el tejido dañado. Sin embargo, los radicales libres y las citocinas proinflamatorias contribuyen a la expansión de la lesión al incrementar el daño originado por el traumatismo. El rol de los linfocitos en la

LTME es controvertido, pues algunos investigadores argumentan que un tipo de linfocitos (linfocitos T autoreactivos) tienen propiedades destructivas, exacerbando la lesión a los axones e inducen desmielinización, lo que conlleva a la pérdida funcional [75]; mientras que otros argumentan que estos linfocitos no son patológicos, sino que más bien confieren protección a la mielina aislando a las neuronas [76-77] y protegiendo la integridad de los axones que aísla. En resumen, el efecto de exacerbación de un sistema inmune descontrolado sobre la LTME es en gran parte mediado por la inflamación y los radicales libres. Por lo anterior, el sistema inmune podría ser de beneficio si se controla de manera exógena [26].

- **Apoptosis:** Durante la fase aguda, la LTME causa instantáneamente muerte celular por necrosis, un proceso de inflamación y disrupción de la membrana celular, pero en cuestión de horas otro tipo de muerte celular, denominado apoptosis asume el lugar central.

Con la apoptosis, las células no se inflaman antes de morir; más bien se condensan y se rompen en pequeños fragmentos en una vía programada que requiere energía y síntesis de proteínas [29]. Esta vía programada de muerte neuronal se ha implicado en la patobiología de múltiples trastornos neurológicos, incluyendo la LTME [34, 78], donde la cascada apoptótica se activa en neuronas, oligodendrocitos, microglía y tal vez en astrocitos [79-80]. Un disparador importante parece ser la entrada de Ca^{++} en las células después de la LTME [58, 81]. La entrada de Ca^{++} a las células activa enzimas clave como las caspasas y la calpaína que descomponen las proteínas en el interior del citoesqueleto y la membrana celular, lo que conlleva a la muerte celular [82]. La apoptosis de las neuronas motoras corticales puede ocurrir a centímetros de distancia de los axones dañados por la LTME, demasiado lejos para que el Ca^{++} se difunda [83], por lo que se piensa que esto se debe a una variedad de eventos incluyendo la liberación de citoquinas, la respuesta inflamatoria, el daño por los radicales libres y la excitotoxicidad [34, 84].

- **Desmielinización de los axones sobrevivientes:** La desmielinización es la secuela de la muerte de los oligodendrocitos por excitotoxicidad debida al glutamato y exacerbada por una

cascada de eventos que incluyen la apoptosis, la liberación de radicales libres, la respuesta inflamatoria y la presencia de citocinas proinflamatorias. La desmielinización inicia debido a la pérdida de oligodendrocitos que se destruyen en el epicentro de la lesión en las primeras horas después de la LTME y continúa debido a la apoptosis en la sustancia blanca en dirección rostral y caudal durante muchas semanas [85-86]. Estos procesos patológicos son particularmente evidentes en las fases subaguda y crónica de la LTME [29, 87]. Con la pérdida de mielina, los axones están directamente expuestos a los efectos dañinos de los radicales libres y las citocinas proinflamatorias, lo cual conlleva a la pérdida neuronal tanto por necrosis como por apoptosis. La desmielinización provoca retrasos y bloqueo de la conducción [88-89] y debido a que los axones que atraviesan el sitio de lesión son la única conexión restante entre el cerebro y las neuronas espinales caudales, la ineficiente comunicación a través de estos axones se convierte en un problema clínico relevante [88].

- **Cavitación cística y cicatriz glial:** Otro evento que se suma a la insuficiencia para regenerar el tejido medular es la cavitación cística la cual después de días a semanas de la LTME se extiende desde el epicentro de la lesión provocando que sea encerrada por una formación fibrótica o cicatriz glial que separa el tejido lesionado del intacto y funcional [24, 66, 90]. Se cree que el proceso secundario de cavitación está relacionado con la isquemia [90-91], la hemorragia [92-93] o la infiltración de macrófagos y la inflamación [94], ya que se ha demostrado que los procesos inflamatorios conducen a la formación de la cavitación cística y la cicatriz glial en el sistema nervioso central (SNC) [66, 95]. La cicatriz glial formada presenta una acción benéfica al limitar al tejido lesionado e impedir, en cierto modo la expansión del daño [96]. No obstante lo anterior, la cicatriz glial también ejerce una barrera fisicoquímica para el crecimiento axonal. Está formada principalmente por astrocitos reactivos, microglía/macrófagos y moléculas de la matriz extracelular, especialmente proteoglicanos de sulfato de condroitina [97-98]. Por otra parte, en aproximadamente en el 25% de los pacientes con LTME, la cicatriz glial rodea una cavidad quística que progresivamente se expande dando lugar a una condición llamada siringomielia (síndrome genérico que se refiere a la formación de un quiste o cavidad dentro de la médula espinal),

trastorno que conduce a falta funcional adicional por incremento de la presión interna de la médula espinal [99].

- **Plasticidad:** La plasticidad se refiere a la capacidad del SNC para reorganizarse funcionalmente con el fin de adaptarse a un ambiente cambiante o a un cambio en la estructura del mismo [27].

Después de una LTME el proceso de aprendizaje, de adquisición de habilidades y de respuesta se ven comprometidos conduciendo a una reorganización neuronal [100]. Esta reorganización neuronal se lleva a cabo mediante la transformación de su conectividad interna, formando nuevos circuitos neuronales que compensan los perdidos, o bien cambiando los elementos del que está compuesto el sistema incorporando nuevas células, es decir que las células precursoras endógenas proliferan y se diferencian en respuesta a la LTME para compensar, al menos en parte, la función de las células perdidas [27].

La plasticidad no está restringida a las células neuronales y a la formación de nuevos circuitos, sino que también está presente en las alteraciones en la morfología celular, en el destino y propiedades bioquímicas de las células no neuronales y en células precursoras neuronales residentes. Estas respuestas celulares interactúan entre sí y contribuyen en conjunto en la remodelación de tejidos y en la preservación y recuperación de algunas funciones [27].

Así mismo, la plasticidad después de una LTME no sólo se presenta en el sitio de lesión, sino que también algunas regiones del cerebro se ven comprometidas [101-102]. Se ha observado que pacientes con LTME completa muestran varias características anormales de activación cerebral, a tal grado que algunos estudios sugieren pérdida parcial de la función de la corteza motora. En este sentido los eventos cerebrales que normalmente ocurren durante acciones voluntarias están limitados después de la LTME y además contribuyen a la incapacidad para realizar movimientos [10].

Los mecanismos biológicos detrás de la plasticidad son desconocidos, el daño a la barrera hematoencefálica y la respuesta inmune después de una LTME expone al tejido nervioso a altas concentraciones de citocinas y factores de crecimiento que inducen cambios a nivel celular de la médula espinal. Uno de los mecanismos que promueven la plasticidad es la eliminación de la inhibición gabaérgica en la sinapsis excitatoria [103].

El GABA (ácido gamma-aminobutírico) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el cerebro, las neuronas gabaérgicas constituyen del 25-30% de la población neuronal en la corteza motora [104]. Varios estudios han demostrado que la modulación de la inhibición gabaérgica juega un papel importante en la plasticidad cortical [105]. Roy y colaboradores (2011), demostraron que la modulación de circuitos inhibidores intracorticales gabaérgicos está reducida en pacientes con LTME [106], lo cual se relaciona con la plasticidad cortical observada después de una lesión.

Aunque la plasticidad es un mecanismo que pudiese favorecer la recuperación funcional, este proceso podría tardar muchos años o bien no ocurrir debido a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario creando un ambiente adverso que limita la plasticidad, la sobrevida neuronal y la recuperación funcional [107].

1.4 Estrategias para restablecer la función neurológica

En la actualidad no existe un tratamiento para restablecer la función neurológica pérdida después de una LTME, debido a la baja capacidad de regeneración espontánea del SNC y a la dificultad para regular los mecanismos de daño secundario, por lo que se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas experimentales las cuales se dividen en aquellas encaminadas a proteger a las neuronas sobrevivientes después de la LTME (neuroprotección) y aquellas que tienen como objetivo recuperar las células y funciones perdidas (neurorregeneración) [108].

Las estrategias de neuroprotección se encargan principalmente de detener y/o evitar los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan después de una LTME en etapa temprana y cuando los métodos de neuroprotección no son suficientemente efectivos entonces se recurre a estrategias que favorezcan la regeneración nerviosa [108].

Con el fin de proteger el tejido nervioso y promover la regeneración nerviosa después de una LTME, se han trasplantado en el sitio de lesión diferentes células y tejidos, incluyendo células de Schwann [109], nervio periférico [110], tejido fetal [111] y células madre neuronales [112], entre otros. Sin embargo, estos tratamientos han aportado mejoras funcionales modestas debido a la falta de una estructura óptima y bioquímica para guiar, proteger y promover la regeneración de los axones a través de la médula espinal lesionada.

Así mismo, se han empleado diversos materiales poliméricos como puentes neuronales con o sin células, como andamios para el soporte de varios tipos de células para trasplantes, para la liberación de factores tróficos, o la combinación de ambos [113-116].

No obstante el gran esfuerzo realizado para encontrar un tratamiento efectivo a fin de restablecer la función neurológica pérdida después de una LTME, los resultados han demostrado que es necesario aplicar una estrategia terapéutica que combine al menos dos alternativas de tratamiento para mejorar la recuperación funcional. Hasta la fecha, la única estrategia terapéutica aceptada y usada en la clínica, una vez que el paciente está estable, es la rehabilitación física, la cual tiene el objetivo de fortalecer los músculos que todavía están activos y prevenir la espasticidad de los mismos debido a que la rehabilitación física aumenta los niveles de neurotrofinas en los músculos y en la médula espinal e induce y potencia la plasticidad neuronal [8, 117-118].

1.4.1 Rehabilitación física

La recuperación funcional después de una LTME depende de varios factores, incluyendo el nivel y extensión de la lesión, la calidad y oportunidad de la atención médica y quirúrgica y de las estrategias de rehabilitación física aplicadas [8].

Después de un LTME el SNC es capaz de expresar fenómenos de plasticidad espontánea tanto en seres humanos [119-120] como en animales de experimentación [121-124] y las estrategias de rehabilitación pueden favorecer y mejorar esta plasticidad [125-127] en varios niveles:

- **Conductual.** Favorece la recuperación de las funciones sensoriales, motoras o autonómicas.
- **Fisiológica.** Permite la normalización de los reflejos y el fortalecimiento de los potenciales evocados motores.
- **Estructural/Neuroanatómica.** Se caracteriza por el crecimiento axonal, el crecimiento dendrítico y la neurogénesis.
- **Celular.** Favorece la sinaptogénesis y el fortalecimiento sináptico.
- **Molecular.** Está dada por la sobreexpresión de neurotransmisores y factores neurotróficos, así como por alteraciones en la expresión génica.

Las estrategias de rehabilitación, promueven la activación neuronal principalmente por medio de ejercicio pasivo o activo. El ejercicio pasivo se utiliza para inducir los movimientos de las articulaciones y la retroalimentación sensorial con el objetivo de mantener o mejorar la función neuromuscular después de una LTME [8].

El ejercicio pasivo es provisto por medio de bicicletas motorizadas o por asistencia robótica tanto en los laboratorios de investigación como en la práctica clínica. Una ventaja de este enfoque es que para realizar el ejercicio no se requiere de ningún control voluntario y se puede iniciar en etapas tempranas después de la LTME. Se ha demostrado que el ejercicio pasivo por medio de una bicicleta motorizada en ratas [128-130] y en los seres humanos [131-132], favorece la

normalización de la electrofisiología de las neuronas motoras, activa el reflejo H, disminuye la espasticidad y genera cambios en la morfología dendrítica [133].

El ejercicio activo es aquel que utiliza movimientos voluntarios activos, ya sea con asistencia o no. En personas con LTME incluye un entrenamiento locomotor por medio de una caminadora con soporte del peso corporal con asistencia manual o robótica. El ejercicio activo no sólo influye sobre el movimiento de las articulaciones sino que también activa funcionalmente los músculos y los múltiples modos de estimulación aferente [8].

El entrenamiento locomotor en una caminadora con soporte del peso corporal en animales ha demostrado que favorece la recuperación funcional [127, 134-135], la sensibilidad [136] y la retroalimentación sensorial [137-138], disminuye la expresión de moléculas inhibitorias [139] y aumenta la expresión de factores neurotróficos [136]. Así mismo se ha demostrado que el entrenamiento locomotor sobre una caminadora sin soporte del peso corporal, en el cual el animal soporta el 100% de su peso favorece significativamente la recuperación de la función motora [140].

En los seres humano el entrenamiento repetitivo sobre una caminadora con soporte del peso corporal promueve la plasticidad cortical [141-144] mejorando la transmisión corticoespinal de los músculos de las extremidades inferiores, lo cual se ve reflejado en una mejoría en la función locomotora [145-146]. Es posible que la actividad generada por el entrenamiento promueva la reorganización de la corteza motora, de tal manera que las motoneuronas corticales aprendan a controlar los músculos adicionales y produzcan movimientos novedosos cuando se estimulan [147].

1.4.2 Materiales poliméricos como tratamiento después de una LTME

En las últimas décadas se han desarrollado diversos materiales poliméricos naturales y sintéticos para la creación de implantes que tienen un alto potencial como tratamiento después de una LTME. Entre los polímeros naturales utilizados como andamios después de una LTME en ratas están incluidos el alginato, el cual ha demostrado que reduce la astrocitosis y mejora la regeneración axonal [148], la agarosa, la cual se integra bien al tejido y soporta el crecimiento axonal lineal a través del implante [149-150]; y los andamios acelulares sembrados con células estromales de la médula ósea, los cuales, reducen la muerte por apoptosis del tejido nervioso dañado y favorecen la recuperación funcional en un modelo de hemisección o lesión parcial de la médula espinal [151]. Los polímeros sintéticos utilizados en la LTME hasta el momento han sido el poli(2-hidroxietil metacrilato) o poli(2-hidroxietil metacrilato)-co-metil metacrilato (PHEMA/PHEMA-MMA), el cual incrementa la angiogénesis y la regeneración axonal [152-153]; el poli[N-(2-hidroxi)propil] metacrilamida] (PHPMA), el cual induce la mielinización de los axones y reduce la astrocitosis y la formación de la cicatriz glial [154]; y el polipirrol (PPy), al cual nuestro grupo de investigación le ha descrito un efecto neuroprotector mediante el aumento de la cantidad de tejido preservado de la médula espinal y una mejor recuperación funcional [155-157].

Recientemente, polímeros con propiedades conductoras intrínsecas han ganado relevancia como materiales inteligentes en aplicaciones biológicas [158-159]. Estos polímeros poseen las propiedades físicas y químicas de los polímeros orgánicos y las propiedades eléctricas de los metales [160]. Además estos materiales tienen la capacidad de unirse a diversas sustancias químicas (dopantes) que modifican las propiedades fisicoquímicas de los polímeros. Así mismo, estos materiales han sido desarrollados con la capacidad de soportar y modular el crecimiento de diversos tipos de células que los hace adecuados para aplicaciones biológicas y biomédicas [161]. Entre los polímeros más estudiados por su biocompatibilidad y sus propiedades electroconductoras se encuentra el PPy.

1.5 Polipirrol (PPy)

1.5.1 Aplicaciones biológicas y biomédicas

El PPy es un polímero conjugado derivado del pirrol, no fácil de sintetizar, térmicamente estable y con una alta conductividad en comparación con otros polímeros conductores [162]. El PPy se ha utilizado como biosensor para medir el colesterol [163], la glucosa en sangre [164], grupos sanguíneos, anticuerpos [165] y vapores de disolventes orgánicos [166]. También se ha utilizado para el recubrimiento de sondas neuronales [167], en dispositivos para la liberación de drogas y biomoléculas [168] y en músculos artificiales [169]. Además de ser biocompatible [170], su citocompatibilidad ha sido demostrada usando fibroblastos de ratón L929 y células de neuroblastoma Neuro2a [171].

Aunado a lo anterior, el PPy se ha sido utilizado *in vitro* como soporte para la adhesión y crecimiento de diferentes tipos de células [159, 172-180] e *in vivo* como guía para la regeneración del nervio ciático en ratas [170, 176] y por nuestro grupo de investigación para promover la neuroprotección y la recuperación de las funciones motoras y sensitivas en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas [155-157].

1.5.2 Síntesis

El PPy y derivados se sintetizan por métodos químicos y electroquímicos convencionales [181-183]. No obstante lo anterior, también es posible sintetizarlos por el método de plasma, con lo que el producto presenta importantes diferencias respecto a los productos obtenidos mediante los métodos convencionales [184]. La síntesis de polímeros por método químico consiste en la oxidación de un monómero con una molécula cuyo potencial corresponde al potencial de oxidación del monómero, formando un precipitado del polímero. El método electroquímico es

análogo a lo oxidación química, se genera una película de polímero sobre un sustrato metálico en una celda electroquímica que contiene el monómero, el solvente y la molécula dopante, la polimerización ocurre por oxidación a través de una corriente eléctrica. La síntesis electroquímica permite controlar diversos parámetros como la corriente eléctrica, las concentraciones, los electrodos, la temperatura, entre otros, por lo que es posible controlar las propiedades del polímero durante la síntesis [180] lo cual lo hace reproducible [185].

La polimerización por plasma es un método que consiste en la formación de polímeros bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado (plasma) [186]. El proceso de polimerización por plasma se lleva a cabo bajo condiciones de vacío en una cámara de reacción donde se introduce el monómero y el dopante en fase gaseosa los cuales se ionizan por la influencia de un campo eléctrico formando plasmas con el monómero y el dopante [187]. Los electrones de alta energía que se encuentran a lo largo del campo eléctrico colisionan con las moléculas del monómero generando diversas partículas altamente reactivas como iones, electrones, fragmentos moleculares y atómicos excitados, radicales, entre otras [188]. Las partículas ionizadas del monómero y dopante reaccionan entre si y al interaccionar con la superficie de un sustrato lo recubren depositando una película delgada de material polimérico [184].

1.6 Polimerización por plasma

Un plasma es un gas ionizado compuesto de una serie de partículas altamente reactivas: iones, electrones, fragmentos moleculares y atómicos excitados, radicales, etc. [188]. Es un estado de la materia que surge de la ionización de átomos y moléculas de un gas, puede ser creado en el laboratorio al exponer las moléculas de un gas a campos eléctricos, energía calorífica alta, o radiación de alta energía [186, 189]. En este estado el ambiente químico es muy reactivo por lo cual se producen muchas reacciones químicas. La alta densidad de especies ionizadas y excitadas en el plasma puede cambiar las propiedades superficiales de los materiales normalmente inertes, lo cual ha sido de gran interés en el área biomédica [190].

La polimerización por plasma es un método que consiste en la formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado. La ionización de los átomos del gas se inicia cuando un campo eléctrico impuesto genera un incremento en los niveles de energía de las partículas provocando colisiones entre los átomos que eventualmente desprenden electrones los cuales participan en las siguientes colisiones con otras moléculas. La transferencia de energía a las moléculas del gas conduce a la formación de una serie de especies químicamente reactivas, algunas de las cuales se convierten en precursoras de la reacción de polimerización por plasma [186].

Aunque en la polimerización por plasma, la secuencia de las reacciones no son claras debido a la complejidad del proceso de polimerización, las condiciones de síntesis como: frecuencia, presión, potencia, voltaje, temperatura en el reactor, flujo del monómero y dopante son controlables, por lo que los materiales obtenidos por este método son reproducibles. [191].

Las ventajas de los materiales obtenidos por polimerización por plasma en comparación con los obtenidos por métodos químico y electroquímico convencionales son las siguientes:

- La polimerización ocurre a partir de partículas de alta energía en fase gaseosa y campos eléctricos en lugar de agentes químicos (iniciadores, aceleradores o disolventes) los cuales pueden ser peligrosos o tóxicos [187, 192-193] por lo que deben ser cuidadosamente removidos de los polímeros antes de aplicarse en algún sistema biológico para evitar efectos no deseables en el sistema al que serían aplicados.
- El polímero obtenido por plasma no tiene una estructura con una unidad de repetición regular como en los métodos químicos y electroquímicos, sino una estructura tridimensional y entrecruzada [184, 190, 194-195] por lo que las propiedades físicas y químicas son diferentes a los otros polímeros aunque deriven de la mismas moléculas de partida [190].

- Por su estructura los polímeros sintetizados por plasma son químicamente inertes, insolubles, mecánicamente resistentes y térmicamente estables [185, 194].
- La formación de los polímeros por plasma ocurre en fase gaseosa lo cual permite sintetizar polímeros sobre cualquier superficie expuesta al plasma en forma de películas delgadas fuertemente adheridas a las superficies y libres de poros convirtiéndolo en un método efectivo para la modificación y recubrimiento de superficies aun y cuando sean de forma compleja [190].
- El tratamiento de superficies por polimerización por plasma es una técnica eficaz y económica. Además permite mejorar la funcionalidad de los materiales modificando su superficie. Los materiales existentes se pueden seguir utilizando sin la necesidad desarrollar nuevos materiales ahorrando tiempo para el desarrollo de nuevos dispositivos biomédicos [190].

Debido a estas propiedades sobresalientes de los materiales o dispositivos fabricados o tratados por el método de plasma en los últimos años se han utilizado en una gran variedad de aplicaciones biomédicas tales como el tratamiento de superficies para mejor adhesión y crecimiento de diversos tipos de células [180, 196-200], para la liberación de fármacos [201-205], para la inmovilización de biomoléculas [206-209] o para prevenir la adhesión bacteriana [210], en andamios para su uso en ingeniería de tejidos [205-206, 210-214], en injertos vasculares [215-216], stents [217], catéteres [218], válvulas cardíacas [219], lentes intraoculares [220-221], biosensores [222-226] e implantes [155-157, 201, 204, 227-232].

Otro campo importante de la aplicación del método de plasma es para la esterilización o biodescontaminación de materiales y dispositivos para fines médicos. La sustitución de vidrio y acero en dispositivos de uso médico por materiales poliméricos ha dado lugar al uso de procedimientos de esterilización que ya no se basen en tratamientos térmicos [191]. En varios estudios, se ha demostrado que el método de plasma de baja presión puede inactivar o eliminar

microorganismos y virus, así como otras materias orgánicas como proteínas, pirógenos o priones [232-236].

1.7 Implantes derivados del pirrol sintetizados por diferentes métodos en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas.

Aunque el PPy ha demostrado ser un material con un gran potencial en diversas aplicaciones biológicas y biomédicas por sus propiedades eléctricas, biocompatibilidad y bioestabilidad, las diferencias en la estructura química y física de los materiales al ser obtenidos por diferentes métodos de síntesis podrían presentar variaciones en su efecto al ser aplicado en un medio biológico.

En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación, estudió el efecto de diferentes implantes derivados del pirrol; polipirrol (PPy) obtenido por síntesis química (uno adquirido en el laboratorio y otro adquirido de Sigma Aldrich) y otro por polimerización por plasma, también se sintetizó el copolímero polipirrol/polietilenglicol (PPy/PEG) por método electroquímico, así como por polimerización por plasma. Se comparó su estructura química, su integración al tejido nervioso, la respuesta inflamatoria que producían en el tejido huésped y su efecto sobre la recuperación funcional en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas (Anexo 1 y 2).

Los resultados mostraron que los implantes obtenidos por síntesis química tuvieron una estructura química similar. Los implantes no se integraron al tejido nervioso observándose una gran cantidad de tejido destruido y células inflamatorias alrededor de los implantes. Aunque los animales mostraron cierta recuperación funcional al principio del estudio, dicha recuperación decayó al paso del tiempo. Aunado a lo anterior, la sobrevivencia de los animales que recibieron este tipo de implante fue baja.

En contraste con lo anterior, los animales implantados con PPy sintetizado por plasma, mostraron una favorable integración al tejido nervioso, poca destrucción del mismo y una recuperación funcional significativa al compararlos con los animales implantados con materiales obtenidos por síntesis química y con los animales pertenecientes al grupo Control (lesionados, sin tratamiento).

Aunque ambos implantes del copolímero PPy/PEG sintetizados tanto por plasma como electroquímicamente, se integraron bien al tejido nervioso, la recuperación funcional fue diferente, debido a que los animales que recibieron implantes de PPy/PEG sintetizados por plasma mostraron una mejor recuperación motora, con respecto a los animales pertenecientes al grupo Control y aquellos que recibieron implantes obtenidos electroquímicamente.

Los resultados mostraron diferencia significativa en los efectos sobre la recuperación funcional y sobre la integración de los implantes al tejido nervioso dependiente del método de síntesis de los distintos implantes. Más aun, aunque los polímeros tenían las mismas moléculas de origen, el análisis de IR mostró que el método de síntesis afecta la estructura química del material. Wang y colaboradores (2004), demostraron que la estructura química de PPy y del politiofeno sintetizado por plasma son diferentes a los sintetizados químicamente, ya que los materiales obtenidos por plasma son altamente entrecruzados y ramificados [237], por lo que no tienen una estructura con una unidad de repetición regular como con los métodos químicos y electroquímicos convencionales, sino que una estructura tridimensional [184, 190, 194-195], característica que favorece su aplicación en el campo de cultivos celulares. Así mismo, se pudo observar en los espectros de IR que los materiales sintetizados por plasma presentan picos predominantes en la zona de absorción correspondiente a los grupos amina. Las superficies ricas en aminas favorecen la adsorción de proteínas y la adhesión celular, ya que proveen sitios para la inmovilización de biomoléculas [238]. En la literatura se encuentran reportes de que el PPy sintetizado por plasma crea una capa superficial rica en grupos amina [155, 239-240]. Además, los polímeros sintetizados por plasma son insolubles, mecánicamente resistentes, térmicamente estables y químicamente inertes [185, 194], características que los hacen más deseables como implantes en un sistema biológico.

El efecto benéfico de los implantes sintetizados por polimerización por plasma puede deberse directamente a la estructura fisicoquímica que le da el método de síntesis a los materiales, principalmente a la presencia grupos funcionales metil-, hidroxilo, amino y carboxilo, los cuales también se encuentran en superficies biológicas naturales, lo cual favoreció su estadía al ser implantados en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas.

2. Justificación

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz para la LTME, patología que puede causar paraplejia o tetraplejia. Esto se debe a la baja capacidad de regeneración espontanea del sistema nervioso y a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario. Debido a esto, más de una estrategia terapéutica podría ser necesaria para recuperar las funciones perdidas después de una LTME.

La única estrategia terapéutica aceptada y usada en el ámbito clínico es la rehabilitación física, la cual a pesar de demostrar efectos benéficos sobre la recuperación funcional, dicha recuperación es limitada. Además, el inicio del tratamiento se aplica mucho tiempo después de la lesión primaria, una vez que el paciente fue diagnosticado y está estable. Para incrementar los efectos benéficos de la rehabilitación física, se requiere combinar con otra estrategia terapéutica que se pueda aplicar antes de la rehabilitación física y que favorezca la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional, con el fin de alcanzar un mejor resultado.

En estudios previos, realizados en nuestro grupo de investigación [155-157] se ha demostrado que los polímeros derivados del pirrol: PPy, PPy/I y PPy/PEG, sintetizados y dopados por plasma tienen una buena compatibilidad después de ser implantados en la médula espinal de rata en un modelo de lesión por sección completa, reducen la respuesta inflamatoria, promueven la protección del tejido nervioso, incrementan el impulso de potenciales evocados somatosensoriales y la recuperación funcional en comparación a los animales Control (lesionados sin tratamiento). Cabe destacar que los mejores resultados se obtuvieron con los implantes de PPy/I.

No obstante los prometedores resultados de los implantes derivados del pirrol obtenidos por el método de plasma. En la clínica, una lesión en la médula espinal rara vez resulta en una sección completa y el tratamiento no se podría aplicar por medio de un implante en forma de pastilla, ni

inmediatamente después de la lesión. Para acercarse a los casos clínicos, en el presente trabajo se propone que el tratamiento de PPy/I pueda administrarse por medio de una inyección para evitar un mayor daño a la médula espinal y 48 horas después de la lesión primaria, una vez que el edema causado por el traumatismo haya disminuido. También se propone el tratamiento combinado de implantes de PPy/I con rehabilitación física sobre una caminadora para promover una mejor recuperación funcional en comparación al uso de estas dos estrategias por separado.

3. Hipótesis

Si el PPy/I favorece la neuroprotección y la recuperación funcional y si la rehabilitación física usando una caminadora favorecen los procesos de plasticidad y la recuperación funcional después de un modelo de lesión por contusión moderada de la médula espinal en ratas, entonces la combinación de estas estrategias terapéuticas, podrían potenciar su efecto benéfico en comparación a su uso por separado.

4. Objetivos

4.1 General

- Evaluar el efecto de un implante de polímero semiconductor sintetizado por plasma en combinación con rehabilitación física para restablecer la función motora después de una lesión traumática de la médula espinal.

4.1.2 Particulares

- Determinar el tipo de partícula, morfología y volumen del implante de PPy/I para un modelo de lesión por contusión moderada de la médula espinal de ratas.
- Evaluar el efecto del PPy/I en un modelo de lesión por contusión moderada de la médula espinal de ratas sobre la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional.
- Evaluar el efecto de rehabilitación física usando una caminadora en un modelo de lesión por contusión moderada de la médula espinal de ratas sobre la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional.
- Evaluar el tratamiento combinado de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora sobre la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional en comparación al uso de los tratamientos por separado.

5. Material y métodos

5.1 Obtención de nanopartículas de PPy/I

Nanopartículas de PPy/I fueron sintetizadas por el método de polimerización por plasma en un reactor tubular de vidrio (Pryex) de 25 cm de longitud y 9 cm de diámetro. Cada extremo del tubo se selló con una tapa de acero inoxidable. Cada tapa tiene tres puertos de acceso, el puerto ubicado en la parte central de la tapa es para insertar un electrodo de acero inoxidable, que están formados por una varilla circular y una placa circular plana de 6.5 cm de diámetro. El monómero y el dopante, pirrol (Aldrich, 98%) y yodo (Aldrich, 99.8%), respectivamente, se depositaron en recipientes separados y se conectaron al reactor por los puertos de acceso laterales. El proceso inició reduciendo la presión en el reactor a 0.1 mbar, las descargas eléctricas se iniciaron en el aire con un generador de potencia Advanced Energy RFX-600 con resistencia de acoplamiento a 13.56 MHz aplicando una potencia de 40 W. Un electrodo se conectó al puerto RF del generador y el otro electrodo se conectó a tierra, la separación entre los electrodos fue de 7 cm (Figura 5). Una vez iniciadas las descargas eléctricas con el aire residual, los recipientes con el monómero y dopante se abrieron para dejar que sus vapores se mezclaran libremente en el interior del reactor. Las descargas excitaban los gases formando plasmas de ambos componentes, los cuales, se combinaron químicamente para formar partículas de PPy con yodo. El tiempo de síntesis fue de 240 min.

Terminada la síntesis se obtuvieron partículas esféricas homogéneas de PPy/I de tamaño nanométrico, denominadas en este trabajo como nanopartículas. El polvo se recolectó del reactor con un pequeño cepillo.

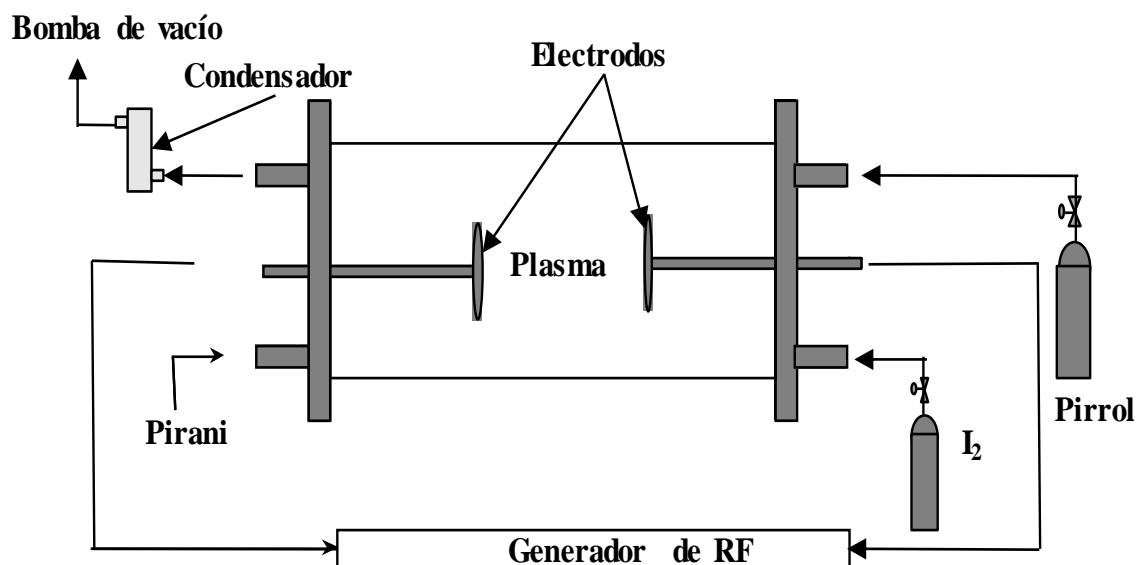


Figura 5. Diagrama de reactor de polimerización por plasma.

5.2 Obtención de mesopartículas de PPy/I

Películas delgadas de polipirrol dopadas con yodo (PPy/I) fueron sintetizadas por el método de polimerización por plasma en un reactor tubular de vidrio (pirex) de 9 cm de diámetro y 25 cm de longitud, con dos electrodos planos de acero inoxidable de 7 cm de diámetro y separación entre ellos de 7 cm. Un electrodo se conectó a tierra y el otro a la señal de RF de 13.5 MHz de un generador de potencia Advanced Energy RFX-600 con resistencia de acoplamiento. La presión en el reactor se mantuvo en el intervalo de 10^{-1} mbar con tiempo de síntesis de 240 min y potencia de 80 W. En estas condiciones, se iniciaron descargas eléctricas con el aire residual y posteriormente se introdujo el pirrol (Aldrich, 98%) y yodo (Aldrich, 99.8%) formando plasmas de ambos componentes. No se usaron gases portadores u otros reactivos químicos durante la síntesis. Ambos, monómero y dopante se vaporizaron y entraron al reactor a través de puertos separados y se mezclaron en su interior. Las descargas promovieron simultáneamente la polimerización y dopaje produciendo películas delgadas de PPy/I adheridas a las paredes internas del reactor.

Las películas se hincharon con acetona y se lavaron con agua destilada, posteriormente se retiraron de las paredes del reactor con una espátula delgada. Las películas se secaron y pulverizaron manualmente en un mortero de ágata durante 10 min obteniendo partículas de diferente tamaño y geometría denominadas en este trabajo como mesopartículas.

5.3 Caracterización de las partículas

Para caracterizar las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I se realizó espectroscopía infrarrojo (IR), microscopía electrónica de barrido con análisis elemental y análisis de la distribución de tamaño de partícula. Estas técnicas se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

5.3.1 Espectroscopía IR

El análisis de composición de los materiales se realizó en un espectrofotómetro Nicolette 550, muestreando directamente sobre el polvo de nanopartículas o mesopartículas, usando 32 escaneos con un intervalo de longitud de onda de 400-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

Después de obtener el espectro IR de las nanopartículas y de las mesopartículas de PPy/I, se identificaron los picos predominantes en la estructura y se asociaron a una región de absorción, para determinar los grupos funcionales presentes en los materiales.

5.3.2 Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental

Las características morfológicas de las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JMS 5900LV usando un voltaje de aceleración de 20 kV. El microscopio fue acoplado a una sonda de dispersión de energía EDS Oxford INCA-

XACT, para el análisis elemental. Las imágenes fueron procesadas con el programa Olympus Measure IT.

5.3.3 Distribución de tamaño de partícula

Para realizar el análisis de distribución de tamaño de partícula se tomaron imágenes de microscopía por escaneo electrónico de muestras separadas de polvo de nanopartículas y mesopartículas de PPy/I, las muestras fueron aproximadamente de 400 partículas y se aplicó la ecuación 1 usando el tamaño de partícula más representativo de las micrografías analizadas. La media armónica corresponde al valor máximo de $f(\Phi)$ en el PPy/I [241].

$$f(\Phi) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\Phi-\mu}{\sigma}\right)^2} \dots\dots\dots (1)$$

Dónde: $f(\Phi)$ es una distribución normal, Φ es el tamaño de partícula, μ es la media armónica, σ la desviación estándar.

Para medir el tamaño de partícula en el caso de las nanopartículas se calculó midiendo el diámetro y en el caso de las mesopartículas se analizó midiendo la dimensión más grande de cada partícula.

5.4 Fabricación de los implantes

La preparación de los implantes se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Una vez caracterizados los materiales, se pesaron 5 mg de nanopartículas o de mesopartículas de PPy/I y se les adicionó 1 mL de solución salina (solución fisiológica, 0.9 % cloruro de sodio) en viales de 5 mL, los cuales, se colocaron en un agitador ultrasónico durante 30 min para disgregar los aglomerados. Finalmente los viales fueron esterilizados en autoclave y se obtuvieron las

siguientes suspensiones:

- **NPs** → Nanopartículas de PPy/I suspendidas en solución salina a una concentración de 5mg/mL.
- **MPs**→ Mesopartículas de PPy/I suspendidas en solución salina a una concentración de 5mg/mL.

5.5 Grupos experimentales

Acorde a los lineamientos establecidos la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [242] y al dictamen otorgado por el Comité Local de Investigación en Salud 3601 (Anexo 4). Se desarrolló el siguiente modelo experimental:

Cuarenta y cinco ratas hembras de la cepa Long Evans de entre ocho y nueve semanas de edad, con peso corporal de entre 220 a 260 g, sanas y sin ningún procedimiento experimental previo, fueron sometidas a una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) a nivel torácico nueve (T9) y se dividieron en nueve grupos experimentales.

- **Control:** Animales con LPCMME (n=8),
- **SS (vehículo):** Animales con LPCMME más solución salina a un volumen de 30 μ L (n=5),
- **NPs₆₀:** Animales con LPCMME más NPs a un volumen de 60 μ L (n=3),
- **MPs₁₀:** Animales con LPCMME más MPs a un volumen de 10 μ L (n=3),
- **MPs₃₀:** Animales con LPCMME más MPs a un volumen de 30 μ L (n=8),
- **MPs₆₀:** Animales con LPCMME más MPs a un volumen de 60 μ L (n=3),
- **Control-RF:** Animales con LPCMME más rehabilitación física (n=5),
- **SS-RF:** Animales con LPCMME más solución salina a un volumen de 30 μ L en combinación con rehabilitación física (n=5).
- **MPs₃₀-RF:** Animales con LPCMME más MPs a un volumen de 30 μ L en combinación con rehabilitación física (n=5).

5.6 Procedimientos quirúrgicos

Todos los procedimientos quirúrgicos realizados en este trabajo de investigación se llevaron a cabo en las instalaciones del Proyecto Camina A.C.

5.6.1 Anestesia

Antes de cada procedimiento quirúrgico, los animales se anestesiaron vía intramuscular con una mezcla de ketamina (77.5mg/kg de peso corporal) e hidrocloreuro de xilacina (12.5 mg/kg de peso corporal).

5.6.2 Lesión por contusión moderada de la médula espinal

Una vez anestesiados los animales y en condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó una incisión longitudinal sobre la piel en la zona media de la espalda, se disecó el tejido conectivo y los músculos paravertebrales para dejar expuestas las apófisis espinosas de los niveles torácicos 8, 9 y 10 (T8, T9 y T10). Con una gubia se extirpo la apófisis espinosa T9 y parte de T8, y con unas pinzas finas se retiraron cuidadosamente las laminillas torácicas dejando expuesto el tejido de la médula espinal y entonces una LPCMME fue producida por un equipo New York University Spinal Cord Impactor (NYU impactor). La lesión se produjo dejando caer un cilindro metálico de 10 g de peso a una altura de 25 mm (25 g/cm), directamente sobre la médula espinal. Por medio del software del equipo New York impactor se pudo conocer la altura, velocidad, tiempo y deformación de la médula espinal al momento del impacto; sólo los animales lesionados con un error menor o igual al 5 % fueron incluidos en el estudio para hacerlo altamente reproducible. Al final de la LPCMME los músculos paravertebrales y piel fueron suturados.

Al término de la cirugía, los animales recibieron vía intramuscular 200 µL de penicilina benzatínica (1, 200,000 U.I.) en una sola dosis y como analgésico paracetamol disuelto en el agua de bebida (0.31ml/62.5ml) por un periodo de tres días. Los animales fueron colocados en una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños (Schoer Manufacturing CO., Kansas City, MO, USA), hasta que se recuperaron de la anestesia, y ya recuperados, se colocaron en jaulas individuales de acrílico con aserrín estéril y fueron alimentados e hidratados a libre demanda hasta el término del estudio.

5.6.3 Colocación del implante

Transcurridas 48 h después de la LPCMME los animales fueron anestesiados y en condiciones de asepsia y antisepsia se removieron las suturas para dejar expuesto el sitio de lesión en la médula espinal. Posteriormente a los animales se les administró aleatoriamente solución salina, NPs o MPs (previa agitación mecánica con un mezclador vórtice durante 20 s) directamente en el epicentro de la lesión utilizando una jeringa Hamilton orientando el bisel de la aguja lateralmente. Los animales Control no recibieron ningún implante. Finalmente se procedió a suturar los músculos paravertebrales y la piel y recibieron los cuidados post-operatorios pertinentes.

5.7 Rehabilitación física

El tratamiento de rehabilitación física se llevó a cabo en las instalaciones del Proyecto Camina A.C. en una caminadora comercial modelo pawwws pet treadmill 42 inch a la cual se le adaptaron varios carriles (Figura 6). La rehabilitación se realizó en posición cuadrúpeda, sin ayuda de soporte del peso corporal. La terapia se inició a partir del sexto día después de la LPCMME, veinte minutos diarios, cinco días a la semana por un periodo de ocho semanas. La velocidad de la caminadora se mantuvo en un rango entre 13.9 a 16.7 cm/s.



Figura 6. Caminadora comercial modelo pawwws pet treadmill 42 inch con adaptación de carriles.

5.8 Evaluación funcional

La evaluación funcional del tren posterior de los animales se llevó a cabo en las instalaciones del Proyecto Camina A.C., utilizando la escala Basso, Beattie y Bresnahan o BBB [243], la cual evalúa la función motora en base en el movimiento de las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo de cada pata. La escala consta de 22 puntos de recuperación motora, donde 0 representa la ausencia de movimiento y 21 una marcha normal (Anexo 5).

La prueba se aplicó durante cinco minutos en un campo abierto por dos observadores cegados al tratamiento que recibió cada animal. La primera evaluación se realizó 24 h después de la LPCMME con el objetivo de corroborar la parálisis de las patas traseras de los animales incluidos en el estudio y posteriormente una vez por semana durante 9 semanas

5.9 Análisis histológico y morfométrico

Nueve semanas después de la LPCMME, todos los animales fueron anestesiados como se describió en el apartado 5.6.1 seguida de una administración intraperitoneal de 0.2 mL de heparina. Con los animales en plano anestésico profundo, se realizó una toracotomía amplia para canular la aorta ascendente y perfundir vía intracardiaca con una bomba peristáltica con 200 mL de solución salina fría, seguida de 400 mL de paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos. Ambas soluciones se transfundieron a una velocidad de 30 mL/min. Al término de la perfusión se extrajeron 2 cm de médula espinal incluyendo el epicentro de la lesión, 1 cm en dirección caudal y 1 cm en dirección cefálica y se colocó en el mismo fijador para posfijar durante siete días.

Posteriormente, la médula espinal se deshidrató en alcoholes en forma gradual: alcohol etílico al 50 %, 80 %, 95 % y alcohol absoluto (30 min en cada uno), después se aclaró con 2 baños de xileno (30 min en cada uno) y se incluyó en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 10 μm de espesor con un microtomo y se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0.5 g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron en laminillas de vidrio para ser teñidos con hematoxilina y eosina de Harrys (Anexo 6) para realizar análisis histológicos y morfométricos.

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de luz y digitalizadas en una computadora equipada con el software IM 500 y una cámara digital CCD-IRIS Sony. La evaluación morfométrica se realizó con el software Image Database V.4.01 (Leica). El tejido preservado fue medido en un corte por rata sobre un área de 25.07 mm^2 que contenía el epicentro de la lesión y tomando como referencia el canal endimario. El sacrificio de los animales se llevó a cabo en las instalaciones de Proyecto Camina A. C., el procesamiento de las muestras histológicas se realizó en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y el análisis histológico y morfométrico en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

5.10 Análisis estadístico

A todos los datos obtenidos al aplicar la escala BBB y de las medición de tejido preservado se les realizó una prueba de estadística descriptiva, así como la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para determinar si se utilizaba una estadística paramétrica o no paramétrica. Posteriormente, para analizar los datos de las evaluaciones funcionales con la escala BBB se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas seguida por la prueba de Dunnett y los resultados obtenidos de la medición de tejido preservado fueron analizando utilizando la prueba Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Whitney. Las diferencias estadísticas fueron consideradas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados con el software SPSS 16.0.

6. Resultados

6.1 Caracterización de las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I

6.1.1 Morfología

La figura 7 muestra la morfología de las nanopartículas de PPy/I utilizadas como implante. En la figura 7 (a), (b) y (c) se muestran las micrografías de las nanopartículas con amplificación de 50,000, 40,000 y 30,000 X respectivamente. De forma general se puede observar que las partículas son de forma esférica y superficie lisa con tendencia a formar aglomerados. Los valores del diámetro de las nanopartículas están en el intervalo de 40 a 200 nm con valor promedio de 91.5 nm (Figura 7-d).

La figura 8 (a), (b) y (c) muestra diferentes aspectos de la morfología de las mesopartículas de PPy/I a la misma amplificación, 1000 X, se puede observar que las partículas presentan superficie ligeramente rugosa con diferente tamaño y geometría irregular con tendencia a formar aglomerados con otras partículas vecinas de dimensiones menores. Debido a su geometría irregular, se analizó el tamaño de las partículas (ver apartado 5.3.3) midiendo la dimensión más grande de cada partícula. La distribución de tamaño normal de las mesopartículas se encontró en el intervalo de 0.6 a 25.9 μ m, con un tamaño promedio de 4.2 μ m (Figura 8-d).

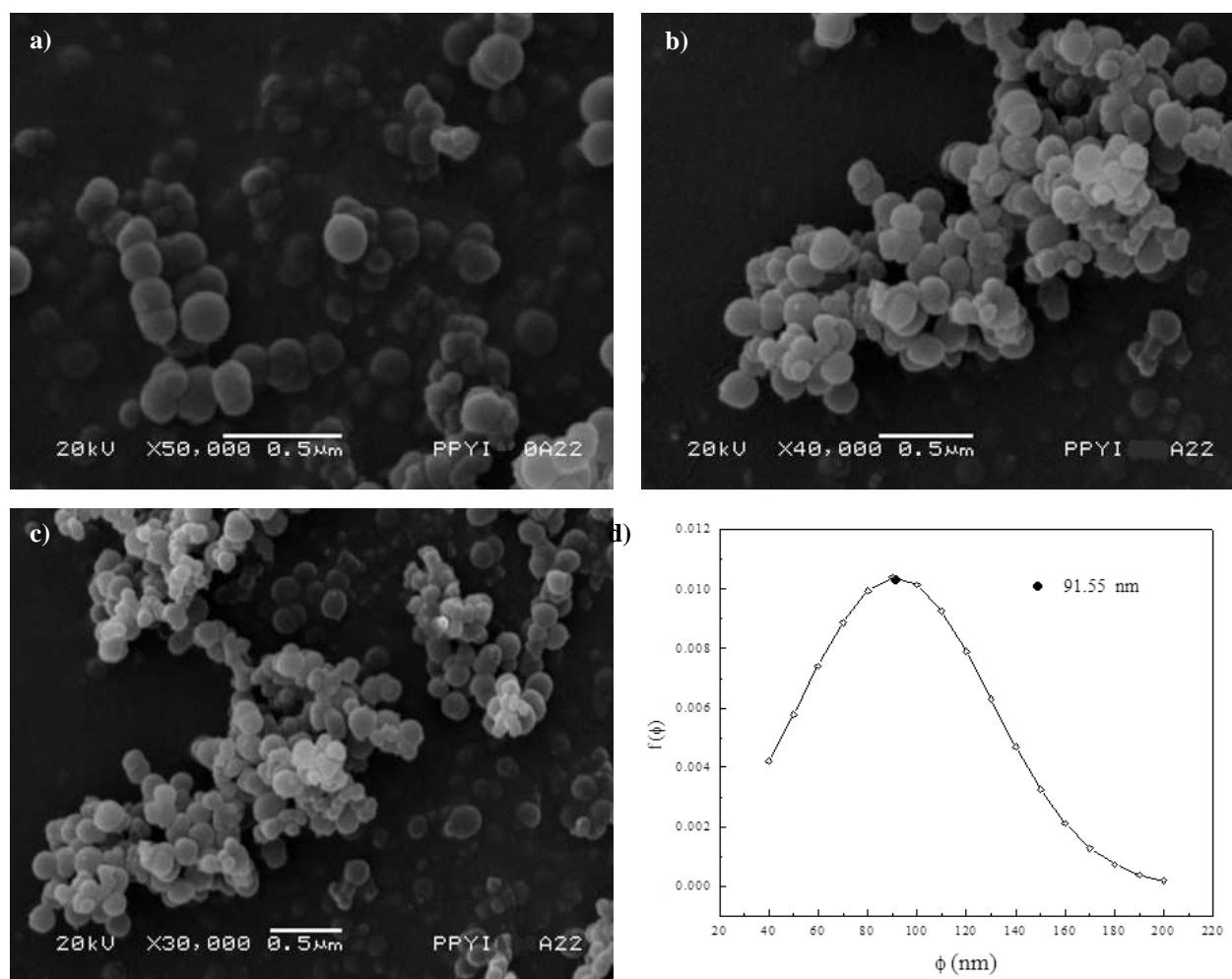


Figura 7. Morfología de nanopartículas de PPy/I, (a), (b) y (c). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de PPy/I sintetizadas por el método de plasma. Barra de calibración 0.5 μm. (d) Distribución de tamaño.

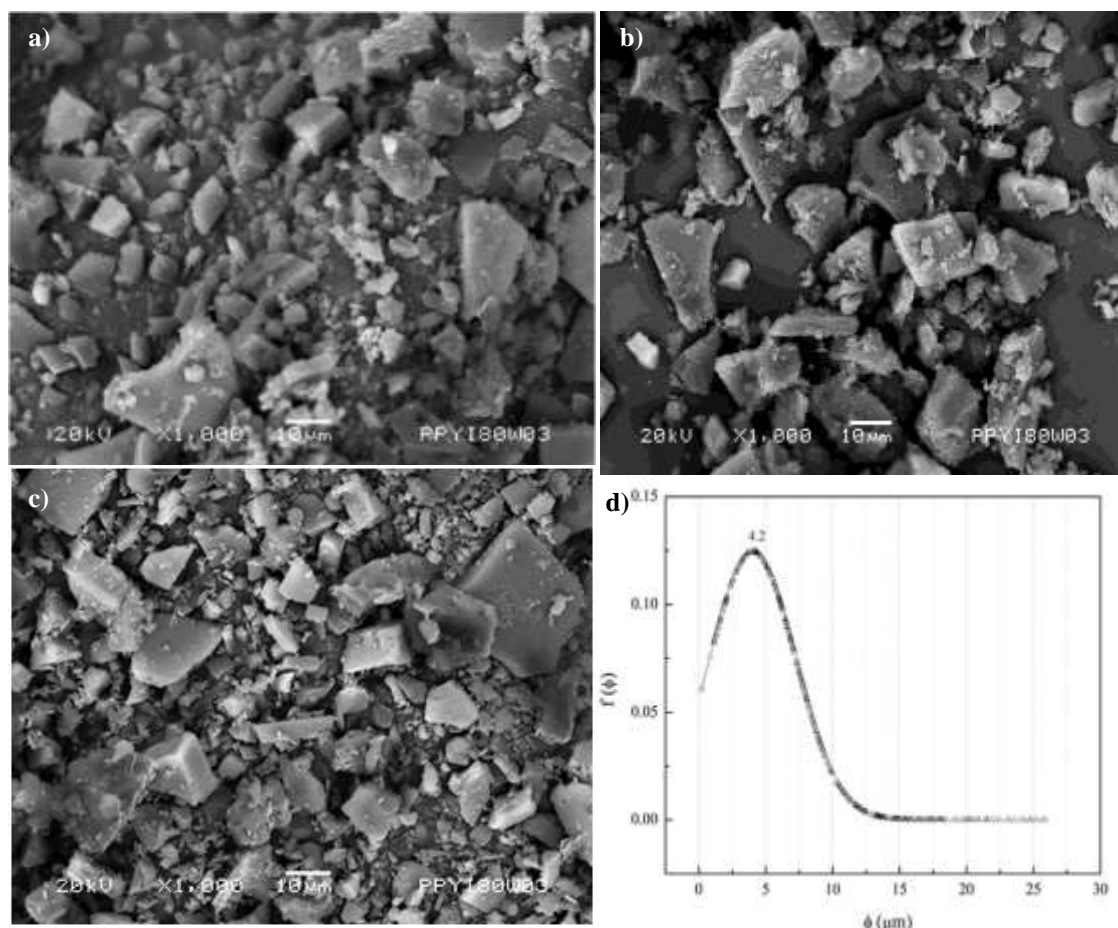


Figura 8. Morfología de mesopartículas de PPy/I, (a), (b) y (c). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las películas de PPy/I molidas (mesopartículas) sintetizadas por el método de plasma. Barra de calibración 10 μm . (d) Distribución de tamaño.

6.1.2 Espectroscopía IR

Los espectros IR de las nanopartículas (Figura 9-a)) y mesopartículas (Figura 9-b) de PPy/I presentan estructura similar, lo cual sugiere que prevalece la misma estructura química en ambos polímeros, con absorciones centradas en 3430 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 2220 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1435 cm^{-1} y 604 cm^{-1} .

La absorción más significativa se encuentra en 3430 cm^{-1} la cual corresponde a diferentes vibraciones de grupos N-H primarios y secundarios de los enlaces del pirrol [239-240] y O-H

debido a la oxidación con la interacción atmosférica. La absorción centrada en 2932 cm^{-1} indica la presencia de grupos alifáticos C-H originados probablemente por fragmentos de anillos de pirrol debido a las colisiones de alta energía de las partículas en el plasma durante la síntesis. La absorción en 2220 cm^{-1} y 2364 cm^{-1} se pueden relacionar con enlaces triples $\text{C}\equiv\text{N}$ y $\text{C}\equiv\text{C}$, los cuales se deben a la oxidación y deshidrogenación intensa de las moléculas. Otra consecuencia de este fenómeno son los dobles enlaces consecutivos entre N, C y O tales como $\text{N}=\text{C}=\text{C}$, $\text{O}=\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{C}=\text{C}$ en diferentes combinaciones porque la energía requerida para formar triples y dobles enlaces en esas combinaciones es similar. Los enlaces dobles individuales $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ y muy posiblemente $\text{C}=\text{O}$ pueden estar relacionados con la absorción centrada en 1630 cm^{-1} . Los $\text{C}=\text{C}$ son parte de la estructura del pirrol y por consiguiente de sus polímeros; y los enlaces $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{N}$ son un indicativo de la deshidrogenación y/o oxidación del polímero.

La absorción centrada en 1435 cm^{-1} puede relacionarse con el esqueleto de carbono de la estructura del pirrol $-\text{C}=\text{C}-$. La sustitución de átomos de hidrógeno en los anillos del pirrol se puede identificar en el pequeño pico de absorción en 640 cm^{-1} , lo que indica la presencia de yodo en las partículas.

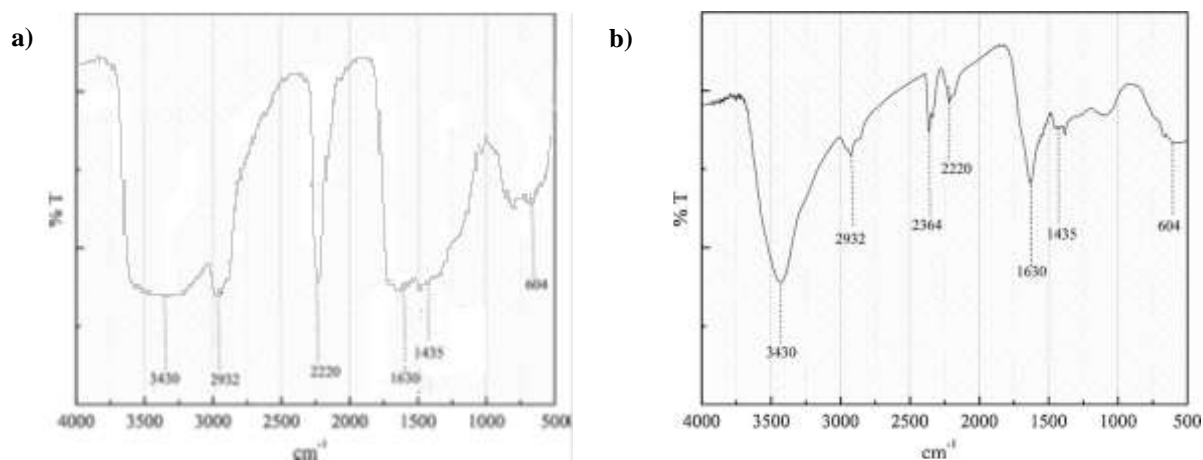


Figura 9. Espectro infrarrojo. a) Nanopartículas de PPy/I y b) Mesopartículas de PPy/I.

6.1.3 Análisis elemental

El análisis elemental en porcentaje atómico (%At) de C, N, O e I en las nanopartículas y mesopartículas de PPy/I se muestra en la Tabla II. En el análisis se encontró que los elementos como C, N, O e I son parte estructural de las partículas. El O, es un elemento que se adicionó por oxidación después de la síntesis como consecuencia de la interacción atmosférica. La participación de I es baja en ambos polímeros debido a que este elemento tiene la función de dopante y su contenido es bajo al nivel de una impureza.

Elemento	%At nanopartículas	%At mesopartículas
C	76.90	74.78
N	18.19	14.38
O	4.86	9.12
I	0.05	0.78

6.2 Efecto de implantes de NPs y MPs de PPy/I en un modelo de LPCMME en ratas

6.2.1 Estudio piloto 1. Selección del implante

6.2.1.1 Recuperación de la función motora

Se evaluó la función motora 24 h después de la LPCMME para corroborar que el tren posterior mostrara parálisis bilateral completa en todas las ratas (BBB=0). Posteriormente los animales se evaluaron una vez por semana por un periodo de 2 meses. Los resultados fueron los siguientes, 8 semanas después de la lesión (Figura 10):

- **Control (n=3):** BBB=7, los animales tuvieron movimiento amplio de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo).
- **NPs₆₀ (n=3):** BBB= 7, los animales tuvieron movimiento amplio de las 3 articulaciones (cadera, rodilla y tobillo)
- **MPs₆₀ (n=3):** BBB=12.5, los animales dieron pasos frecuentes con soporte de peso plantar y mostraron coordinación ocasional entre las patas delanteras y las patas traseras.

En los resultados se puede observar que los animales implantados con 60 μ L de NPs mostraron una recuperación funcional motora similar a los animales Control y los animales implantados con 60 μ L de MPs tendieron a una mejor recuperación funcional en comparación tanto con los animales implantados con NPs como con los animales del grupo Control (Figura 10).

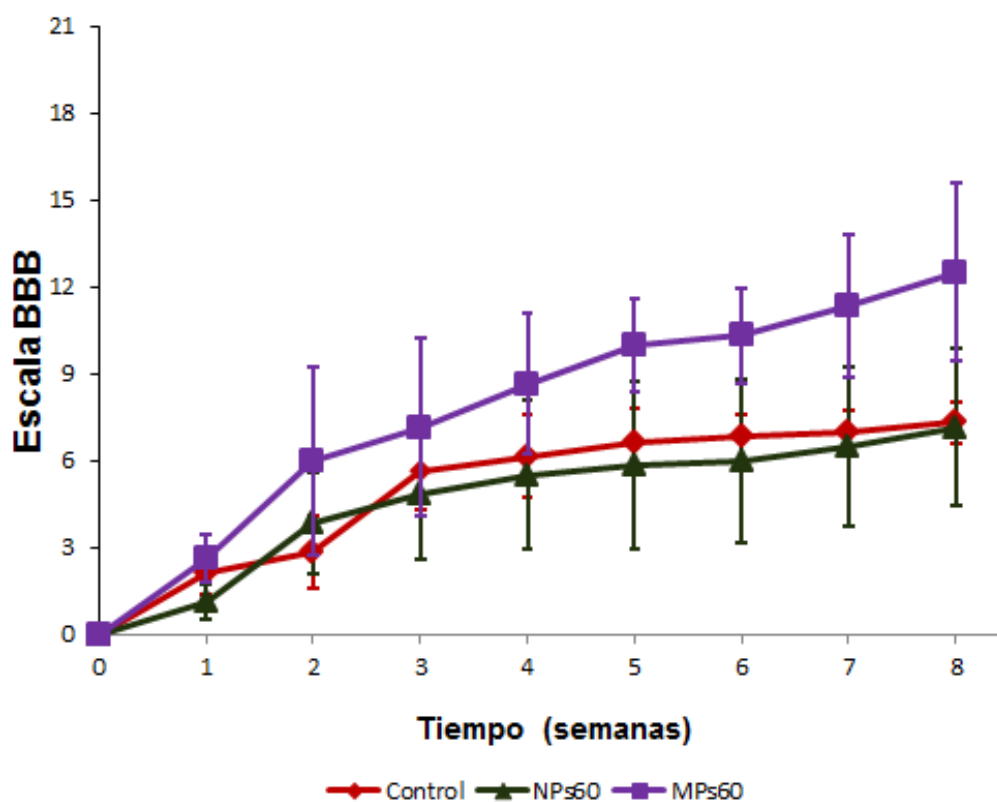


Figura 10. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; NPs₆₀: animales implantados con 60 μ l de nanopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I) ; MPs₆₀: animales implantados con 60 μ L de mesopartículas de PPy/I. Los resultados se expresan como medias \pm EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos NPs₆₀ y MPs₆₀ (No se observó diferencia significativa).

6.2.1.2 Análisis histológico

Ocho semanas después de la LPCMME, los animales fueron sacrificados para analizar la integración de los implantes al tejido nervioso. El grupo Control sin implante (Figura 11-A y B) y el grupo NPs (Figura 11-E y F) mostraron quistes de diferentes dimensiones predominando los de gran tamaño en el epicentro de la lesión y varios microquistes tanto en el sitio de lesión como en la sustancia blanca y gris adyacente, aunque esta respuesta fue mayor en el grupo Control.

El grupo MP_{S60} (Figura 11-C y D), mostró quistes de menor tamaño en comparación con los animales implantados con NPs y los animales Control, y una gran cantidad de microquistes tanto en el epicentro como en las áreas adyacentes al sitio de lesión, mostrando menor daño al tejido medular. También se observó una buena integración de las MPs al tejido nervioso sin respuesta de rechazo.

En todos los grupos se observó presencia de células inflamatorias en la sustancia gris y blanca, y en la zona de lesión; sin embargo, se observa mayor presencia de estas células en el grupo Control.

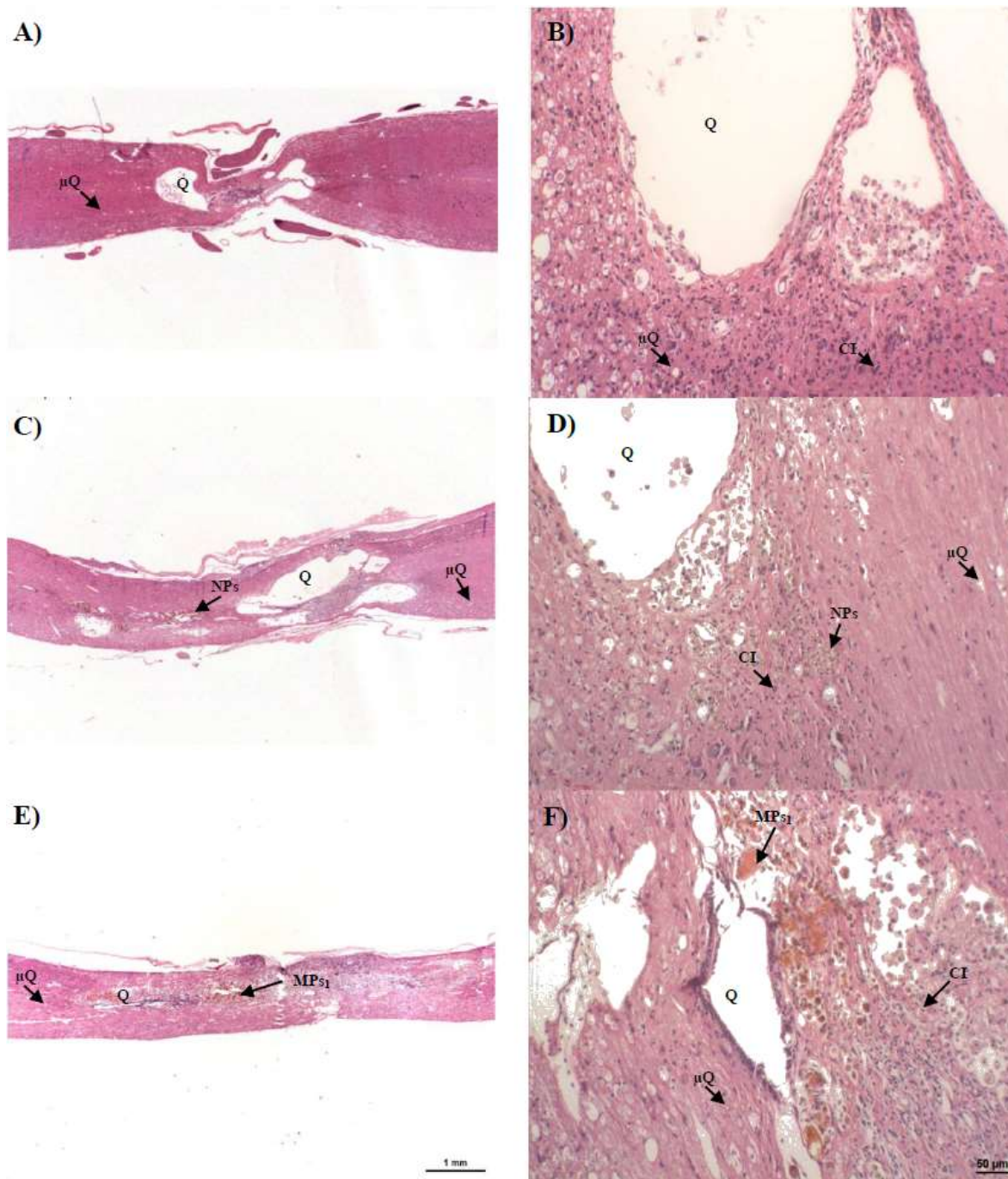


Figura 11. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI) y el tamaño de los quistes (Q) formados. A y B) Control: animales sin implante; C y D) NPs: animales implantados con 60 μ L de nanopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); E y F) MPs₆₀: animales implantados con 60 μ L de mesopartículas de PPy/I. Barra de calibración: 1 mm (A, C y E) y 50 μ m (B, D y F). Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).

6.2.2 Estudio Piloto 2. Tamaño del implante

Después de demostrar que los implantes de MPs favorecen la recuperación funcional motora y la preservación del tejido nervioso después de una LPCMME y con el fin de definir un tamaño de implante, se comparó el efecto de tres diferentes volúmenes de MPs: 10 μ L, 30 μ L y 60 μ L (0.05 mg, 0.15 mg y 0.3 mg de MPs, respectivamente).

6.2.2.1 Recuperación de la función motora

Se evaluó la función motora 24 h después de la LPCMME para corroborar que el tren posterior mostrara parálisis bilateral completa en todas las ratas (BBB=0). Posteriormente los animales se evaluaron una vez por semana por un periodo de 2 meses. Los resultados fueron los siguientes, 8 semanas después de la lesión (Figura 12):

- **Control (n=3):** BBB=7, los animales tuvieron movimiento amplio de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo).
- **MPs₆₀ (n=3):** BBB=12.5, los animales dieron pasos frecuentes con soporte de peso plantar y mostraron coordinación ocasional entre las patas delanteras y las patas traseras.
- **MPs₃₀ (n=3):** BBB=13, los animales dieron pasos frecuentes con soporte de peso plantar y mostraron coordinación frecuente entre las patas delanteras y las patas traseras.
- **MPs₁₀ (n=3):** BBB=13.5, los animales dieron pasos frecuente con soporte de peso plantar y mostraron coordinación constante entre las patas delanteras y las patas traseras y en ocasiones se presenta rotación interna o externa de las patas al hacer contacto con el piso y al despegarse del mismo.

En los resultados (Figura 12) se observó que los tres tamaños de implante muestran una recuperación funcional similar, sin embargo, sólo los animales implantados con MPs a un volumen de 30 μ L y a 10 μ L mostraron diferencia significativa con respecto al grupo Control: 30

μL ($p=0.009$) y $10 \mu\text{L}$ ($p=0.008$). El grupo que presentó el menor error estándar fue el tratamiento a $30 \mu\text{L}$.

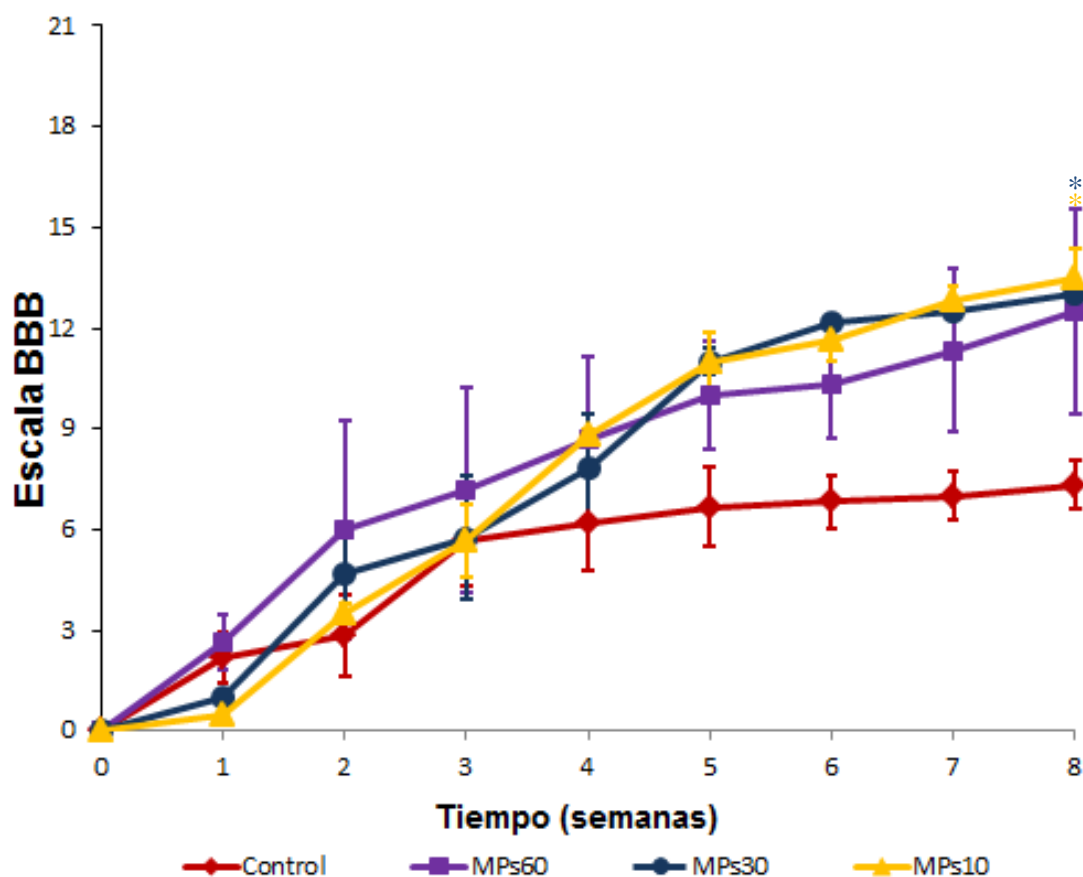


Figura 12. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; MPs₆₀: animales implantados con $60\mu\text{L}$ de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); MPs₃₀: animales implantados con $30\mu\text{L}$ de mesopartículas de PPy/I; MPs₁₀: animales implantados con $10 \mu\text{L}$ de mesopartículas de PPy/I. Los resultados se expresan como medias \pm EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos MPs₃₀ y MPs₁₀ ($p<0.009$ y 0.008 , respectivamente).

6.2.2.2 Análisis histológico

Ocho semanas después de la LPCMME, los animales fueron sacrificados para analizar la integración de los implantes al tejido nervioso. Tanto los animales pertenecientes al grupo Control (Figura 13-A y B) como los animales implantados a un volumen de 10 μL (Figura 13-C y D) y 30 μL (Figura 13-E y F) mostraron quistes de gran tamaño en el epicentro de la lesión y varios microquistes en el tejido adyacente a la lesión, perdiéndose por completo la estructura del tejido de la médula espinal. También se puede observar que en los animales implantados a 10 μL y 30 μL hay poca presencia de material, sin embargo se encuentra bien integrado al tejido nervioso. La poca disponibilidad de material es posible que sea porque el material se desplazó hacia la zona cefálica de la médula espinal por el canal endimario como se puede observar en los animales implantados a 60 μL (Figura 13-G y H), los cuales mostraron varios microquistes a lo largo de todo el tejido nerviosos perdiéndose por completo la estructura del tejido; sin embargo se observó menor presencia de células inflamatorias en comparación a los animales del grupo Control y los implantados a 10 μL y 30 μL .

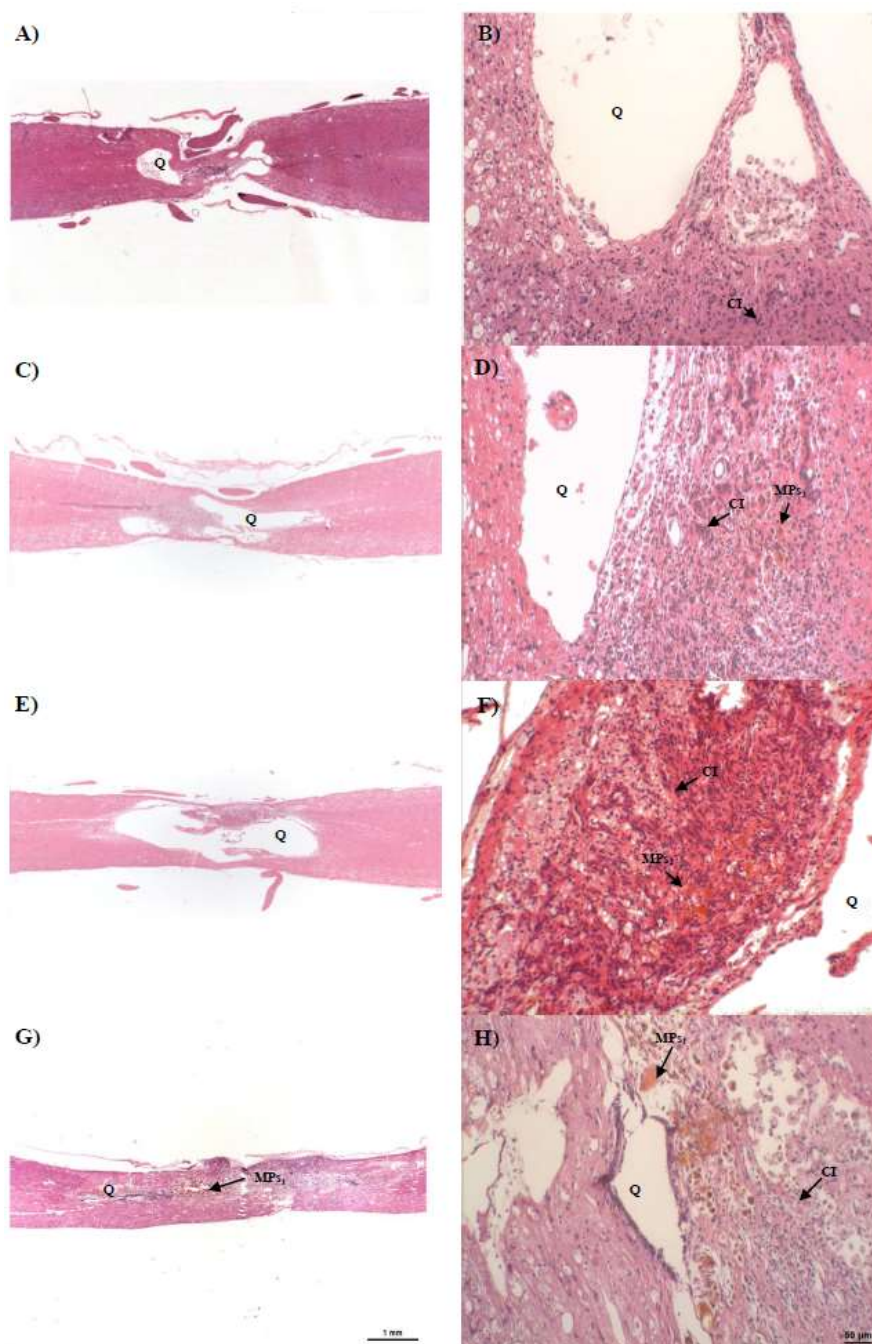


Figura 13. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI) y el tamaño de los quistes (Q) formados. A y B) Control: animales sin implante; C y D) MPs_{10} : animales implantados con 10 μL de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); E y F) MPs_{30} : animales implantados con 30 μL de mesopartículas de PPy/I; G y H) MPs_{60} : animales implantados con 60 μL de mesopartículas de PPy/I. Barra de calibración: 1 mm (A, C, E y G) y 50 μm (B, D, F y H). Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).

6.3 Efecto del PPy/I en combinación con rehabilitación física sobre la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional

Con base en los resultados obtenidos en el apartado 6.2 se eligió como implante para este trabajo de investigación MPs a un volumen de 30 μ L porque mostró favorable respuesta sobre la recuperación funcional y menor error estándar en comparación a los otros implantes. No obstante lo anterior, se observó que el implante tiende a desplazarse del sitio de lesión y al aplicar un volumen de menor tamaño podría perderse el implante y aplicar un volumen mayor podría dañar severamente el tejido adyacente a la lesión.

Ya elegido el tipo de implante y dosis, se combinó el tratamiento con rehabilitación física por medio de un entrenamiento locomotor sobre una caminadora y se evaluó su efecto sobre la recuperación motora y la protección del tejido nervioso.

6.3.1 Recuperación funcional

Se evaluó la función motora 24 h después de la LPCMME para corroborar que el tren posterior mostrara parálisis bilateral completa en todas las ratas (BBB=0). Posteriormente los animales se evaluaron una vez por semana por un periodo de 9 semanas. Los resultados fueron los siguientes al final de las evaluaciones (Figuras 14 y 15):

- **Control (n=5):** BBB=8, los animales tuvieron movimiento amplio de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) pero sin soporte del peso corporal.
- **SS (n=5):** BBB=8, los animales tuvieron movimiento amplio de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) pero sin soporte del peso corporal.
- **MPs₃₀ (n=5):** BBB=11, los animales mostraron movimiento amplio de las tres articulaciones con soporte frecuente del peso corporal con apoyo plantar
- **Control-RF (n=5):** BBB=13.5, los animales mostraron pasos frecuentes con soporte del peso

corporal con coordinación entre las patas delanteras y traseras y ocasionalmente ligera rotación de las patas al hacer contacto con el piso o despegarse del mismo.

- **SS-RF (n=5):** BBB=10, los animales mostraron movimiento amplio de las tres articulaciones con soporte ocasional del peso corporal con apoyo plantar.
- **MPs₃₀-RF (n=5):** BBB=16, los animales dieron pasos constantes con soporte del peso corporal y mostraron coordinación constante entre las patas delanteras y traseras. Los pasos fueron predominantemente plantares con posición de la pata paralela al cuerpo y rotación de la misma al levantarla.

En los resultados mostrados en la Figura 14 y 15, se observó que los animales que se les administró MPs a un volumen de 30 μ L como tratamiento después de una LPCMME, tuvieron una mejor recuperación funcional motora en comparación a los animales pertenecientes al Grupo Control y Grupo SS, aun y cuando, el tratamiento se aplicó 48h después de la lesión. Cuando los Grupos experimentales Control, SS y MPs₃₀ se les aplicó rehabilitación física usando una caminadora mejoraron su recuperación funcional.

En la figura 14 se pueden observar diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el grupo Control-RF y el grupo MPs₃₀-RF con el grupo Control ($p=0.017$ y $p=0.011$, respectivamente) y al comparar el grupo MPs₃₀-RF con el grupo MPs₃₀ ($p=0.037$).

En la figura 15, se pueden observar diferencias significativas al comparar el grupo MPs₃₀ y MPs₃₀-RF con el grupo SS ($p=0.015$ y 0.000 , respectivamente) el grupo MPs₃₀-RF con el grupo MPs₃₀ ($p=0.013$).

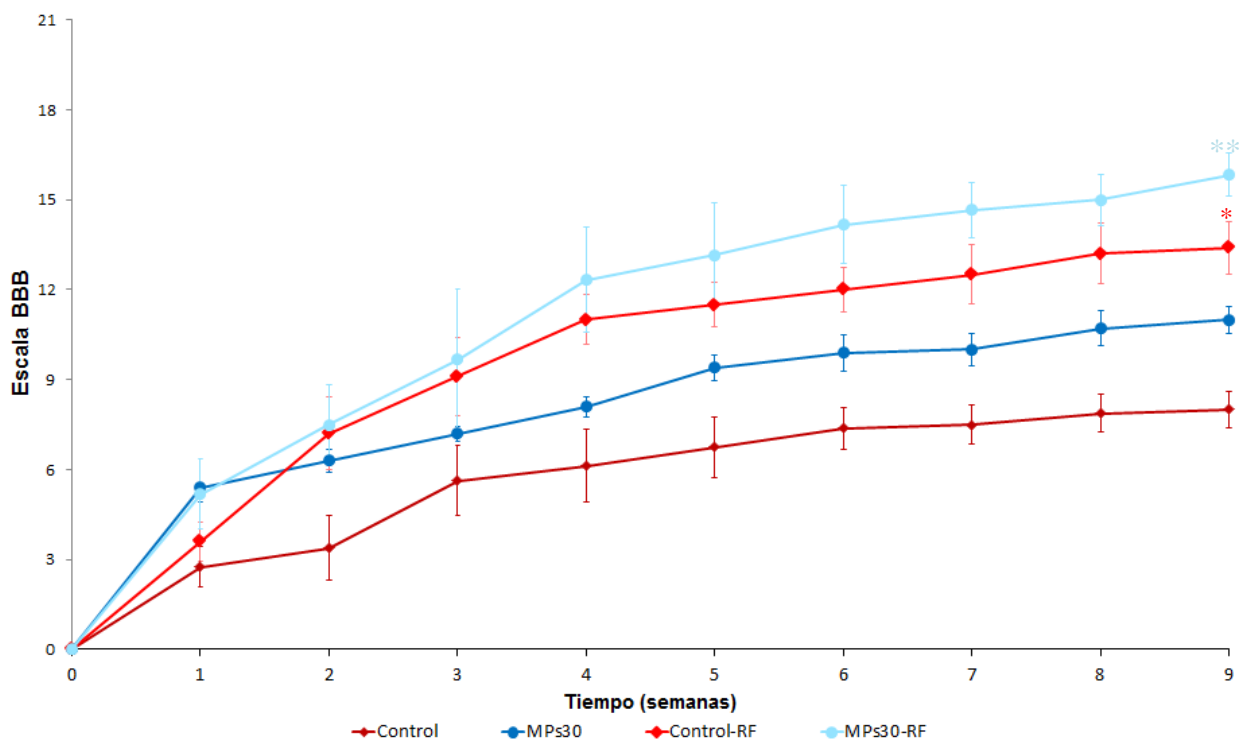


Figura 14. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. Control: animales sin implante; MP₃₀: animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); Control-RF: animales sin implante más rehabilitación física usando una caminadora; MP₃₀-RF: animales implantados con mesopartículas de PPy/I a un volumen de 30 μ L más rehabilitación física sobre una caminadora. Los resultados se expresan como medias \pm EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo Control y los grupos Control-RF y MP₃₀-RF ($p < 0.017$ y 0.011 , respectivamente) y entre el grupo MP₃₀ y el grupo MP₃₀-RF ($p < 0.037$).

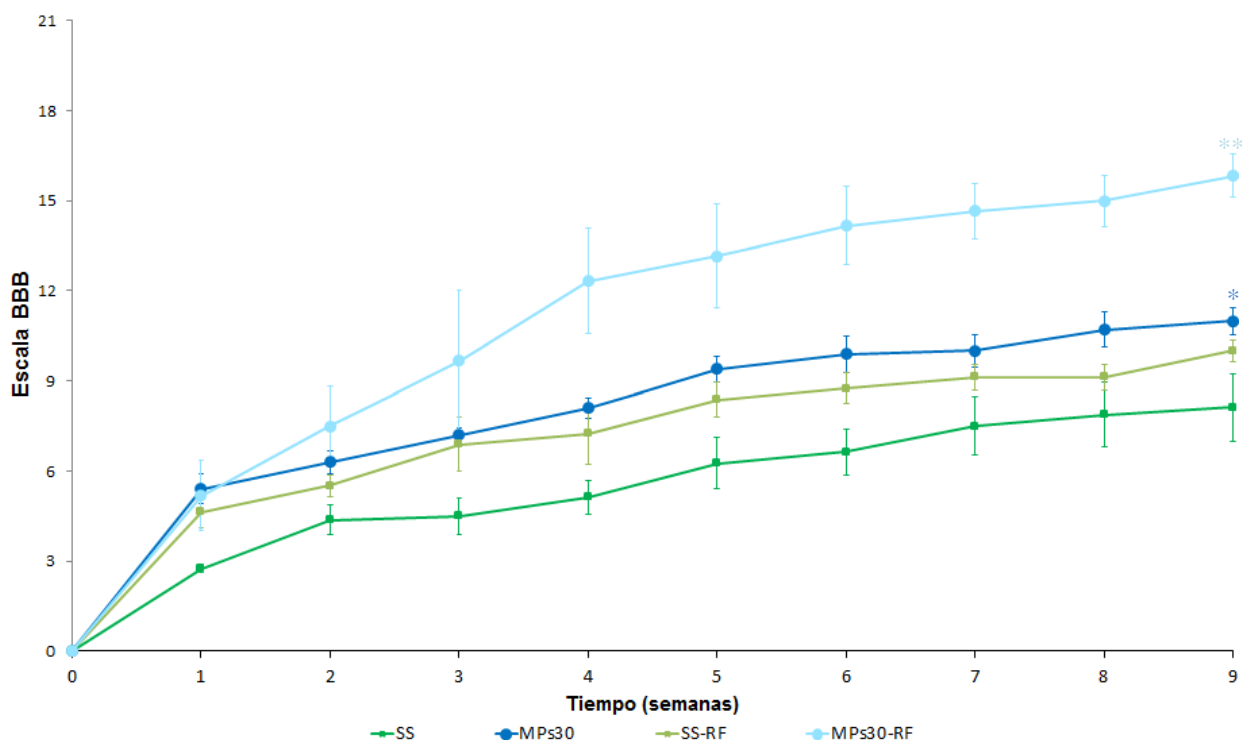


Figura 15. Evaluación de la recuperación locomotora progresiva mediante por la escala BBB después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. SS: animales a los que se les administro 30 μ l de solución salina (vehículo); MP₃₀: animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); SS-RF: animales a los que se les administro 30 μ l de solución salina (vehículo) más rehabilitación física usando una caminadora; MP₃₀-RF: animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Los resultados se expresan como medias \pm EE. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativas entre el grupo SS y los grupos MP₃₀ y MP₃₀-RF ($p < 0.015$ y 0.000 , respectivamente) y entre el grupo MP₃₀ y MP₃₀-RF ($p < 0.013$).

6.3.2 Análisis histológico y morfométrico

Nueve semanas después de la LPCMME, los animales fueron sacrificados para analizar la preservación del tejido de la médula espinal y la integración de los implantes al tejido nervioso. La cantidad de tejido preservado de la médula espinal se cuantificó en un área de 25.07 mm² para cada médula espinal. El análisis morfométrico mostró una mejor preservación del tejido nervioso en los grupos implantados sólo con MPs ($p = 0.034$) o en combinación con rehabilitación física ($p = 0.05$) en comparación con el grupo que sólo recibió el tratamiento de solución salina como vehículo (Figura 16-B). Al comparar a los animales del grupo Control (lesionados sin

tratamiento) con los animales implantados con MP_{S30} con o sin rehabilitación física no se observaron diferencias significativas (Figura 16-A).

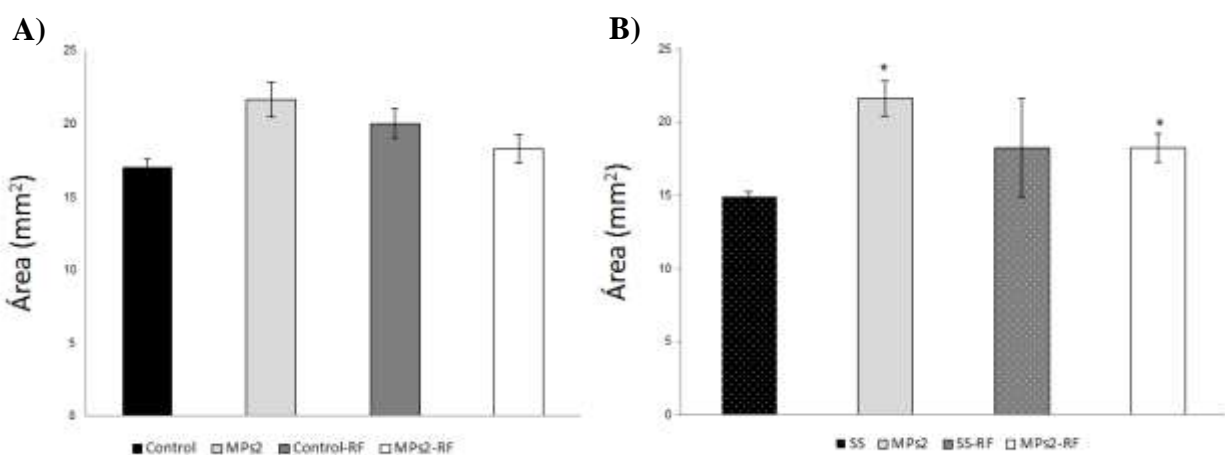


Figura 16. Análisis morfométrico del tejido preservado después de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) en ratas. SS: animales a los que se les administro 30 μ L de solución salina (vehículo); MP_{S30} : animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de polipirrol/yodo (PPy/I); SS-RF: animales a los que se les administro 30 μ L de solución salina (vehículo) más rehabilitación física usando una caminadora; MP_{S30} -RF: animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Los resultados se expresan como medias \pm EE. Prueba Kruskal–Wallis seguida de la prueba Mann–Whitney. *Diferencia significativas entre el grupo SS y los grupos MP_{S30} y MP_{S30} -RF ($p < 0.034$ y 0.05 , respectivamente).

En las fotomicrografías de la médula espinal se puede observar que el grupo Control (Figura 17 y 18-A) mostró varios quistes de diferente tamaño y al recibir el tratamiento de rehabilitación física (Figura 17 y 18-B) la destrucción del tejido fue menor. En el caso de los grupos experimentales SS (Figura 17 y 18-C) y el grupo SS-RF (Figura 17 y 18-D) mostraron quistes de gran tamaño en el epicentro de la lesión y varios microquistes en las zonas adyacentes a la misma, aunque esta respuesta fue mayor en el grupo SS. Los animales que recibieron implantes de MP_{S30} (Figura 17 y 18-E) mostraron una mejor preservación de tejido nervioso en comparación con los animales que recibieron el tratamiento con solución salina y los animales Control. Cabe destacar que el grupo MP_{S30} -RF (Figura 17 y 18-F) fue el que tuvo la mayor preservación del tejido nervioso.

Aunque los implantes de MP_{S30} mostraron una buena integración al tejido nervioso de la médula espinal, las MP_{S30} tendieron a moverse hacia el área cefálica sin una respuesta de rechazo, pero sí con una respuesta inflamatoria aguda; no obstante lo anterior, esta respuesta fue menor en los

grupos implantados con MPs_{30} que la de los grupos implantados con solución salina y los animales del grupo Control. También se puede observar que los animales que recibieron implantes con MPs_{30} mostraron una cicatriz glial de gran tamaño que se extendió más allá del sitio de lesión hacia el área cefálica y caudal, pero esta cicatriz fue menos evidente cuando las ratas recibieron el tratamiento combinado de MPs_{30} con rehabilitación física, mientras que la presencia de células inflamatorias fue menor en los grupos implantados con MPs_{30} que en los grupos no implantados. Además, no se detectó ninguna respuesta evidente de rechazo al implante en ninguno de los casos.

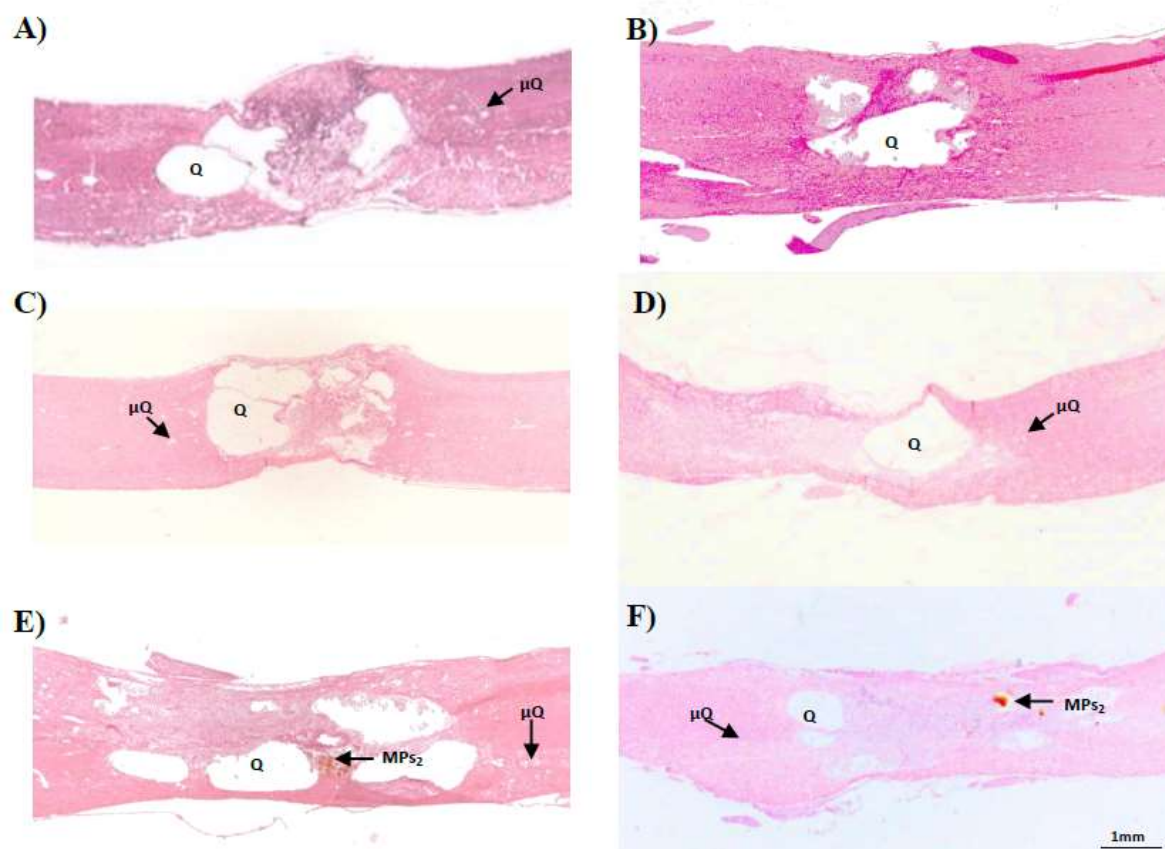


Figura 17. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, las alteraciones en la citoarquitectura de la médula espinal, la destrucción del tejido nervioso y el tamaño de los quistes (Q) formados. A) Control: animales sin implante; B) Control-RF: animales sin implante y rehabilitación física usando una caminadora; C) SS: animales a los que se les administro 30 μ L de solución salina (vehículo); D) SS-RF: animales a los que se les administro 30 μ L solución salina más rehabilitación física usando una caminadora; E) MPs_{30} : animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de PPy/I; F) MPs_{30} -RF: animales implantados con 30 μ L de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física usando una caminadora. Barra de calibración: 1mm. Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).

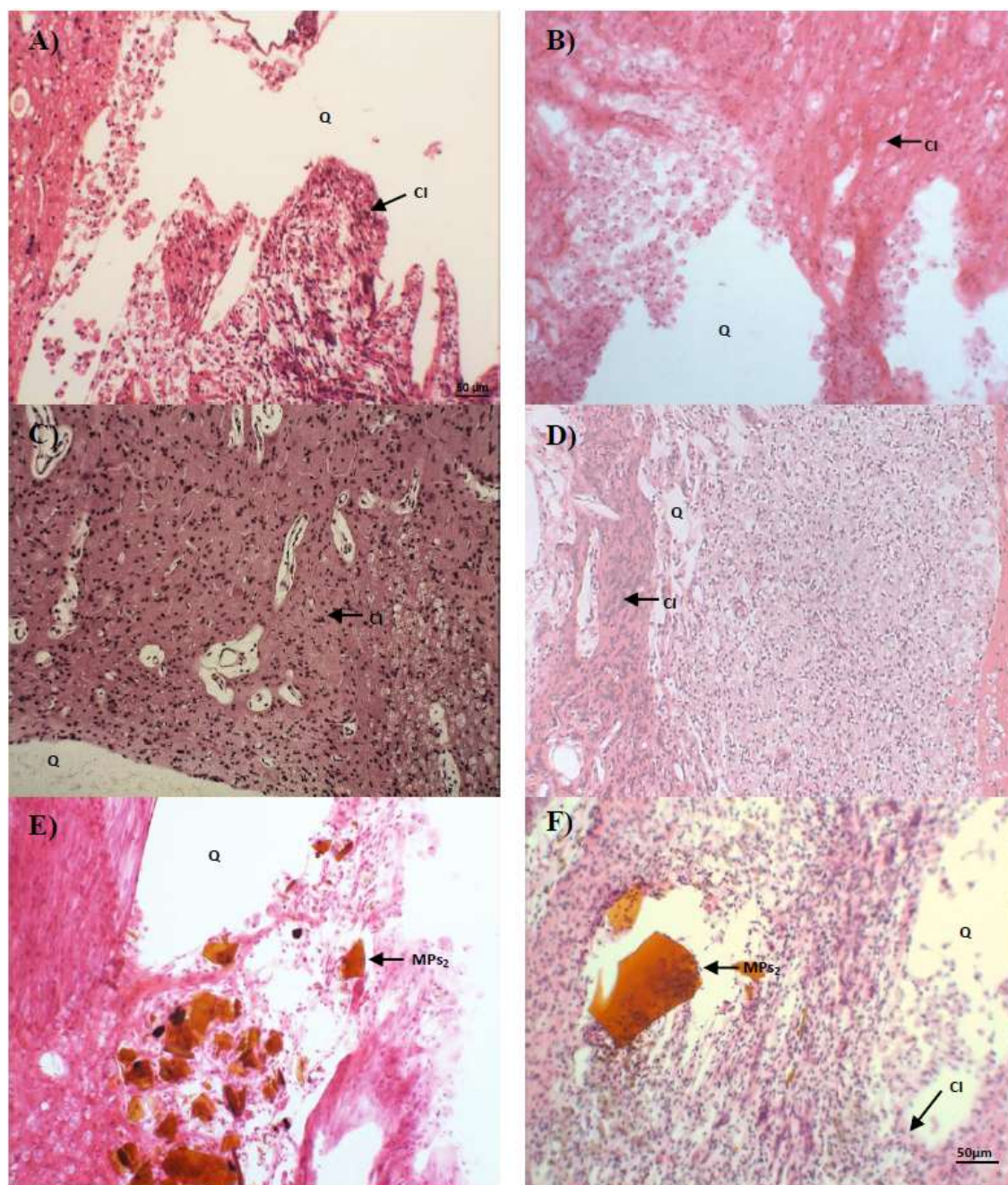


Figura 18. Fotomicrografías representativas de cortes longitudinales de la médula espinal de ratas que muestran la zona del epicentro de una lesión por contusión moderada de la médula espinal (LPCMME) donde se observa la interacción del implante con el tejido nervioso, la presencia de células inflamatorias (CI), la destrucción del tejido nervioso y el tamaño de los quistes (Q) formados. A) Control: animales sin implante; B) Control-RF: animales sin implante y rehabilitación física sobre una caminadora; C) SS: animales a los que se les administro 30µL de solución salina (vehículo); D) SS-RF: animales a los que se les administro 30 30µL de solución salina más rehabilitación física usando una caminadora; E) MPs₃₀: animales implantados con 30µL de mesopartículas de PPy/I; F) MPs₃₀-RF: animales implantados con 30 µL de mesopartículas de PPy/I más rehabilitación física susando una caminadora. Barra de calibración 50µm. Tinción Hematoxilina/eosina (Anexo 6).

7. Discusión

Actualmente no existe un tratamiento para la LTME. Si bien, muchas estrategias terapéuticas prometedoras se han probado en ensayos clínicos y experimentales, la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario limitan su efectividad. Los tratamientos aplicados después de una LTME, son en gran medida paliativos, para contrarrestar las secuelas de la lesión, sin posibilidad de cura. Por tal motivo, se propone el uso de estrategias terapéuticas combinadas que por separado hayan demostrado efectos benéficos sobre la recuperación funcional.

En los últimos años se han estudiado una gran variedad de biopolímeros como implantes y como andamios para soporte de trasplantes celulares, para la liberación de factores neurotróficos, o ambos, no obstante, los resultados han sido modestos [116, 244]. Dentro de los biomateriales estudiados como tratamiento en LTME, se encuentra el pirrol y derivados. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el PPy/I obtenidos por el método de polimerización por plasma, tiene una buena compatibilidad con el tejido nervioso al ser implantado en un modelo de LPSCME en ratas, además reduce la respuesta inflamatoria, y promueve la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional [155-157]. El objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de un implante de PPy/I obtenido por el método de polimerización por plasma en un modelo de LPCMME y combinar el implante con otra estrategia terapéutica como la rehabilitación física para incrementar su efecto.

Cabe destacar, que los tratamientos previos se aplicaron en un modelo de LPSCME que es el menos común en el área clínica y el implante se colocaba en forma de pastilla e inmediatamente después de la lesión, para poder aplicar el tratamiento en una LPCMME, el implante debía aplicarse en forma de partículas y por medio de una inyección, para evitar un mayor daño a la médula espinal, además se debía dejar pasar un tiempo para que el edema causado por el traumatismo a la médula espinal, redujera su tamaño y poder aplicar el tratamiento.

Para determinar el tipo de implante, su morfología y tamaño, se realizaron dos estudios piloto, en los cuales, implantes de NPs y MPs de PPy/I (60 μ L) fueron implantados en una LPCMME y se comparó su efecto. Los implantes de NPs y los animales Control (lesionados sin tratamiento), mostraron quistes de diversos tamaños tanto en el epicentro de la lesión como en la sustancia gris y blanca adyacente a la misma, aunque el daño fue mayor en el grupo Control. También se localizaron NPs alejadas del epicentro de la lesión, lo cual sugiere que por su morfología esférica y lisa, estas pudieron movilizarse del sitio de lesión, lo cual disminuyó su efecto, mostrando una recuperación funcional similar al grupo Control. A diferencia de las NPs, las MPs mostraron morfología con geometría y tamaño irregular con una superficie ligeramente rugosa, lo cual dificultó su movilización del sitio de lesión y se observó menor daño al tejido nervioso y una mejor recuperación funcional con respecto a los animales Control y los implantados con NPs. Posteriormente, se evaluaron tres diferentes tamaños de implante: 10 μ L, 30 μ L y 60 μ L y se observó recuperación funcional similar en los tres grupos. Se eligió el implante a un volumen de 30 μ L, porque a un volumen de 10 μ L, se ingresa una cantidad muy pequeña de material al sitio de lesión y podría perderse el efecto y un volumen de 60 μ L, al ser tan grande la muestra, podría generar un mayor daño a la médula espinal, por efecto de compresión.

Una vez elegidos el implante y su tamaño se procedió a aplicar el tratamiento en combinación con rehabilitación física por medio de un entrenamiento locomotor sobre una caminadora, ya que es el más utilizado en el área clínica y experimental. Esta combinación incrementó la recuperación funcional en animales parapléjicos, pero no incrementó la protección del tejido nervioso después de una LPCMME. Estos resultados sugieren una posible aceleración en la plasticidad espontánea de los circuitos neuronales sobrevivientes de la médula espinal, más que la neuroprotección del tejido de la misma en la fase aguda de la lesión, ya que los implantes fueron inyectados 48 h después de la LPCMME y la rehabilitación se inició cinco días más tarde.

La LTME en humanos se produce generalmente por una contusión y no por una sección completa, donde la manipulación quirúrgica del tejido nervioso mediante la implantación de andamios, películas o puentes neuronales sólidos podría producir un mayor daño. Por lo tanto, en

el presente estudio, se utilizó un modelo de LPCMME y el biomaterial se administró como MPs en la zona lesionada por medio de una inyección directa 48 h después de la lesión. En estas condiciones y después de dos meses, las MPs promovieron la preservación del tejido nervioso y la recuperación funcional en comparación con los animales del grupo Control y; sin embargo, los resultados de la recuperación funcional mejoran en todos los grupos experimentales (MPs, SS y Control) al combinarlos con rehabilitación física aunque no se presente un incremento en la cantidad de tejido preservado. Por lo tanto, esta combinación de tratamientos podría estimular mecanismos específicos de plasticidad neuronal en el tejido preservado de la médula espinal más que estimular mecanismos de neuroprotección o neuroregeneración.

Aunque diferentes biomateriales inyectables se han utilizado previamente en ratas como implantes después de una LTME tales como el colágeno, la fibrina, la fibronectina y el poli(ácido láctico)-polietilenglicol-poli(ácido láctico), estos implantes mejoraron y soportaron el crecimiento orientado de axones, pero con modesta recuperación funcional [116-245-246]. Cigognini y colaboradores [247] reportaron un autoensamblaje funcionalizado de un péptido homogéneo de la médula ósea y optimizado se implantó inmediatamente después de una LTME por contusión en ratas. Este péptido proporcionó soporte tanto físico como trófico para el crecimiento del tejido nervioso, aumento la infiltración celular y axonal dentro del quiste y mejoro la recuperación funcional. Otros investigadores han reportado los efectos del colágeno, la fibronectina viscosa, la fibrina y la fibrina/fibronectina inyectables sobre una cavidad experimental en la médula espinal de ratas. Algunos de ellos mostraron una buena integración con el hospedero y fueron capaces de soportar el crecimiento axonal en asociación con la infiltración de células de Schwann y depósitos de laminina [248]; sin embargo, los resultados del implante de colágeno dieron lugar a un crecimiento axonal desigual porque estos implantes contenían una inclusión densa que los axones no pudieron penetrar, mientras que los animales implantados con fibronectina tenían grandes cavidades en la interface entre el implante y el hospedero y pocas neuronas sobrevivientes en la médula espinal intacta adyacente al sitio del implante. Sólo los animales implantados con fibrina/fibronectina mostraron un crecimiento robusto de los axones [116]. En las características principales de estos materiales es su fácil

transformación de un líquido a un gel después de ser inyectados sobre la lesión de la médula espinal y la formación de un andamio después de eso; sin embargo, aunque los implantes mostraron una buena integración en el tejido nervioso y promuevan la regeneración axonal, hay que considerar que son materiales biodegradables. Por lo tanto, es importante tomar nota de cualquier producto de degradación que pudiese ser producido porque podría ser tóxico para el hospedero, así como la tasa de degradación, que debe ser sincronizada con la frecuencia de regeneración nerviosa con el objetivo de evitar el riesgo de compresión nerviosa o la limitación del crecimiento axonal. En el presente trabajo, las MPs no generaron un andamio debido a que éstas se suspendieron en solución salina como vehículo. Por lo tanto, las MPs se dispersaron a través del sitio de lesión y en las áreas circundantes sin ejercer el riesgo de compresión, y el crecimiento celular entre el implante no estaba limitado. Aunque las MPs de PPy/I no son biodegradables, el riesgo de toxicidad se redujo debido a que fueron sintetizadas por el método de plasma. Además, la implantación de las MPs sobre la lesión de la médula espinal fue bien tolerada, ya que generó una discreta respuesta inflamatoria aguda sin respuesta de rechazo y sin alteraciones adicionales en los animales. Este efecto positivo se atribuye al método de síntesis que se utilizó para obtener los implantes, ya que al sintetizarlos por el método de plasma no se incluyó ningún agente externo potencialmente tóxico durante la polimerización, como es en el caso de los métodos químicos y electroquímicos convencionales [187] (anexo 1 y 2). En la polimerización por plasma, las reacciones se realizan por medio de descargas eléctricas que ionizan al monómero y dopante en fase gaseosa formando plasmas con ellos mismos [187]. Las moléculas, electrones e iones aumentan su energía cinética y colisionan con las moléculas del monómero y dopante, reaccionando entre sí formando el polímero [184], donde sólo los compuestos químicos involucrados en este proceso son los monómeros y derivados. Este mecanismo explica en parte por qué los polímeros sintetizados por plasma tienen propiedades físicas y químicas diferentes a los obtenidos por los métodos químicos y electroquímicos convencionales. Al final del seguimiento, los animales implantados con MPs de PPy/I mostraron una recuperación funcional significativa en comparación con los animales que recibieron como tratamiento únicamente solución salina como vehículo y los animales Control (lesionados sin tratamiento), muy probablemente debido a las propiedades físicas y químicas del implante, tales

como su baja reactividad, a su insolubilidad, y a que es un material térmicamente estable [185, 194].

Por otro lado, la conductividad de un polímero es capaz de alterar los campos eléctricos locales y modificar la matriz extracelular y el entorno alrededor del implante, promoviendo las interacciones neuronales, la prevención de la muerte celular, controlando el crecimiento celular e induciendo la plasticidad [176, 249-251]. Debido a que un polímero resultante de la síntesis por plasma puede tener una estructura tridimensional y altamente entrecruzada, se podrían haber afectado las propiedades conductoras del polímero. En el caso del PPy, al contaminarse con yodo como dopante durante la síntesis, se incrementa la capacidad del polímero para transferir cargas eléctricas y así no hacer uso de fuentes externas de estimulación eléctrica para ejercer su efecto. Además, los grupos amina heteroaromáticos del polímero son bien tolerados por las células y pueden promover interacciones entre ella. En la literatura se ha reportado que superficies ricas en aminas favorecen la adsorción de proteínas y la adhesión celular, ya que proveen sitios para la inmovilización de biomoléculas [238] y el PPy es una superficie rica en aminos [155, 239-240]; sin embargo, se necesitan más estudios para comprender cuáles moléculas y factores neurotróficos están específicamente involucrados en este proceso, y cuáles mecanismos son responsables de mejorar la recuperación funcional en los animales que recibieron el implante de MPs de PPy/I.

A pesar de que el implante de MPs tuvo efectos positivos sobre los procesos de neuroprotección y recuperación funcional después de una LPCMME, se obtuvieron los mejores resultados funcionales cuando se utilizó el implante de MPs en combinación con la estrategia terapéutica de rehabilitación física por medio de una caminadora. Aunque se han aplicado diferentes estrategias de rehabilitación como la natación, el ciclismo, ejercicio a través de una rueda y el entrenamiento mediante una caminadora en diversos modelos experimentales de LTME, con el objetivo de mejorar la locomoción, no todos ellos han tenido un efecto significativo sobre la recuperación funcional. Algunos autores han reportado que no se mostró mejoría en la recuperación funcional evaluada con la escala BBB usando la natación como terapia de rehabilitación, al comparar los

animales entrenados con los no entrenados en un modelo por contusión de la médula espinal, ya que se mostró que la natación induce la extravasación en el sitio y alrededor de la lesión [252]. Se ha reportado que el ciclismo ayuda a prevenir la atrofia muscular y restablece la frecuencia-dependiente de la depresión del reflejo H al nivel de los animales sin lesión, pero sin ningún efecto significativo sobre la recuperación funcional en ratas con transección de la médula espinal [128, 253]. Aunque el ejercicio a través de una caminadora ha mejorado la recuperación funcional en ratas con una lesión por contusión de la médula espinal [254], el entrenamiento locomotor sobre una caminadora con o sin apoyo parcial del peso corporal, o con asistencia robótica o manual después de una LTME, tiene un efecto favorable sobre la recuperación funcional debido a que involucra nuevas estrategias de coordinación que, aunque diferentes de una locomoción normal, promueven la reorganización de las redes locomotoras, tanto por arriba como por abajo del sitio de lesión e induce la plasticidad rostral y caudal de la zona de lesión debido a que los circuitos que coordinan el escalonamiento y la posición de las extremidades son altamente plásticos, y su conectividad funcional puede ser modulada por el entrenamiento locomotor sobre una caminadora [255-256]. Otros autores han demostrado que el entrenamiento locomotor sobre una caminadora induce plasticidad al favorecerse el crecimiento axonal y la activación de Erk1/2 y promoviéndose la recuperación funcional en roedores y gatos con sección o contusión de la médula espinal [257-259]. En el presente trabajo se implementó el entrenamiento locomotor sobre una caminadora sin soporte del peso corporal con el fin de que las ratas pudieran caminar voluntariamente en su posición natural cuadrúpeda y, por lo tanto, evitar la confusión de variables asociadas al movimiento sin control voluntario de una posición bípeda debido a una manipulación externa de los animales.

Aunque se mostró previamente que el entrenamiento locomotor sobre una caminadora promueve la recuperación funcional, también se pudo observar que no se mostraran diferencias significativas en la preservación del tejido nervioso entre los animales que recibieron rehabilitación física en comparación con los animales del grupo Control. Estos resultados sugieren el entrenamiento locomotor por medio de una caminadora podría inducir y acelerar la plasticidad espontánea en los axones sobrevivientes y en los circuitos de la médula espinal,

alterando su organización, estructura y función más que la formación de nuevas fibras nerviosas, lo que da lugar a una mejor recuperación funcional cuando se aplica rehabilitación física y se potencia su efecto cuando se aplica en combinación de los implantes de MPs de PPy/I. Algunos investigadores han reportado que el tratamiento de rehabilitación física por medio de una caminadora en ratas con contusión moderada de la médula espinal mejoraron su función locomotora debido al aumento de la neuroplasticidad en los circuitos neuronales de la médula espinal, donde su recuperación depende directamente de su entrenamiento locomotor dando lugar a la reorganización espontánea de los circuitos espinales [260]. Por lo tanto, los animales que no recibieron rehabilitación física tienen un grado incompleto de recuperación debido a que la plasticidad espontánea se encuentra limitada.

A pesar del trabajo previo, es importante seguir estudiando las propiedades fisicoquímicas y morfológicas del biomaterial y probar diferentes vehículos que eviten la movilización de las MPs con el fin de que estas se queden en el sitio de lesión y mejorar las respuestas benéficas, además de estudiar su efecto en la fase crónica. Los implantes de MPs de PPy/I tienen futuras aplicaciones en biomedicina, principalmente en el SNC debido a su tamaño y a la posibilidad de aplicarlos sin causar daños al tejido nervioso, sin embargo, el uso y aplicación de este biomaterial seguirá siendo estudiado.

No obstante los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se continuará estudiando y desarrollando nuevas estrategias que puedan permitir que este tratamiento pueda ser aplicado en seres humanos con LTME sólo o en combinación con otras terapias para mejorar los resultados obtenidos.

8. Conclusiones

- Los implantes de NPs no tuvieron un efecto sobre la recuperación funcional después de una LPCMME, debido a su tamaño y morfología esférica y lisa, se movilizaron y quedó poco implante en el sitio de lesión.
- Los implantes de MPs de PPy/I favorecen la recuperación funcional y la protección del tejido nervioso, aun y cuando el tratamiento se aplicó 48 h después de la LPCMME.
- La rehabilitación física por medio de un entrenamiento locomotor sobre una caminadora favoreció la recuperación funcional pero no la protección del tejido nervioso después de una LPCMME.
- El tratamiento combinado de un implante de MPs de PPy/I y rehabilitación física sobre una caminadora tuvo un mejor efecto sobre la recuperación funcional en comparación al uso de los tratamientos por separado.

9. Perspectivas

- Evaluar el efecto del PPy/I en combinación o no con rehabilitación física en etapas subaguda y crónicas después de una LTME.
- Emplear técnicas histológicas que permitan identificar los tipos celulares presentes en el sitio de lesión.
- Emplear diversas técnicas y marcadores que permitan evaluar el efecto del PPy/I en LTME.
- Evaluar el efecto de PPy/I después de una LTME en otras especies animales.

Bibliografía

1. Bracken, M. B., Collins, W. F., Freeman, D. F., Shepard, M. J., Wagner, F. W., Silten, R. M., Hellenbrand, K. G., Ransohoff, J., Hunt, W. E., Perot, P. L. Jr., Grossman, R. G., Green, B. A., Eisenberg, H. M., Rifkinson, N., Goodman, J. H., Meagher, J. N., Ficher, B., Clifton, G. L., Flamm, E. S., & Rawe, S. E. (1984). Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*, 251:45-52.
2. Fehlings, M. G., Wilson, J. R., & Cho, N. (2014). Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. *Neurosurgery* 61, 1:36-42.
3. Hurlbert, R. J. (2014). Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: point. *Neurosurgery* 61, 1:32-35.
4. Bowers, C. A., Kundu, B., & Hawryluk, G. W. (2016). Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an increasingly philosophical debate. *Neural Regen Res.*, 11: 882-885.
5. Bowers, C. A., Kundu, B., Rosenbluth, J., & Hawryluk, G. W. (2016). Patients with spinal cord injuries favor administration of methylprednisolone. *PLoS One*, 11:e0145991.
6. Fehling, M. G., Vaccaro, A., Wilson, J. R., Singh, A., W Cadotte, D., Harrop, J. S., Aarabi, B., Shaffrey, C., Dvorak, M., Fisher, C., Arnold, P., Massicotte, E M., Lewis, S., & Rampersaud, R. (2012). Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One*, 7:e32037.
7. Jug, M., Kežžar, N., Vesel, M., Al-Mawed, S., Herman, S., & Bajrović, F. F. (2015). Neurological Recovery after Traumatic Cervical Spinal Cord Injury Is Superior if Surgical Decompression and Instrumented Fusion Are Performed within 8 Hours versus 8 to 24 Hours after Injury: A Single Center Experience. *J Neurotrauma*, 32:1385-1392.
8. Lynskey, J. V., Belanger, A., & Jung, R. (2008). Activity-dependent plasticity in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*, 45:229-240.
9. Morawietz, C., & Moffat, F. (2013). Effects of locomotor training after incomplete spinal cord injury: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil*, 94:2297-2308.
10. Silva, N. A., Sousa, N., Reis, R.L., Salgado, A. J. (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.*, 114: 25-57.
11. Cristante, A. F., de Barros Filho, T. E. P., Marcon R. M., Letaif O. B., da Rocha I. D. (2012). Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics*, 67: 1219-1224.
12. Thuret S., Moon, L. D., Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.*, 7: 628–643.

13. Pardini, C. (1998). Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Mexico: Tesis doctoral.
14. Dobkin, B. H., Havton, L. A. (2004). Basic advances and new avenues in therapy of spinal cord injury. *Annu Rev Med.*, 55: 255–282.
15. Bahena-Salgado, Y., & Bernal-Márquez, J. (2007). Calidad de vida de lo pacientes con paraplejía secundaria a lesión vertebral traumática. *Acta Ortopédica Mexicana*, 21: 3-7.
16. Van de Graaff, K. M. (2001). *Human Anatomy*. Boston: McGraw-Hill.
17. Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. S., (2001). *Human physiology: The mechanisms of body function*. Boston: McGraw-Hill.
18. Siegel, G., Albers, R.W., Brady, S., Price, D. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Seventh Edition*. EE.UU: Elsevier Academic Press.
19. Guyton , A. C. (1994). *Anatomía y fisiología del sistema nervioso*. Mississippi EE.UU.: Editorial Medica Panamericana.
20. Watson, C., Paxinos, G., & Kayalioglu, G. (2009). *The Spinal Cord*. . San Diego: Academic Press.
21. Lockhart , R. D., Hamilton , G. E., & Fyfe, F. W. (1995). *Anatomía humana*. México: Interamericana McGraw Hill.
22. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia , A., McNamara, J. O., & Williams, M. (2004). *Neuroscience* . Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
23. Ray, S. K., Dixon, C. E., & Banik, N. L. (2002). Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol.* , 17: 1137–1152.
24. Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., & Fehlings, G. (2007). Spinal Cord Injury: Time to Move? . *J Neurosci* , 27:11782–11792.
25. Simon, M. C., Sharif , S., Tan, P. R., & LaPlaca, C. M. (2009). Spinal Cord Contusion Causes Acute Plasma Membrane Damage. *J Neurotrauma* , 26: 563–574.
26. Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. . *Acta Neurobiol Exp* , 71: 281-299.
27. Raineteau, O. (2008). Plastic responses to spinal cord injury. *Behav Brain Res*, 192: 114-123.
28. Cafferty, W. B., Gardiner, N. J., Das , P., Qiu, J., McMahon, S. B., & Thompson, S. W. (2004). Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci* , 24:4432-4443.

29. Liverman, T. C., Altevogt, M. B., Joy, E. J., & Johnson, T. R. (2005). *Spinal cord injury: progress, promise, and priorities*. Washington, DC.: National Academy of Sciences.
30. Tator, C. H., McCormick, P. C., Piepmeier, J. M., Benzel, E. C., & Young, W. (1998). Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *J Neurosurg*, 42:696–708.
31. Hulsebosch, C. E. (2002). Hulsebosch CE (2Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Edu*, 26: 238–255.
32. Cramer, S. C., Lastra, L., Lacourse, M. G., & Cohen, M. J. (2005). Brain motor system function after chronic, complete spinal cord injury. *Brain* , 128:2941–2950.
33. Yiu, G., & He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 7: 617–627.
34. Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol.*, 24:254-264.
35. Bareyre, F. M., & Schwab, M. E. (2003). Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: Insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosci* , 26: 555–563.
36. Rowland, J. W., Hawryluk, G. W., Kwon, B., & Fehlings, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, 25:1-17(E2).
37. Sekhon, L. H., & Fehlings, M. G. (2001). Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. . *Spine* , 26:S2-12.
38. Koyanagi, I., Tator, C. H., & Lea, P. J. (1993). Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts: 2. Acute spinal cord injury. *Neurosurgery* , 33:285–292.
39. Koyanagi, I., Tator, C. H., & Lea, P. J. (1993). Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts: 1. Normal spinal cord. *Neurosurgery* , 33:277–284.
40. Tator, C. H., & Koyanagi, I. (1997). Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* , 86:483–492.
41. Kaymaz, M., Emmez, H., Bukan, N., Dursun , A., Kurt, G., & Pasaoglu, A. (2005). Effectiveness of FK506 on lipid peroxidation in the spinal cord following experimental traumatic injury. *Spinal Cord* , 43: 22–26.

42. Choo, A. M., Liu, J., Lam, C. K., Dvorak, M., Tetzlaff, W., & Oxland, T. R. (2007). Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*, 6:255–266.
43. Tator, C. H., & Fehlings, M. G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, 75: 15–26.
44. Mautes, A. E., Weinzierl, M. R., Donovan, F., & Noble, L. J. (2000). Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther*, 80:673–687.
45. Oudega, M. (2012). Molecular and cellular mechanisms underlying the role of blood vessels in spinal cord injury and repair. *Cell Tissue Res.*, 349:269–88.
46. Profyris, C., Cheema, S., Zang, D., Azari, M., Boyle, K., & Petratos, S. (2004). Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 15: 415–436.
47. Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johno, M., Naruo, M; Okabe, H., & Takatsuki, K. (1997). Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 79: 1177–1182.
48. Lee, S. M., Yune, T. Y., Kim, S. J., Park, D. O. W., Lee, Y. K., Kim, Y. C., Oh, Y. J., Markelonis, G. J., & Oh, T. H. (2003). Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 20: 1017–1027.
49. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., & Salvemini, D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia / reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, 53:135–159.
50. Lewen, A., Matz, P., & Chan, P. H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*, 17: 871–890.
51. Bao, F., Dekaban, G. A., & Weaver, L. C. (2005). Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *J Neurochem*, 94: 1361–1373.
52. Zini, I., Tomasi, A., Grimaldi, R., Vannini, V., & Agnati, L. F. (1992). Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci Lett*, 138: 279–282.
53. Nagel, S., Su, Y., Horstmann, S., Heiland, S., Gardner, H., Koziol, J., Martinez-Torres, F. J., & Wagner, S. (2008). Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat -effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res*, 1188: 198–206.
54. Mattson, M. P. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms. *Neuromol Med*, 3: 65–94.

55. Adibhatla, R. M., & Hatcher, J. F. (2010). Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. . *Antioxid Redox Signal*, 12:125-69.
56. Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., & Liu, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 43:204-213.
57. Azbill, R. D., Mu, X., Bruce-Keller, A. J., Mattson, M. P., & Springer, J. E. (1997). Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*, 765: 283–290.
58. Xiong, Y., Rabchevsky, A. G., & Hall, E. D. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*, 100: 639–649.
59. Sullivan, P. G., Krishnamurthy, S., Patel, S. P., Pandya, J. D., & Rabchevsky, A. G. (2007). Temporal characterization of mitochondrial bioenergetics after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 24: 991–999.
60. Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J. M., & Nouvelot, A. (1995). Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*, 7: 333–337.
61. Hall, E. D., & Braughler, J. M. (1982). Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity. *J Neurosurg.*, 57: 247–253.
62. Agrawal, S. K., & Fehling, M. G. (1996). Mecanismos de lesión secundaria a los axones de la médula espinal in vitro: papel de Na⁺, Na⁺ -K⁺ -ATPasa, el Na⁺ -H⁺ intercambiador, y el Na⁺ -Ca²⁺ intercambiador. *J Neurosci*, 16 : 545 - 552.
63. Juurlink, B. H., & Paterson, P. G. (1998). Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med*, 21:309-334.
64. Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, aging. *Cell*, 120:483–495.
65. Ray, S. K., Hogan, E. L., & Banik, N. L. (2003). Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: Neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev*, 42: 169–185.
66. Fehling, M. G., & Nguyen, D. H. (2010). Inmunoglobulina G: un tratamiento potencial para atenuar la neuroinflamación después de una lesión de la médula espinal. . *J Clin Immunol*, 30: S109-112.

67. Popovich, P. G., Wei, P., & Stokes, B. T. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*, 377: 443–464.
68. Means, E. D., & Anderson, D. K. (1983). Means, E.D., Anderson, D.K., 1983. Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 42: 707–719.
69. Mabon, P. J., Weaver, L. C., & Dekaban, G. A. (2000). Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin α D: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol*, 166: 52–64.
70. Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 209: 378–388.
71. Klusman, I., & Schwab, M. E. (1997). Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*, 762: 173–184.
72. Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M. E., & Perry, V. H. (1999). Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: Differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, 11: 3648–3658.
73. Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F., & Thoenen, H. (1992). Transforming growth factor beta 1 in the rat brain: Increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol*, 117: 395–400.
74. Anderson, A. J. (2002). Mechanisms and pathways of inflammatory responses in CNS trauma: Spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*, 25: 70–79.
75. Popovich, P. G., & Jones, T. B. (2003). Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: Back to basics. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 13–17.
76. Schwartz, M., & Kipnis, J. (2001). Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends in Molecular Med*, 7: 252–258.
77. Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E., & Schwartz, M. (2002). Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *PNAS*, 99: 15620–15625.
78. Paterniti, I., Genovese, T., Crisafulli, C., Mazzon, E., Di-Paola, R., Galuppo, M., Bramanti, P., & Cuzzocrea, S. (2009). Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 380:179-192.

79. Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., Dong, H. X., Wu, Y. J., Fan, G. S., Jacquin, M. F., Hsu, C. Y., & Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 17: 5395–5406.
80. Beattie, M. S., Farooqui, A. A., & Bresnahan, J. C. (2000). Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 17: 915–925.
81. Imaizumi, T., Kocsis, J. D., & Waxman, S. G. (1997). Anoxic injury in the rat spinal cord: Pharmacological evidence for multiple . *J Neurotrauma*, 14:299-311.
82. Ray, S. K., Hogan, E. L., & Banik, N. L. (2003). Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: Neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev*, 42: 169–185.
83. Hains, B. C., Willis, W. D., & Hulsebosch, C. E. (2003). Temporal plasticity of dorsal horn somatosensory neurons after acute and chronic spinal cord hemisection in rat. *Brain Res*, 970: 238–241.
84. Amemiya, S., Kamiya, T., Nito, C., Inaba, T., Kato, K., Ueda, M., Shimazaki, K., & Katamaya, Y. (2005). Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats. *Eur J Pharmacol*, 516: 125–130.
85. Casha, S., Yu, W. R., & Fehlings, M. G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neurosci*, 103: 203–218.
86. Grossman, S. D., Rosenberg, L. J., & Wrathall, J. R. (2001). Temporal spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*, 168: 273–282.
87. Guest, J. D., Hiester, E. D., & Bunge, R. P. (2005). Demyelination and Schwann cell responses adjacent to injury epicenter cavities following chronic human spinal cord injury. *Exp Neurol*, 192: 384–393.
88. McTigue, D. M. (2008). Potential therapeutic targets for pparγ after spinal cord injury. *PPAR Res*, 517162.
89. Hall, E. D., & Traystman, R. J. (2009). Role of Animal Studies in the Design of Clinical Trials. *Front Neurol Neurosci*, 25: 10–33.
90. Balentine, J. D. (1978). Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*, 39: 236–253.
91. Shan, L., Ma, S., Qiu, X., Zhou, Y., Zhang, Y., Zheng, L., Ren, P., Wang, Y., Fan, Q., Ma, B. (2010). Hydroxysafflor Yellow A protects spinal cords from ischemia/reperfusion injury in rabbits. *BMC Neurosci*, 11: 98.

-
92. Ducker, T. B., Kindt, G. W., & Kempe, L. G. (1971). Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*, 35:700-707.
 93. Wallace, M. C., Tator, C. H., & Lewis, A. J. (1987). Wallace MC, Tator CH, Lewis AJ (1987) Chronic regenerative changes in the spinal cord after cord compression injury in rats. *Surg Neurol* 27: 209–219. *Surg Neurol*, 27: 209–219.
 94. Zhang, Z., Krebs, C. J., & Guth, L. (1997). Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol*, 143: 141–152.
 95. Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358: 1669–1677.
 96. Renault-Mihara, F., Okada, S., Shibata, S., Nakamura, M., Toyama, Y., & Okano, H. (2008). Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *Int J Biochem Cell Biol*, 40:1649-1653.
 97. Katoh-Semba, R., Matsuda, M., Kato, K., & Oohira, A. (1995). Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur J Neurosci*, 7:613-621.
 98. Jones, L. L., Margolis, R. U., & Tuszynski, M. H. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 182: 399–411.
 99. Brodbelt, A. R., & Stoodley, M. A. (2003). Post-traumatic syringomyelia: a review. *J Clin Neurosci*, 10: 401-408.
 100. Ding, Y., Kastin, A. J., & Pan, W. (2005). Neural Plasticity After Spinal Cord Injury. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 1441–1450.
 101. Jain, N., Catania, K. C., & Kaas, J. H. (1997). Deactivation and reactivation of somatosensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature*, 386:495-498.
 102. Kaas, J. H., Qi, H. X., Burish, M. J., Gharbawie, O., Gharbawie, O. A., Onifer, S. M., Massey, J. M. (2008). Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Exp. Neurol*, 209:407-416.
 103. Chen, R., Cohen, L. G., & Hallett, M. (2002). Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, 111:761.
 104. Jones, E. G. (1993). GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex*, 3:361–372.

105. Jacobs, K., & Donoghue, J. (1991). Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* , 251: 944–947.
106. Roy, F. D., Zewdie, E. T., & Gorassini, M. A. (2011). Short-interval intracortical inhibition with incomplete spinal cord injury. *Clin Neurophysiol* , 122: 1387–1395.
107. Cafferty, W. B., Gardiner , N. J., Das, P., Qiu, J., McMahon, S. B., & Thompson, S. W. (2004). Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci* , 24:4432-4443.
108. Giménez y Ribotta, M., Gaviria, M., Menet , V., & Privat , A. (2002). Strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Prog Brain Res* , 137:191-212.
109. Oudega, M., & Xu , X. M. (2006). Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *J Neurotrauma* , 23:453-467.
110. Levi, A. D., Dancausse, H., Li , X., Duncan , S., Horkey, L., & Oliviera, M. (2002). Peripheral nerve grafts promoting central nervous system regeneration after spinal cord injury in the primate. *J Neurosurg* , 96:197-205.
111. Coumans, J. V., Lin, T. T., Dai, H. N., MacArthur, L., McAtee , M., Nash, C., & Bregman, B. S. (2001). Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* , 21: 9334-9344.
112. Nakajima, H., Uchida , K., Guerrero , A. R., Watanabe , S., Sugita, D., Takeura, N., Yoshida, A., Largo, G., Wright, K. T., Johnson, W. E., & Baba, H. (2012). Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* , 29:1614-1625.
113. Straley, K. S., Foo, C. W., & Heilshorn, S. C. (2010). Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *J Neurotrauma* , 27:1-19.
114. Wang, M., Zhaid, P., Chen , X., Schreyer, D. J., Sun , X., & Cui, F. (2011). Bioengineered scaffolds for spinal cord repair. *Tissue Eng Part B Rev* , 17:177-194.
115. Josten, E. A. (2012). Biodegradable biomatrices and bridging the injured spinal cord: the corticospinal tract as a proof of principle. *Cell Tissue Res* , 349:375-395.
116. Krishna, V., Konakondla, S., Nicholas, J., Varma , A., Kindy, M., & Wen, X. (2013). Biomaterial-based interventions for neuronal regeneration and functional recovery in rodent model of spinal cord injury: a systematic review. *J Spinal Cord Med* , 36:174-90.

117. Vaynman, S., & Gomez-Pinilla, F. (2005). License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehab Neural Re*, 19:283–295.
118. Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*, 30:464–472.
119. Fawcett, J. W., Curt, A., Steeves, J. D., Coleman, W. P., Tuszynski, M. H., Lammertse, D., Bartlett, P. F., Blight, A. R., Dietz, V., Ditunno, J., Dobkin, B. H., Havton, L. A., Ellaway, P. H., Fehlings, M. G., Privat, A., Grossman, R., Guest, J. D., Fleiman, N., Nakamura, M., Gaviria, M., & Short, D. (2007). Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. *Spinal Cord*, 45:190-205.
120. Dobkin, B., Barbeau, H., Deforge, D., Ditunno, J., Elashof, R., Apple, D., Basso, M., Behrman, A., Harkema, S., Saulino, M., & Scott, M. (2007). The evolution of walking-related outcomes over the first 12 weeks of rehabilitation for incomplete traumatic spinal cord injury: the multicenter randomized spinal cord injury locomotor trial. *Neurorehabil Neural Repair*, 21:25-35.
121. Weidner, N., Ner, A., Salimi, N., & Tuszynski, M. H. (2001). Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:3513-3518.
122. Bareyre, F. M., Kerschensteiner, M., Raineteau, O., Mettenleiter, T. C., Weinmann, O., & Schwab, M. E. (2004). The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*, 7:269-277.
123. Courtine, G., Roy, R. R., Raven, J., Hodgson, J., McKay, H., Yang, H., Zhong, H., Tuszynski, M. H., & Edgerton, V. R. (2005). Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain*, 128:2338-2358.
124. Ballermann, M., & Fouad, K. (2006). Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci*, 23: 1988–1996.
125. Wolpaw, J. R., & Tennissen, A. M. (2001). Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci*, 24 :807–843.
126. Dobkin, B. H. (2004). Neurobiology of rehabilitation. *Ann NY Acad Sci*, 1038 :148–170.
127. Edgerton, V. R., Tillakaratne, N. J., Bigbee, A. J., De Leon, R. D., & Roy, R. R. (2004). Plasticidad de los circuitos neuronales de la médula después de una lesión. *Annu Rev Neurosci*, 27:145-67.

128. Skinner, R. D., Houle, J. D., Reese, N. B., Berry, C. L., & Garcia-Rill, E. (1996). Effects of exercise and fetal spinal cord implants on the H-reflex in chronically spinalized adult rats. *Brain Res*, 729:127-31.
129. Beaumont, E., Houle, J. D., Peterson, C. A., & Gardiner, P. F. (2004). Passive exercise and fetal spinal cord transplant both help to restore motoneuronal properties after spinal cord transection in rats. *Muscle Nerve*, 29:234–242.
130. Reese, N. B., Skinner, R. D., Mitchell, D., Yates, C., Barnes, N. C., Kiser, T. S., & Garcia-Rill, E. (2006). Restoration of frequency-dependent depression of the H-reflex by passive exercise in spinal rats. *Spinal Cord*, 44:28–34.
131. Rosch, J., Paulus, C., Maisch, U., Kaspar, A., Mauch, E., & Kornhuber, H. H. (1997). The effects of therapy on spasticity utilizing a motorized exercise-cycle. *Spinal Cord*, 35:176–78.
132. Kiser, T. S., Reese, N. B., Maresh, T., Hearn, S., Yates, C., Skinner, R. D., Pait, T. G., & Garcia-Rill, E. (2005). Use of a motorized bicycle exercise trainer to normalize frequency-dependent habituation of the H-reflex in spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*, 28:241–245.
133. Gazula, V. R., Roberts, M., Luzzio, C., Jawad, A. F., & Kalb, R. G. (2004). Effects of limb exercise after spinal cord injury on motor neuron dendrite structure. *J Comp Neurol*, 476:130–145.
134. Thota, A. S., & Carlson, R. (2001). Recovery of locomotor function after treadmill training of incomplete spinal cord injured rats. *Biomed Sci Instrum*, 37:63–67.
135. Van Meeteren, N. L., Eggers, R., Lankhorst, A. J., Gispen, W. H., & Hamers, F. P. (2003). Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. *J Neurotrauma*, 20:1029–1037.
136. Hutchinson, J., Gómez-Pinilla, F., Crowe, M. J., Ying, Z., & Basso, D. M. (2004). Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain*, 127:1403–1414.
137. De Leon, R. D., Hodgson, J. A., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (1998). Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. *J Neurophysiol*, 79:1329–1340.
138. De Leon, R. D., Hodgson, J. A., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (1999). Retention of hindlimb stepping ability in adult spinal cats after the cessation of step training. *J Neurophysiol*, 81:85–94.
139. Tillakaratne, N. J., De Leon, R. D., Hoang, T. X., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Tobin, A. J. (2002). Use-dependent modulation of inhibitory capacity in the feline lumbar spinal cord. *J Neurosci*, 22:3130–3143.

140. Courtine, G., Song, B., Roy, R. R., Zhong, H., Herrmann, J. E., Ao, Y., Qi, J., Edgerton, V. R., & Sofroniew, M. V. (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med*, 14:69-74.
141. Beekhuizen, K. S., & Field-Fote, C. E. (2005). Massed practice versus massed practice with stimulation: effects on upper extremity function and cortical plasticity in individuals with incomplete cervical spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 19:33-45.
142. Winchester, P., McColl, R., Querry, R., Foreman, N., Mosby, J., Tansey, K., & Williamson, J. (2005). Changes in supraspinal activation patterns following robotic locomotor therapy in motor-incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 19:313-324.
143. Hoffman, L. R., & Field-Fote, C. E. (2007). Cortical reorganization following bimanual training and somatosensory stimulation in cervical spinal cord injury: A case report. *Phys Ther*, 87:208-223.
144. Knikou, M. (2012). Plasticity of corticospinal neural control after locomotor training in human spinal cord injury. *Neural Plast*, 2012:254948.
145. Thomas, S. L., & Gorassini, M. A. (2005). Increases in corticospinal tract function by treadmill training after incomplete spinal cord injury. *J Neurophysiol*, 94:2844-2855.
146. Norton, J. A., & Gorassini, M. A. (2006). Changes in cortically related intermuscular coherence accompanying improvements in locomotor skills in incomplete spinal cord injury. *J Neurophysiol*, 95:2580-2589.
147. Jackson, A., Mavoori, J., & Fetzi, E. E. (2006). Long-term motor cortex plasticity induced by an electronic neural implant. *Nature*, 444:56-60.
148. Kataoka, K., Suzuki, Y., Kitada, M., Hashimoto, T., Chou, H., Bai, H., Ohta, M., Wu, S., Susuki, K., & Ide, C. (2004). Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats. *Tissue Eng*, 10:493-504.
149. Stokols, S., & Tuszynski, M. H. (2006). Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials*, 27:443-451.
150. Stokols, S., Sakamoto, J., Breckon, C., Holt, T., Weiss, J., & Tuszynski, M. H. (2006). Templated agarose scaffolds support linear axonal regeneration. *Tissue Eng*, 12:2777-2787.
151. Chen, J., Zhang, Z., Liu, J., Zhou, R., Zheng, X., Chen, T., Wang, L., Huang, M., Yang, C., Bai, X., & Jin, D. (2014). Acellular spinal cord scaffold seeded with bone marrow stromal cells protects tissue and promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *J Neurosci Res*, 92:307-317.

152. Bakshi, A., Fisher, O., Dagci, T., Himes, B. T., Fischer, I., & Lowman, A. (2004). Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*, 13:322-329.
153. Hejcl, A., Urdzikova, L., Sedy, J., Lesny, P., Pradny, M., Michalek, J., Burian, M., Hajek, M., Zamecnik, J., Jendelova, P., & Sykova, E. (2008). Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine*, 8:67-73.
154. Woerly, S., Doan, V. D., Sosa, N., de Vellis, J., & Espinosa-Jeffrey, A. (2004). Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J Neurosci Res*, 75:262-272.
155. Olayo, R., Rios, C., Salgado-Ceballos, H., Cruz, G. J., Morales, J., Olayo, M. G., Alcaraz-Zubeldia, M., Alvarez, A. L., Mondragon, R., Morales, A., & Diaz-Ruiz, A. (2008). Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci Mater Med*, 19:817-826.
156. Cruz, G. J., Mondragón-Lozano, R., Diaz-Ruiz, A., Manjarrez, J., Olayo, R., Salgado-Ceballos, H., Olayo, M.G., Morales, J., Alvarez-Mejia, L., Morales, A., Mendez-Armenta, M., Plascencia, N., Fernandez, M., & Rios, C. (2012). Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J Mater Sci Mater Med*, 23:2583-2592.
157. Morales-Guadarrama, A., Salgado-Ceballos, H., Morales, J., Ríos, C., Cruz, G. J., Diaz-Ruiz, A., Olayo, M G., Alvarez-Mejia, L., Mondragón-Lozano, R., & Olayo, R. (2013). CAT and MRI Studies of Spinal Cord Injured Rats Implanted with PPy/I. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 34:145-155.
158. Khan, A., Jawaid, M., Parwaz, A. A., Khan, P., & Asiri, A. M. (2017). *Electrically Conductive Polymers and Polymer Composites: From Synthesis to Biomedical Applications*. Arabia Saudita: John Wiley & Sons, Inc.
159. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Baharavand, H., Kiani, Al-Deyab, S. S., & Ramakrishna, S. (2011). Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 5:e17-35.
160. Chronakis, I. S., Grapenson, S., & Jakob, A. (2006). Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: electrical and morphological properties. *Polymer*, 47: 1597-1603.
161. Zhang, Q., Yan, Y., Li, S., & Feng, T. (2010). The synthesis and characterization of a novel biodegradable and electroactive polyphosphazene for nerve regeneration. *Mater Sci Eng C*, 30: 160-166.

162. Chougule, M. A., Pawar, S. G., Godse, P. R., Mulik, R. N., Sen, S., & Patil, V. B. (2011). Synthesis and characterization of polypyrrole (PPy) thin films. *Soft Nanoscience Letters*, 1: 6-10.
163. Vidal, J. C., Garcia, E., & Castillo, J. R. (1999). In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in a flow system: determination of total cholesterol in serum. *Analytica Chimica Acta.*, 38:213-222.
164. Lopez-Crapez, E., Livache, T., Marchand, J., & Grenier, J. (2001). K-ras mutation detection by hybridization to a polypyrrole DNA chip. *Clin Chem*, 47:186-194.
165. Campbell, T. E., Hodgson, A. J., & Wallace, G. G. (1999). Incorporation of erythrocytes into polypyrrole to form the basis of a biosensor to screen for rhesus (D) blood groups and rhesus (D) antibodies. *Electroanalysis*, 11: 215-222.
166. Van de Leur, R. H., & Van der Waal, A. (1999). Gas and vapour detection using polypyrrole. *Synthetic Metals*, 102: 1330-1331.
167. Sanghvi, A. B., Miller, K. P., Belcher, A. M., & Schmidt, C. E. (2005). Biomaterials fictionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer. *Nat Mater*, 4: 496-502.
168. Reynolds, J. R., Ly, H., Selampinar, F., & Kinlen, P. J. (1999). Controlled drug and biomolecule release from electroactive host polymer systems. *Polymer Preprints*, 40:307.
169. Otero, T. F., & Cortés, M. T. (2003). Artificial muscles with tactile sensitivity. *Adv Mater*, 15: 279-289.
170. Wang, X., Gu, X., Yuan, C., Chen, S., Zhang, P., Zhang, T., Yao, J., Chen, F., & Chen, G. (2004). Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 68: 411-422.
171. Williams, R. L., & Doherty, P. J. (1994). A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies. *J Mater Sci-Mater M*, 5: 429-433.
172. Castano, H., O'Rear, E. A., McFetridge, P. S., & Sikavitsas, V. I. (2004). Polypyrrole thin films formed by admicellar polymerization support the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci*, 4: 785-794.
173. Song, H. K., Toste, B., Ahmann, K., Hoffman-Kim, D., & Palmore, G. T. (2006). Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: a new platform for characterizing neurite extension in complex environments. *Biomaterials*, 27: 473-484.
174. Ateh, D. D., Vadgama, P., & Navasaria, H. A. (2006). Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *J. R. Soc. Interface*, 3: 741-752.

175. Gomez, N., & Schmidt, C. E. (2007). Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. *J Biomed Mater Res*, 81: 135-149.
176. Zhang, Z., Rouabhia, M., Wang, Z., Roberge, C., Shi, G., Roche, P., Li, J., & Dao, L. H. (2007). Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artif Organs*, 31:13-22.
177. Lee, J. Y., Bashur, C. A., Goldstein, A. S., & Schmidt, C. E. (2009). Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, 30:4325-4334.
178. Bendrea, A. D., Cianga, L., & Cianga, I. (2011). Review paper: progress in the field of conducting polymers for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*, 26:3-84.
179. Kai, D., Prabhakaran, M. P., Jin, G., & Ramakrishna, S. (2011). Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 99: 376-385.
180. Zuñiga-Aguilar, E., Olayo, R., Ramírez-Fernández, O., Morales, J., & Godínez, R. (2014). Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *J Biomater Sci Polym Ed*, 25:729-747.
181. Vernitskaya, T. V., & Efimov, O. N. (1997). Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and. *Russ Chem Rev*, 66: 443-457.
182. Sadki, S., Schottland, P., Brodie, N., & Sabouraud, G. (2000). The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews*, 29: 283-293.
183. Rao, C. R., Muthukannan, R., Jebin, J. A., Raj, T. A., & Vijayan, M. (2013). Synthesis and properties of polypyrrole obtained from a new Fe (III) complex as oxidizing agent. *Indian J Chem*, 52A: 744-748.
184. Cruz, G. J., Morales, J., & Olayo, R. (1999). Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin solid films*, 342: 119-126.
185. Kumar, R., Singh, S., & Yadav, B. C. (2015). Conducting polymers: synthesis, properties and applications. *IARJSET*, 2:110-124.

-
186. Shen, M., & Bell, A. T. (1979). A review of recent advances in plasma polymerization. Berkeley, CA: American Chemical Society.
 187. Cruz, G. J., Olayo, M. G., López, O. G., Gómez, L., Morales, J., & Olayo, R. (2010). Nanospherical particles of polypyrrole synthesized and doped by plasma. *Polymer*, 51: 4314-4318.
 188. Gaur, S., Vergason, G., & Van Etten. (2000). Plasma polymerization: theory and practice. 43rd Annual technical conference proceedings (págs. 267-271). Denver: Society of Vacuum Coaters.
 189. Denes, F. S., & Manolache, S. (2004). Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science. *Prog Polym Sci*, 29: 815-885.
 190. Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P., & Huang, N. (2002). Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater Sci Eng R*, 36: 143-206.
 191. Von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., & Weltmann, K. D. (2013). Plasmas for medicine. *Physics Reports*, 530: 291-320.
 192. Gómez, L. M., Olayo, M. G., Cruz, G. J., López-García, O. G., González-Torres, M., De Jesús, C., & González-Salgado, F. (2012). Effect of energy in the size of pyrrole-derived particles synthesized by plasma. *Superficies y Vacío*, 25: 88-91.
 193. Dams, R., Vangeneugden, D., & Vanderzande, D. (2013). Atmospheric pressure plasma polymerization of in situ doped polypyrrole. *Open Plasma Phys J*, 6: 7-13.
 194. Shi, F. F. (1996). Recent advances in polymer thin films prepared by plasma polymerization: Synthesis, structural characterization, properties and applications. *Surface and Coatings Technology*, 82: 1-15.
 195. Thiry, D., Konstantinidis, S., Cornil, J., & Snyders, R. (2016). Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: A critical review. *Thin Solid Films*, 606: 19-44.

-
196. Wan, Y., Qu, X., Lu, J., Zhu, C., Wan, L., Yang, J., Bei, J., & Shenguo, W. (2004). Characterization of surface property of poly (lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment. *Biomaterials*, 25: 4777-4783.
 197. Davidson, M. R., Mitchell, S. A., & Bradley, R. H. (2004). UV-ozone modification of plasma-polymerised acetonitrile films for enhanced cell attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34: 213-219.
 198. Mitchell, S. A., Davidson, M. R., & Bradley, R. H. (2005). Improved cellular adhesion to acetone plasma modified polystyrene surfaces. *J Colloid Interface Sci*, 281: 122-129.
 199. Shen, H., Hu, X., Yang, F., Bei, J., & Wang, S. (2007). Combining oxygen plasma treatment with anchorage of cationized gelatin for enhancing cell affinity of poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 28:4219-4230.
 200. Řezníčková, A., Novotna, Z., Kolska, Z., Kasalkova, N. S., Rimpelova, S., & Svorcik, V. (2015). Enhanced adherence of mouse fibroblast and vascular cells to plasma modified polyethylene. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 52:259-266.
 201. Aw, M. S., Simovic, S., Addai-Mensah, J., & Losic, D. (2011). Polymeric micelles in porous and nanotubular implants as a new system for extended delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Materials Chemistry*, 21: 7082-7089.
 202. Labay, C., Canal, J. M., & Canal, C. (2012). Relevance of surface modification of polyamide 6.6 fibers by air plasma treatment on the release of caffeine. *Plasma Processes and Polymers*, 9:165-173.
 203. Yoshida, S., Hagiwara, K., Hagiwara, T., & Hotta, A. (2013). Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology*, 233: 99-107.
 204. Labay, C., Canal, J. M., Modic, M., Cvelbar, U., Quiles, M., Armengol, M. A., Arbos, M. A., Gil, F. J., & Canal, C. (2015). Antibiotic-loaded polypropylene surgical meshes with suitable biological behaviour by plasma functionalization and polymerization. *Biomaterials*, 71:132-144.

-
205. Canal, C., Khurana, K., Gallinetti, S., Bhatt, S., Pulpytel, J., Arefi-Fhonsari, F., & Ginebra, M. P. (2016). Design of calcium phosphate scaffolds with controlled simvastatin release by plasma polymerisation. *Polymer*, 92: 170-178.
206. Ho, M. H., Hou, L. T., Tu, C. Y., Hsieh, H. J., Lai, J. Y., Chen, W. J., & Wang, D. M. (2006). Promotion of cell affinity of porous PLLA scaffolds by immobilization of RGD peptides via plasma treatment. *Macromol Biosci*, 6: 90-98.
207. Mangindaan, D., Yared, I., Kurniawan, H., Sheu, J. R., & Wang, M. J. (2012). Modulation of biocompatibility on poly(vinylidene fluoride) and polysulfone by oxygen plasma treatment and dopamine coating. *J Biomed Mater Res A.*, 100: 3177-3188.
208. He, F., Li, J., & Ye, J. (2013). Improvement of cell response of the poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite scaffold with unidirectional pore structure by the surface immobilization of collagen via plasma treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103:209-216.
209. Zhao, M., Li, H., Liu, W., Guo, Y., & Chu, W. (2016). Plasma treatment of paper for protein immobilization on paper-based chemiluminescence immunodevice. *Biosens Bioelectron*, 79:581-588.
210. Bazaka, K., Jacob, M. V., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2011). Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomater*, 7:2015-2028.
211. Park, K., Ju, Y. M., Son, J. S., Ahn, K. D., & Han, D. K. (2007). Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed*, 18: 369-382.
212. Park, H., Lee, J. W., Park, K. E., Park, W. H., & Lee, K. Y. (2010). Stress response of fibroblasts adherent to the surface of plasma-treated poly(lactic-co-glycolic acid) nanofiber matrices. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 77:90-95.

-
213. Roh, H. S., Myung, S. W., Jung, S. C., & Kim, B. H. (2015). Fabrication of 3D Scaffolds with Nano-Hydroxyapatite for Improving the Preosteoblast Cell-Biological Performance. *J Nanosci Nanotechnol*, 15: 5585-5588.
214. Roh, H. S., Lee, C. M., Hwang, Y. H., Kook, M. S., Yang, S. W., Lee, D., & Kim, B. H. (2017). Addition of MgO nanoparticles and plasma surface treatment of three-dimensional printed polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for improving bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 74:525-535.
215. Junkar, I., Vesel, A., Cvelbar, U., Mozetic, M., & Strnad, S. (2009). Influence of oxygen and nitrogen plasma treatment on polyethylene terephthalate (PET) polymers. *Vacuum*, 84:83-85.
216. Solouk, A., Cousins, B. G., Mirzadeh, H., & Seifalian, A. M. (2011). Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: A review. *Biotechnol Appl Biochem*, 58:311-327.
217. Santos, M., Bilek, M. M., & Wise, S. G. (2015). Plasma-synthesised carbon-based coatings for cardiovascular applications. *Biosurface and Biotribology*, 1: 146-160.
218. Taheran, L., Zarrini, G., Khorram, S., & Zakerhamidi, M. S. (2016). Plasma surface modification as a new approach to protect urinary catheter against *Escherichia coli* biofilm formation. *Iran J Microbiol*, 8: 257-262.
219. Alves, P., Cardoso, R., Correia, T. R., Antunes, B. P., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2014). Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 113: 25-32.
220. Yao, K., Huang, X. D., Huang, X. J., & Xu, Z. K. (2006). Improvement of the surface biocompatibility of silicone intraocular lens by the plasma-induced tethering of phospholipid moieties. *J Biomed Mater Res A*, 78: 684-692.
221. Huang, X. D., Yao, K., Zhang, Z., Zhang, Y., & Wang, Y. (2010). Uveal and capsular biocompatibility of an intraocular lens with a hydrophilic anterior surface and a hydrophobic posterior surface. *J Cataract Refract Surg*, 36:290-298.

-
222. Wang, Y., Shao, Y., Matson, D. W., Li, J., & Lin, Y. (2010). Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing. *ACS nano*, 4: 1790-1798.
223. Kao, C. H., Chen, H., Hou, F. Y., Chang, S. W., Chang, C. W., Lai, C. S., Chen, C. P., He, Y. Y., Lin, S., & Hsieh, K. M. (2015). Fabrication of multianalyte CeO₂ nanograin electrolyte–insulator–semiconductor biosensors by using CF₄ plasma treatment. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 5:71-77.
224. Zhang, Z., Zhang, S., He, L., Peng, D., Yan, F., Wang, M., Zhao, J., Zhang, H., & Fang, S. (2015). Feasible electrochemical biosensor based on plasma polymerization-assisted composite of polyacrylic acid and hollow TiO₂ spheres for sensitively detecting lysozyme. *Biosens Bioelectron*, 74: 384-390.
225. Rahman, S. F., Yusof, N. A., Hashim, U., Hushiarian, R., MN, M., Hamidon, M. N., Zawawi, R. M., & Fathil, M. F. (2016). Enhanced sensing of dengue virus DNA detection using O₂ plasma treated-silicon nanowire based electrical biosensor. *Anal Chim Acta*, 942:74-85.
226. Chae, M. S., Kim, J., Jeong, D., Kim, Y., Roh, J. H., Lee, S. M., Heo, Y., Kang, J. Y., Lee, J. H., Yoon, D. S., Kim, T. G., Chang, S. T., & Hwang, K. S. (2017). Enhancing surface functionality of reduced graphene oxide biosensors by oxygen plasma treatment for Alzheimer's disease diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 92:610-617.
227. Mändl, S., & Rauschenbach, B. (2002). Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. *Surface and Coatings Technology*, 156: 276-283.
228. Liang, H., Shi, B., Fairchild, A., & Cale, T. (2004). Applications of plasma coatings in artificial joints: an overview. *Vacuum*, 73: 317-326.
229. Hauser, J., Zietlow, J., Köller, M., Esenwein, S. A., Halfmann, H., Awakowicz, P., & Steinau, H. U. (2009). Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *J Mater Sci Mater Med*, 20:2541-2548.

-
230. Hoene, A., Walschus, U., Patrzyk, M., Finke, B., Lucke, S., Nebe, B., Schroeder, K., Ohl, A., & Schlosser, M. (2010). In vivo investigation of the inflammatory response against allylamine plasma polymer coated titanium implants in a rat model. *Acta Biomaterialia*, 6: 676-683.
231. Gao, A., Hang, R., & Chu, P. K. (2017). Recent advances in anti-infection surfaces fabricated on biomedical implants by plasma-based technology. *Surface and Coatings Technology*, 312: 2-6.
232. Baxter, H. C., Campbell, G. A., Whittaker, A. G., Jones, A. C., Aitken, A., Simpson, A. H., Casey, M., Bountiff, L., Gibbard, L., & Baxter, R. L. (2005). Elimination of transmissible spongiform encephalopathy infectivity and decontamination of surgical instruments by using radio-frequency gas-plasma treatment. *Journal of general virology*, 86: 2393-2399.
233. Kylian, O., Hasiwa, M., & Rossi, F. (2006). Plasma-based de-pyrogenization. *Plasma Processes Polym*, 3: 272–275.
234. Rossi, F., Kylian, O., & Hasiwa, M. (2006). Decontamination of surfaces by low pressure plasma discharges. *Plasma Processes Polym*, 3: 431–442.
235. Rossi, F., Kylian, O., Rauscher, H., Hasiwa, M., & Gilliland, D. (2009). Low pressure plasma discharges for the sterilization and decontamination of surfaces. *New J Phys*, 11: 115017.
236. Banerjee, K. K., Kumar, S., Bremmell, K. E., & Griesser, H. J. (2010). Molecular-level removal of proteinaceous contamination from model surfaces and biomedical device materials by air plasma treatment. *J Hosp Infect*, 76: 234–242.
237. Wang, J., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2004). Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films. *Thin Solid Films*, 446:205-217.

-
238. Morales, J., Osorio, C., Montiel, R., Vázquez, H., & Olayo, R. (2008). Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol. *Superficies y Vacío*, 21: 1-4.
239. Morales, J., Olayo, M. G., Cruz, G. J., & Olayo, R. (2002). Synthesis by plasma and characterization of bilayer aniline-pyrrole thin films doped with iodine. *J Polym Sci Part B Polymer Physics*, 40:1850-1856.
240. Morales, J., Olayo, M. G., Cruz, G. J., & Olayo, R. (2002). Plasma polymerization of random polyaniline-polypyrrole-iodine copolymers. *Applied Polymer Science*, 85: 263-270.
241. Li, W., Ismat Shah, S., Sung, M., & Huang, C. P. (2002). Structure and size distribution of TiO₂/TiO₂ nanoparticles deposited on stainless steel mesh. *J Vac Sci Technol B*, 20:2303.
242. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203487/NOM-060-ZOO-1999__280601.pdf
243. Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12:1-21.
- 244.
245. Piantino, J., Burdick, J. A., Goldberg, D., Langer, R., & Benowitz, L. I. (2006). An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 201:359-367.
246. King, V. R., Alovskaya, A., Wei, D. Y., Brown, R. A., & Priestley, J. V. (2010). The use of injectable forms of fibrin and fibronectin to support axonal ingrowth after spinal cord injury. *Biomaterials*, 31:4447-4456.

-
247. Cigognini, D., Satta, A., Colleoni, B., Silva, D., Donega`, M., Antonini, S., & Gelain, F. (2011). Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold. *PLoS ONE*, 6:e19782.
248. Tsai, E. C., Dalton, P. D., Shoichet, M. S., & Tator, C. H. (2006). Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection . *Biomaterials*, 27:519-533.
249. Kotwal, A., & Schmidt, C. E. (2001). Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials*, 22:1055-1064.
250. Fine, E. G., Valentini , R. F., Bellamkonda , R., & Aebischer, P. (1991). Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials*, 12:775-780.
251. HajjHassan, M., Chodavarapu, V., & Musallam, S. (2008). Neuro MEMS:neural probe microtechnologies. *Sensors*, 8:6704-6726
252. Smith, R. R., Brown, E. H., Shum-Siu, A., Whelan, A., Burke , D. A., Benton, R. L., & Magnuson, D. S. K. (2009). Swim training initiated acutely after spinal cord injury is ineffective and induces extravasation in and around the epicenter. *J Neurotrauma*, 26:1017-1027.
253. Nothias, J. M., Mitsui, T., Shumsky , J. S., Fischer , I., Antonacci, M. D., & Murray, M. (2005). Combined effects of neurotrophin secreting transplants exercise, and serotonergic drug challenge improve function in spinal rats. *Neurorehabil Neural Repair*, 19:296-312.
254. Engesser-Cesar, C., Ichiyama, R. M., Nefas, A. L., Hill, M. A., Edgerton, V. R., Cotman, C. W., & Anderson, A. J. (2007). Wheel running following spinal cord injury improves locomotor recovery and stimulates serotonergic fiber growth. *Eur J Neurosci*, 25:1931-1939.
255. Grasso, R., Ivanenko, Y. P., Zago , M., Molinari, M., Scivoletto, G., Castellano, V., Macellari, V., & Lacquaniti, F. (2004). Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients. *Brain*, 127:1019-1034.

-
256. Edgerton, V. R., Courtine, G., Gerasimenko, Y. P., Lavrov, I., Ichiyama, R. M., Fong, A. J., Cai, L. L., Otsoshi, C. K., Tillakaratne, N. J., & Burdick, J. W. (2008). Training locomotor networks. *Brain Res Rev*, 57:241-254.
257. Moshonkina, T., Avelev, V., Gerasimenko, Y., Mathur, R., & Bijlani, R. L. (2002). Treadmill training accelerates restoration of locomotion after complete spinal cord transection in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol*, 46:499-503.
258. Oh, M. J., Seo, T. B., Kwon, K. B., Yoon, S. J., Elzi, D. J., Kim, B. G., & Namgung, U. (2009). Axonal outgrowth and Erk1/2 activation by training after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 26:2071-2082.
259. Foret, A., Quertainmont, R., Botman, O., Bouhy, D., Amabili, P., Brook, G., Schoenen, J., & Franzen, R. (2010). Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem*, 112:762-772.
260. Sun, T., Ye, C., Wu, J., Zhang, Z., Cai, Y., & Yue, F. (2013). Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 8:2540-2547.

Anexo 1. Patente



US008563626B2

(12) **United States Patent**
Olayo Gonzalez et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,563,626 B2**
(45) **Date of Patent:** **Oct. 22, 2013**

(54) **USE OF PLASMA-SYNTHESISED
PYRROLE-DERIVED POLYMERS FOR THE
NEUROPROTECTION AND RECONNECTION
OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM**

(58) **Field of Classification Search**
USPC 523/113; 528/423
See application file for complete search history.

(75) Inventors: **Roberto Olayo Gonzalez**, México (MX); **Juan Morales Corona**, México (MX); **Rodrigo Lozano Mondragon**, México (MX); **Ana Laura Alvarez Mejia**, México (MX); **Juan Carlos Axayacatl Morales Guadarrama**, México (MX); **Luis Camilo Rios Castañeda**, México (MX); **María de los Angeles Araceli Diaz Ruiz**, México (MX); **Guillermo Jesús Cruz Cruz**, México (MX); **María Guadalupe Olayo González**, México (MX); **Hermelinda Salgado Ceballos**, México (MX)

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

6,095,148 A	8/2000	Shastri
2003/0066987 A1	4/2003	Schmidt
2003/0166831 A1	9/2003	Shastri

OTHER PUBLICATIONS

Cao, et al., "Preparation of Polypyrrole Film by Remote Plasma Polymerization", *Chinese J. Synthetic Chemistry*, 4(3):200 (1996) doi:cnki-ISSN:10051511.0.1996-03-002 (translation).

Lee, et al., "Carboxylic Acid-Functionalized Conductive Polypyrrole as a Bioactive Platform for Cell Adhesion", *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1692-1695, 2006.

Lee, et al., "Carboxy-Endcapped Conductive Polypyrrole: Biomimetic Conducting Polymer for Cell Scaffolds and Electrodes", *Langmuir*, vol. 22, 9816-9819, 2006.

Lee, et al., "Neuroactive conducting scaffolds: nerve growth factor conjugation on active ester-functionalized polypyrrole", *J. Royal Soc. Interface*, vol. 6, pp. 801-810, 2009.

Cruz, G.J., et al., Films Obtained by Plasma Polymerization of Pyrrole; *The Solid Films.*, vol. 342, issues 1-2, Mar. 26, 1999, pp. 119-126.

Primary Examiner — Kriellion Sanders

(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Browdy and Neimark, PLLC

(73) Assignees: **Universidad Autonoma Metropolitana**, Mexico City (MX); **Instituto Nacional de Neurología Y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez**, Mexico City (MX); **Instituto Mexicano del Seguro Social**, Mexico City (MX); **Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares**, Mexico City (MX)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **12/602,613**

(22) PCT Filed: **Jun. 1, 2007**

(86) PCT No.: **PCT/MX2007/000067**

§ 371 (c)(1),
(2), (4) Date: **Jun. 1, 2010**

(87) PCT Pub. No.: **WO2008/147166**

PCT Pub. Date: **Dec. 4, 2008**

(65) **Prior Publication Data**

US 2010/0234488 A1 Sep. 16, 2010

(51) **Int. Cl.**
A61F 2/02 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**
USPC **523/113; 528/423**

(57) **ABSTRACT**

The purpose of the present invention is to demonstrate that semiconducting and non-biodegradable implants made with polypyrrole and polyethylenglycol copolymers and iodine-doped and plasma-synthesized pyrrole polymers, have a neuroprotector effect and induce the reconnection of the spinal cord after an injury; this effect was proved in a model involving a complete section of the spinal cord in rats; the results of the functional evaluation demonstrated 5 times greater recovery in animals implanted with the polypyrrole-polyethylenglycol copolymer compared with the control group which only underwent a complete section of the spinal cord; in addition, the functional recovery of the group with iodine-doped polypyrrole was ten times greater compared to the control group; in the histological study various inflammatory and immune cells were identified at the injury site in the three experimental groups with and without implants and the integration of the polymers in the nervous tissue of the spinal cord was also observed; finally, no respiratory, renal or skin infections, adverse effects or rejection of the biomaterials were found in any of the animals.

3 Claims, 7 Drawing Sheets

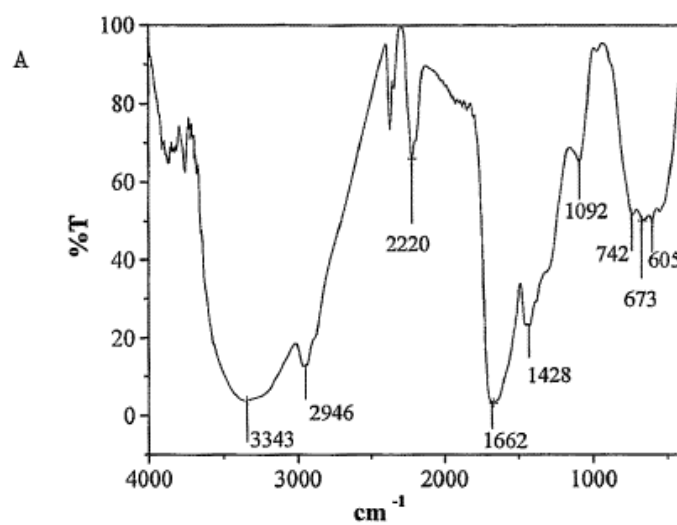


FIG. 1A

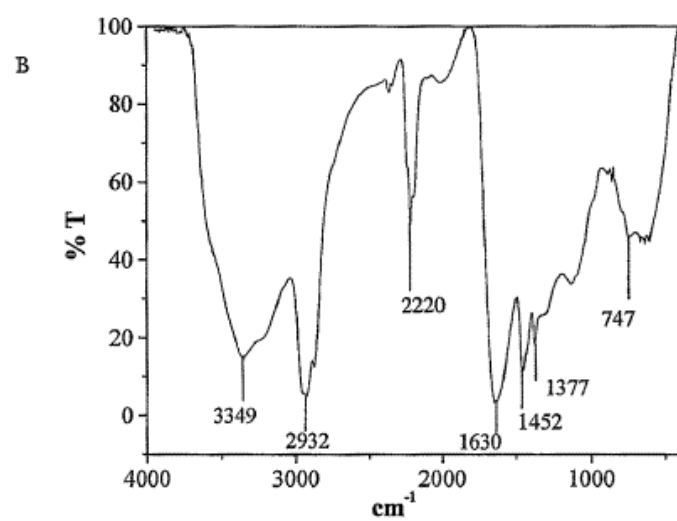


FIG. 1B



FIG. 2A

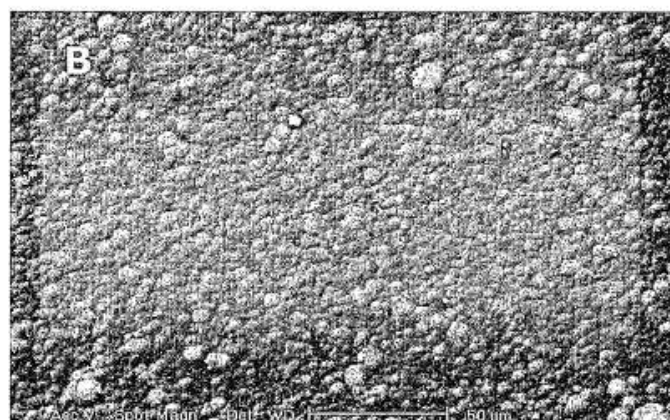


FIG. 2B

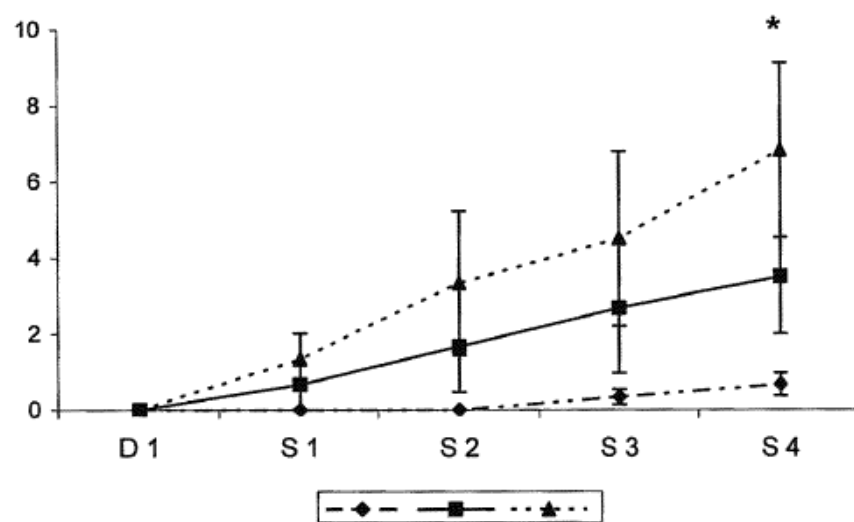


FIG. 3

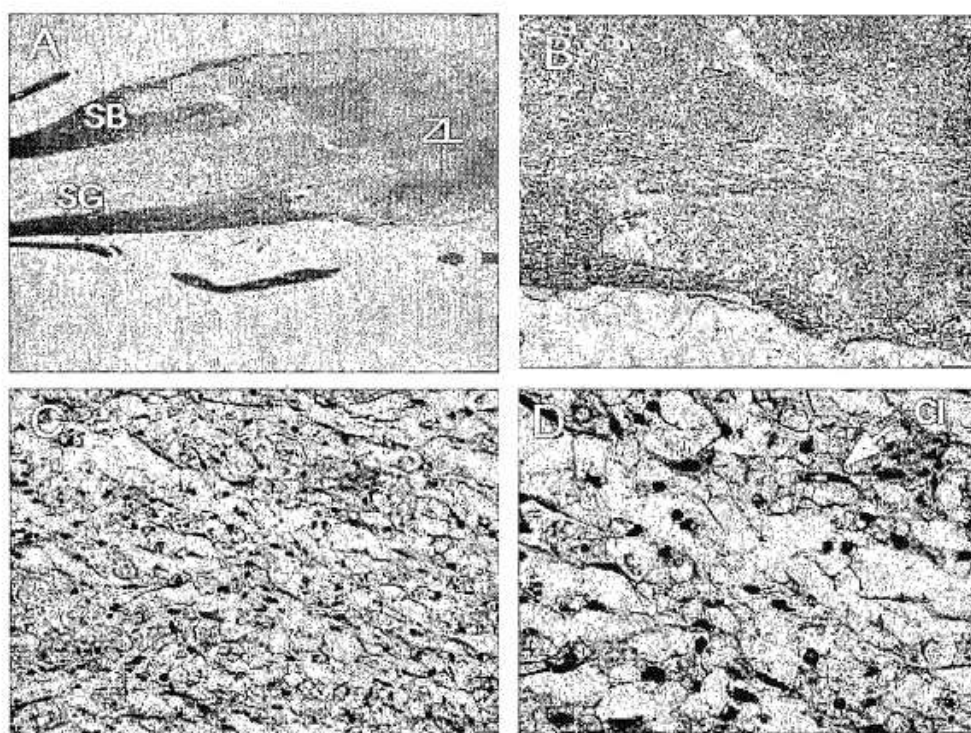


FIG. 4

Anexo 2. Artículo de investigación

Effect of Pyrrole Implants Synthesized by Different Methods on Spinal Cord Injuries of Rats

L. Álvarez-Mejía^{1,3}, H. Salgado-Ceballos³, R. Olayo², G.J. Cruz⁴, M.G. Olayo⁴, A. Díaz-Ruiz⁵, C. Ríos⁵, R. Mondragón-Lozano^{1,5}, A. Morales-Guadarrama^{1,7}, S. Sánchez-Torres^{3,6}, J. Morales²

¹Depto. de Ing. Eléctrica, ² Depto. de Física, UAM-Iztapalapa. ³ Centro Médico Nacional Siglo XXI.

⁴Depto. de Física, ININ, ⁵Depto. de Neuroquímica, INNN Manuel Velasco Suárez, ⁶Escuela Superior de Medicina, IPN. ⁷Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica

ABSTRACT

Polypyrrole (PPy) and polypyrrole/polyethylene glycol (PPy/PEG) implants synthesized by chemical, electrochemical, and plasma polymerization methods were implanted into the injured spinal cord of rats to determine their effect on motor function recovery. Before implantation, the materials were characterized by infrared (IR) spectroscopy. An experimental model of traumatic spinal cord injury (TSCI) by complete transection at thoracic level 9, in rats was used. The polymer implants were inserted immediately after transection. Motor function recovery was evaluated once a week during 5 weeks using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) motor scale. Histological evaluation was done at the end of the recovery evaluation period using hematoxylin/eosin stain. Results showed that animals implanted with polymers synthesized by plasma had a better integration into the nerve tissue, less inflammatory response and a better functional recovery than animals implanted with polymers synthesized by chemical or electrochemical methods.

Keywords: **fpolypyrrole implants, chemical synthesis, electrochemical synthesis, plasma synthesis, traumatic spinal cord injury.**

Correspondencia:

Juan Morales Corona

Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina Del. Iztapalapa, México D.F. C.P. 09340.

Correo electrónico: jmor@xanum.uam.mx

Fecha de recepción:

29 de abril de 2014

Fecha de aceptación:

21 de octubre de 2014

RESUMEN

En el presente trabajo se comparó el efecto de implantes poliméricos derivados del pirrol (polipirrol o PPy) y del copolímero polipirrol/polietilenglicol (PPy/PEG), obtenidos por diferentes métodos de síntesis: químico, electroquímico y polimerización por plasma con el propósito de determinar si el método de síntesis puede influir sobre el efecto que producen al ser implantados después de una lesión traumática de la médula espinal de ratas. Antes de realizar el implante, las características químicas y estructurales de los polímeros fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo (IR). Se utilizó un modelo experimental de lesión traumática de médula espinal (LTME) por sección completa en ratas. La LTME se realizó a nivel torácico 9 y el polímero fue implantado de inmediato en la zona de lesión. La recuperación de la función motora se evaluó mediante la escala Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) una vez por semana durante 5 semanas. La evaluación histológica se realizó al término del seguimiento con la tinción de hematoxilina/eosina. Los resultados muestran que los animales implantados con polímeros sintetizados por plasma se integraron mejor al tejido nervioso, redujeron la respuesta inflamatoria y favorecieron una mayor recuperación funcional en comparación con los animales implantados con materiales sintetizados por métodos químicos o electroquímicos.

Palabras clave: implantes de polipirrol, síntesis química, síntesis electroquímica, síntesis por plasma, lesión traumática de la médula espinal.

INTRODUCTION

Traumatic spinal cord injuries (TSCI) trigger a series of secondary events that increase the original damage, prevent axonal regeneration and produce different degrees of functional impairment below the site of injury which can lead to permanent paralysis [1].

To date, due to the complex pathophysiology of TSCI, no therapeutic strategy has been effective to restore the lost functions after lesion. Many strategies have been suggested and attempted in order to find a solution to this problem. One proposal in this field consists of using transplants of tissues or cells to promote axonal regeneration and functional recovery after TSCI [2]. Among experimental transplants that have produced positive results are fetal tissue [3], fresh or predegenerate peripheral nerve [4-5], Schwann cells alone or in combination with different molecules [2,6], olfactory ensheathing cells [2,7] and neural stem cells [2,8-9].

Notwithstanding, the majority of the transplants that have been used in the treatment of TSCI have not been able to restore the nerve function in a significant way. Recently, research in tissue engineering has produced materials that have the potential of being a better treatment for this pathology [10-12].

To form a viable transplant for TSCI treatment, the materials employed must be biocompatible with the nervous tissue (where the communication is mainly by ion exchange), and their chemical composition, hydrophobicity and electrical activity should be well characterized.

Recently, polymers with intrinsic conductive properties have gained relevance as smart materials with biological applications [13]. These polymers possess the physical and chemical properties of organic polymers and the electrical properties of the metals [14]. Additionally, these materials have the ability to bind to various chemical substances (dopants) which

affect the physicochemical properties of the polymers, such as their conductivity. Furthermore, materials of this type have been developed with the capability of supporting and modulating the growth of different cell types which makes them suitable for biological and biomedical applications [15].

Among biocompatible and electrically conductive polymers, polypyrrole (PPy) is one of the most studied. PPy is easy to synthesize, thermally stable, and has high conductivity in comparison with other conductive polymers [16]. PPy has been used as biosensor for measuring cholesterol [17], glucose in blood [18], blood group, antibodies [19], and vapors of organic solvents [20]. It has also been used for coating neural probes [21], devices for drug and biomolecule release [22], and artificial muscles [23]. In addition to being biocompatible [24], the cytocompatibility of PPy has been demonstrated using L929 mouse fibroblast and Neuro2a neuroblastoma cells [25]. Moreover, PPy has been used to support cell adhesion and growth of different cell types *in vitro* [13, 26-34], and as guide for regenerating rat sciatic nerve [33, 35]. Our research group, has demonstrated that PPy synthesized by plasma polymerization promotes neuroprotection and leads to recovery of motor and sensory functions after a TSCI by complete section in *in vivo* studies with rats [36-38]. These PPy implants showed no significant inflammatory response *in situ* after 4 weeks of implantation [25].

Typically, PPy is synthesized by chemical and electrochemical polymerization methods. It is also possible to synthesize it by plasma polymerization, but the product shows important differences. The chemically synthesized PPy is crystalline, and there is a lack of control over the mass or the thickness of the film obtained [39]. PPy synthesized electrochemically, has similar chemical structure to that obtained by chemical methods, but can be more easily doped to enhance its conductive properties. Also, the film properties can be controlled

directly in the course of the polymerization. Both the chemical and electrochemical synthetic methods use accelerators and solvents, which modify the adhesion and hydrophobicity properties of the resulting materials. These extra components can be dangerous or toxic; thus they must be fully removed from the polymers before being applied to any biological system. In contrast, polymerization by plasma only requires the base monomer to start the reaction without introducing other chemical compounds. When plasma polymerization is used, the oxidation is promoted by the impact of free electrons that travel along the electric field with monomer molecules [40]. The material produced by plasma polymerization does not have a regular chemical structure but specific chemical groups are present. Plasma polymerization produces a dense film with a crosslinked structure [41]. The crosslinked structure permits the material to retain its mechanical properties even in biological media, while the functional groups exposed to the surface mediate favorable interactions with many types of cells.

Given the differences in chemical and physical structure of the PPy materials obtained by different synthesis methods, it is important to evaluate how these variations affect implants and their effect on recuperation from spinal cord injuries. The goal of the present study is to compare implants made of pyrrole derivatives, PPy and PPy co-polymerized with polyethylene glycol (PPy/PEG) obtained by chemical, electrochemical and plasma polymerization. We analyze the chemical structure of the prepared implants, their ability to integrate with nervous tissue, their inflammatory response and their effect on the recovery of motor function after a TSCI in rats. In this study PPy/PEG was tested because after a TSCI the neuronal membranes are ruptured and PEG has been shown to aid in the repair of membranes [42-43]; which could enhance the benefic effect of PPy when implanted after a TSCI.

MATERIALS AND METHODS

Plasma polymerization

The preparation of iodine doped PPy (PPy/I) and PPy/PEG thin films has been previously described [36-37]. Briefly, the films were prepared in a tubular glass reactor, 9 cm in diameter and 25 cm long, capped with stainless steel flanges with access ports. The ports were used to connect the reactor to a vacuum pump, a Pirani gauge (Edwards), and to introduce reactants. For the preparation of PPy films, pyrrol (Aldrich, 99%) vapor was used; and to synthesize the PPy/PEG copolymer, pyrrol was introduced by one port and, simultaneously, PEG (Aldrich) was introduced through another port. In the center of the flanges two stainless steel flat circular electrodes with 7 cm of diameter and separated by 9 cm, were inserted with the aim to create a homogenous electric field in the reactor. The electric field was generated by a Dressler Cesar 136 RF Power Generator. A field frequency of 13.5 MHz and power of 18 W was used. The pressure in the reactor was 5×10^{-2} Torr and the synthesis time was 300 min. The polymers were separated from the internal reactor walls applying acetone and using a thin spatula.

Electrochemical synthesis

PPy/PEG copolymer was synthesized by the conventional electrochemical method using an titanium electrode (99.99% Sigma-Aldrich) with an exposed area of 4.0 cm^2 . Before each experiment, the electrode surface was polished with silicon carbide (SiC) paper grade 2000, degreased with acetone and rinsed with deionized water. For the electropolymerization an aqueous solution of 0.2 M pyrrol monomer in 0.2 M of oxalic acid (Ac. Ox) with 8% PEG (molecular weight 600 Daltons) was prepared. All solutions were prepared with deionized water (18.2 M Ω).

Electrochemical polymerizations were performed at room temperature in a

conventional cell with three electrodes: a rod of Ti functioned as the active electrode, a saturated calomel electrode (SCE) that functioned as the reference electrode, a rod of platinum (Pt) as the counter electrode. All electrodes were connected to a Potentiostat galvanostat Autolab PGSTAT 302N with the GPES 4.9 electrochemical software.

The PPy/PEG film was synthesized potentiostatically at 0.9 V vs. SCE, and allowed to grow for 4 hours. The film was rinsed with deionized water and removed from the Ti electrode surface and left to dry at a temperature of 60 °C for 24 hrs.

Chemical synthesis

Two different chemically synthesized PPy were used. A commercial PPy doped with sulphonic acid was purchased from Sigma-Aldrich (CAS 30604-81-0 and 577030-5G, Pcode 1000874358, Lot # MKB, elemental analysis C-69.94 %; N-15.42 % (N/C=0.22), O-12.58 %; S-2.06 %).

The other PPy was synthesized in our laboratory by oxidation. The polymer was synthesized by mixing 48 mL of dodecylbenzenesulfonic acid (70 wt. % dissolved in 2-propanol), 900 mL of distilled water, 7 mL of pyrrole, and 11.4 g of ammonium persulphate dissolved in 25 mL of water. The reaction was performed at 25° C during 24 hours.

Infrared Characterization

The polymers were analyzed by infrared (IR) spectroscopy with a Nicolette 550 spectrophotometer with a 400-4000 cm^{-1} interval using 32 scans [36, 40].

Implants

Each polymer was pulverized and then compressed at 9 Ton/ cm^2 for 10 min to form a thin tablet of 1 cm in diameter and 0.5 mm thickness. Finally, the thin table was cut according to the diameter of the spinal cord.

Animals and surgical procedures

Female Long Evans rats with 220 to 260 g of body weight were maintained under standard laboratory conditions and free access to food and water. Animal care and the protocols for animal use were approved by the Scientific and Ethics Committees of the Instituto Mexicano del Seguro Social.

Eighteen rats were prepared to receive a complete spinal cord section at thoracic 9 level (T-9) and then, six experimental groups (n=3 animals per group) were formed:

1. Control: animals without implant.
2. PPy: animals implanted with PPy synthesized by plasma.
3. ChPPy1: animals implanted with PPy chemically-synthesized.
4. ChPPy2: animals implanted with PPy purchased from Sigma-Aldrich (chemically-synthesized).
5. PPy/PEG: animals implanted with PPy/PEG synthesized by plasma.
6. EPPy-PEG: animals implanted with PPy/PEG electrochemically-synthesized.

Before implantation, animals were anesthetized intramuscularly with a mixture of ketamine and xylazine (77.5 and 12.5 mg/kg). Then, an aseptic surgery under microscopic inspection was done by making a sagittal incision on the skin from the middle back followed by a dissection of the spine paravertebral muscles. Two laminae were removed (T-8 and T-9) to expose the spinal cord tissue [36-38].

The meninges were longitudinally cut and spinal cord tissue was completely transected by cutting transversally all fibers. Transection was corroborated with a microsurgical hook to ensure that no pathway remained connected. The corresponding implant (approximately 10 mg) was then

inserted at the injured zone in the cavity between both sides of the transection. Only the animals in the control group did not receive any implant. Finally, the meninges were sutured, as well as the paravertebral muscles and skin. Animals were treated with an anti-inflammatory drug (0.31ml/62.5ml of paracetamol into drinking water during 3 days) and an antibiotic (200 μ L of benzathine penicillin, in one i.m. dose). Afterwards, rats recovered from anesthesia and surgical procedures in an intensive care unit for small animals (Schoer Manufacturing CO., Kansas City, MO, USA) and placed into individual acrylic cages with sterile sawdust for receiving food and water *ad libitum*. The day after SCI, the absence of hind limb movement was corroborated to ensure the complete section of the spinal cord. Their intestine and bladder were handled by manual expression twice a day and visual inspection was performed day by day looking for skin irritation or *decubitus* ulcers [36-38].

Motor function recovery

The motor function recovery of hind limbs in each rat from the six groups were assessed weekly during five weeks using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale [44], which has 22 points and where 0 represents total absence of movement (paralysis) and 21 represents a normal walking. The test was applied by two observers blinded to the treatment that the animals received.

Histological analysis

Thirty days after spinal cord transection, all animals were anesthetized as described before, followed by intraperitoneal administration of 0.2 mL of heparin. Then, a wide thoracotomy was performed and 200 mL of cool physiological saline solution was perfused transcardially at 30 mL/min followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. Afterwards, 2 cm of the spinal cord were taken including the

Animals and surgical procedures

Female Long Evans rats with 220 to 260 g of body weight were maintained under standard laboratory conditions and free access to food and water. Animal care and the protocols for animal use were approved by the Scientific and Ethics Committees of the Instituto Mexicano del Seguro Social.

Eighteen rats were prepared to receive a complete spinal cord section at thoracic 9 level (T-9) and then, six experimental groups (n=3 animals per group) were formed:

1. Control: animals without implant.
2. PPy: animals implanted with PPy synthesized by plasma.
3. ChPPy1: animals implanted with PPy chemically-synthesized.
4. ChPPy2: animals implanted with PPy purchased from Sigma-Aldrich (chemically-synthesized).
5. PPy/PEG: animals implanted with PPy/PEG synthesized by plasma.
6. EPPy-PEG: animals implanted with PPy/PEG electrochemically-synthesized.

Before implantation, animals were anesthetized intramuscularly with a mixture of ketamine and xylazine (77.5 and 12.5 mg/kg). Then, an aseptic surgery under microscopic inspection was done by making a sagittal incision on the skin from the middle back followed by a dissection of the spine paravertebral muscles. Two laminae were removed (T-8 and T-9) to expose the spinal cord tissue [36-38].

The meninges were longitudinally cut and spinal cord tissue was completely transected by cutting transversally all fibers. Transection was corroborated with a microsurgical hook to ensure that no pathway remained connected. The corresponding implant (approximately 10 mg) was then

inserted at the injured zone in the cavity between both sides of the transection. Only the animals in the control group did not receive any implant. Finally, the meninges were sutured, as well as the paravertebral muscles and skin. Animals were treated with an anti-inflammatory drug (0.31ml/62.5ml of paracetamol into drinking water during 3 days) and an antibiotic (200 μ L of benzathine penicillin, in one i.m. dose). Afterwards, rats recovered from anesthesia and surgical procedures in an intensive care unit for small animals (Schoer Manufacturing CO., Kansas City, MO, USA) and placed into individual acrylic cages with sterile sawdust for receiving food and water *ad libitum*. The day after SCI, the absence of hind limb movement was corroborated to ensure the complete section of the spinal cord. Their intestine and bladder were handled by manual expression twice a day and visual inspection was performed day by day looking for skin irritation or *decubitus* ulcers [36-38].

Motor function recovery

The motor function recovery of hind limbs in each rat from the six groups were assessed weekly during five weeks using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale [44], which has 22 points and where 0 represents total absence of movement (paralysis) and 21 represents a normal walking. The test was applied by two observers blinded to the treatment that the animals received.

Histological analysis

Thirty days after spinal cord transection, all animals were anesthetized as described before, followed by intraperitoneal administration of 0.2 mL of heparin. Then, a wide thoracotomy was performed and 200 mL of cool physiological saline solution was perfused transcardially at 30 mL/min followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. Afterwards, 2 cm of the spinal cord were taken including the

can arise from ethylene glycol segments or from fragments of pyrrole molecules which were fractionated due to the high energy of the particles in the plasma, the absorption at 3312 cm^{-1} can be associated with the presence of amine groups. These absorptions indicate that in the copolymer synthesized by plasma, the heteroaromatic character of the pyrroles predominates.

In the case of the electrochemically-synthesized co-polymer, the more intense absorption was found in 664 cm^{-1} and can be assigned to N-O groups. This implies a substitution of N-H groups by N-O groups which could be a consequence of ethylene glycol participation during the synthesis. The absorption at 1033 cm^{-1} corresponds to C-O groups that are found in ethylene glycol repeat units. These absorptions indicate

that in the electrochemically-synthesized copolymer, the oxygenated character of the ethylene glycol predominates.

Motor function recovery

The motor function was evaluated 24 h after complete transection of the spinal cord with the aim to corroborate if hind limb performance showed complete bilateral paralysis in all rats (BBB=0). Afterwards, the BBB locomotor rating scale was assessed once a week during 5 weeks to evaluate the gradual improvement of the animals. Results were as follow (Figure 3):

- a) Control (3 animals alive): BBB=1, meaning that animals had slight movement of 1 or 2 joints.

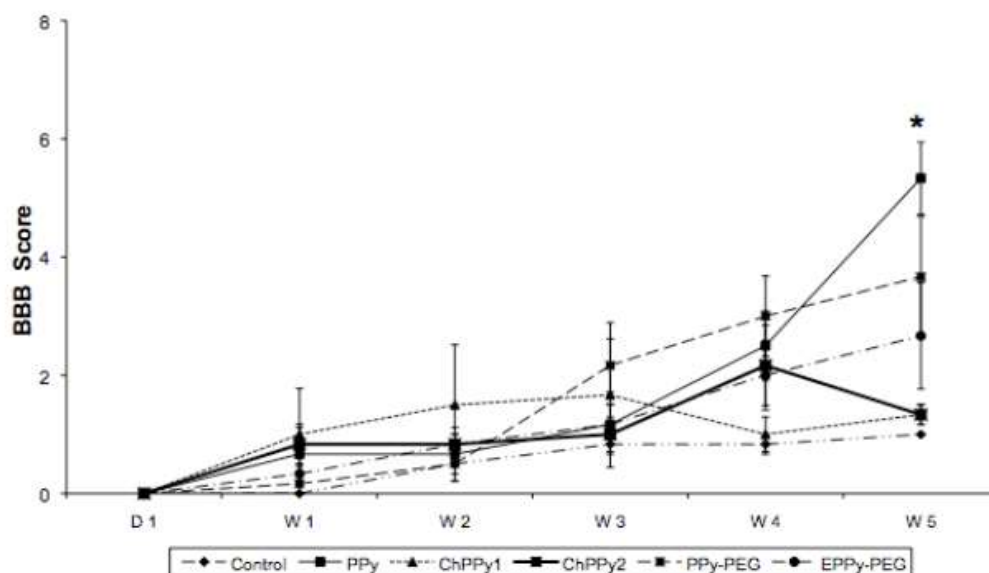


Figure 3. The locomotion recovery measured by BBB open field score after traumatic spinal cord injury was evaluated along the time. Control: animals without implant; PPy: animals implanted with polypyrrole (PPy) synthesized by plasma; ChPPy1: animals implanted with PPy chemically-synthesized; ChPPy2: animals implanted with PPy purchased from Sigma-Aldrich (chemically-synthesized); PPy/PEG: animals implanted with PPy copolymerized with polyethylene glycol (PPy/PEG) and synthesized by plasma; EPPy/PEG: animals implanted with electrochemically-synthesized PPy/PEG co-polymer. Results are expressed as means \pm SE. ANOVA of repeated measures followed by Dunnett's test. *Control group different from PPy and PPy/PEG ($p < 0.028$, and 0.05 , respectively).

- b) PPy (3 animals alive): BBB=5.33, meaning that animals were able to move the 3 joints of the hind limb (hip, knee and ankle), and in two them, the movements were extensive.
- c) ChPPy1 (3 animals alive and 2 dead animals, non-evaluable): BBB=1, meaning that the animals had slight movement of 1 or 2 joints. Although one of the animals had an improvement of 4 points in the BBB scale in the third week, score decreased with time.
- d) ChPPy2 (3 animals alive and 4 dead animals, non-evaluable): BBB=1.33, meaning that the animal had slight movement in one or two joints. But just as in the ChPPy1 group, one animal presented improvement until the fourth week and subsequently decreased the effect of the implant.
- e) PPy-PEG (3 animals alive): BBB=3.66, meaning that animals had extensive movement in 1 or 2 joints of the hind limb and slight movement of other joint (hip, knee and ankle).
- f) EPPy-PEG (3 animals alive): BBB=2.6, meaning that animals had extensive movement of 1 joint and slight movement of 2 joints of the hind limbs.

The dead animals did not show infection of the urinary or respiratory tract, hypertrophy of urethral *meatus*, or shallow or deep wounds. Thus, the cause of death is unknown.

Animals implanted with materials synthesized by plasma demonstrated greater motor function recovery comparing with animals implanted with materials obtained by chemical or electrochemical synthesis and with control group animals. Animals with implants synthesized by plasma showed significant differences with animals from the control group; PPy ($p = 0.028$) and PPy / PEG ($p = 0.05$).

Histological analysis

Four weeks after SCI, animals were sacrificed to analyze the integration of implants to the spinal cord tissue and the inflammatory response. The control group (Fig. 4A) showed greater tissue destruction compared with implanted animals. Analysis of implants integration to the spinal cord tissue showed that PPy implants synthesized by plasma polymerization were well integrated to the tissue and that the surrounding tissue showed little destruction (Fig. 4B). The chemically-synthesized implants ChPPy1 and ChPPy2 (Fig. 4C and 4D respectively) had similar amount of tissue destruction and complete lack of implant integration, with a great cyst at the injury epicenter and a complete loss of histological architecture.

Regarding the inflammatory response, morphometric analysis showed the presence of 142 polymorphonuclear cells per every 4 microns in the animals with ChPPy1 implant and 128 polymorphonuclear cells in the animals with ChPPy2 implant (obtained from Sigma-Aldrich). In contrast, the morphometric analysis of samples with implants synthesized by plasma for both PPy and PPy/PEG showed about 74 inflammatory cells at the tissue surrounding the implant, and if PPy was doped with iodine (PPy/I) 95 inflammatory cells were found in the tissue that surrounded the implant.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The present work compared the effect of different implants derived from pyrrole (PPy and PPy/PEG) and obtained by standard chemical, electrochemical, and plasma polymerizations. The implants were analyzed according to their chemical structure, integration with the nervous tissue, and their effect on functional recovery in rats with complete section of the spinal cord.

The PPy implants that were chemically synthesized as ChPPy1 and ChPPy2 have

a similar chemical structure. None of them were integrated to the nervous tissue, a large number of cysts and inflammatory cells were found on the tissue around the implants, and a complete loss of cytoarchitecture of the spinal cord was observed. Animals that received ChPPy1 or ChPPy2 showed some functional recovery between the third and fourth week post injury. This recovery, however, decreased afterwards. Meanwhile, animals implanted with PPy synthesized by plasma showed implant integration to the nerve tissue, little destruction of nervous tissue and significant functional recovery when comparing with animals with implants obtained by chemical methods and animals from control group ($p = 0.028$).

Although both implants of PPy copolymerized with PEG and synthesized by plasma or electrochemically were well integrated to the nervous tissue, the functional recovery was different. Animals that received implants of PPy/PEG synthesized by plasma showed greater motor recovery ($p = 0.05$ with respect to animals from control group) than those which received implants obtained electrochemically.

The results show significant differences in the effects of the method of synthesis on functional recovery and implant integration to the nervous tissue. Although the polymers had the same molecules of origin, IR analysis showed that method of synthesis affects the chemical structure of the material.

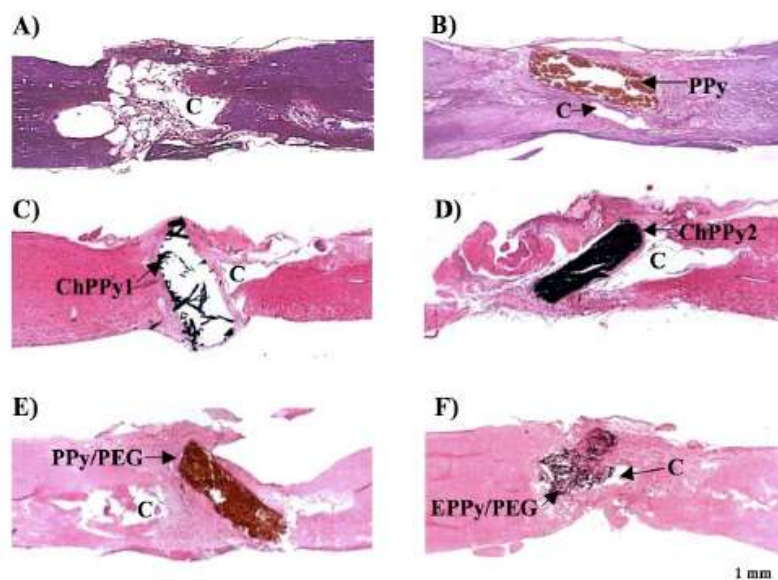


Figure 4. Representative photomicrographs from longitudinal sections of spinal cord of rats that showing the epicenter zone of injured spinal cord by complete transection a) Control: animals without implant; b) PPy: animals implanted with PPy synthesized by plasma; c) ChPPy1: animals implanted with PPy chemically-synthesized; d) ChPPy2: animals implanted with PPy purchased from Sigma-Aldrich (chemically-synthesized); e) PPy/PEG: animals implanted with PPy/PEG copolymer synthesized by plasma-; f) EPPy/PEG: animals implanted with electrochemically-synthesized PPy/PEG copolymer. Magnification 2X. Hematoxylin/eosin stain. C→Cyst, PPy, ChPPy1, ChPPy2, PPy/PEG and EPPy/PEG→Implants.

Wangh et al., showed that the chemical structure of PPy and of polythiophene synthesized by plasma are different from the ones chemically synthesized because the materials obtained by plasma are highly crosslinked and branched [45] and they can form three-dimensional network which can support and promote neural cells grown while the presence of heteroaromatic amine groups and nitrile groups can favor neuroprotection after an injury in the central nervous system. Furthermore, the polymers synthesized by plasma are insoluble, thermally stable and chemically inert [46], characteristics that make them more desirable for implants in a biological system.

Pyrrole belongs to a class of heterocyclic compounds that are in various natural components such as the heme group, chlorophyll and vitamin B12 [47] and have been used in various applications of chemical medicine as anti-inflammatory, antibacterial and antihypertensive agents, as well as agents for tyrosine kinase inhibition[48].

Currently, PPy is mainly synthesized by chemical oxidation or electrochemical polymerization [16]. Nevertheless, for biomedical applications, plasma synthesis might be a better option because the unique characteristics of PPy generated by plasma that allow improvement of the cellular microenvironment and favor the attachment and growth of cells. The low rate of degradation of the material maintains the cell adhesion, promotes morphological maturation and allows preservation of its properties [34]. It has been shown in cultures of nerve cells on surfaces treated with PPy, that the adhesion, proliferation, attachment, viability and number of synapses is increased compared with that observed in cultures performed on surfaces treated with compounds as Poly DL-Ornithine / Laminin [34]. Furthermore, our research group has demonstrated neuroprotective activity of PPy synthesized by plasma, as well as greater functional recovery in animals that received

this type of implant after a TSCI, compared with those who did not receive it [36-38].

The above may be due to the chemical structure of PPy obtained by plasma polymerization. IR spectroscopy of this material shows the presence of a variety of chemical groups including primary amines, nitriles and aliphatic sections [34], and it has been shown that the structures consisting mainly of methyl-, hydroxyl-, amino- and carboxyl- functional groups, which are found in natural biological surfaces, favor the growth of cells [49].

The adaptability of tissues to materials such as the implants studied in this work begins with the absorption of solutions at the surface of the material. The hydrophilic properties of PPy, which can be increased by increasing the ionization capability of the material, allow one to store solutions and favor interaction with cells [50-51], which generates optimal sites for cell attachment.

Nerve cells carry out their function by generating electrical activity. The nervous system thus responds to electric fields and the key component of the neural communication is the action potential generated in the synapse. This implies that the ideal biomaterial to implant in this system must introduce electrical stimulators to promote neuronal growth and nerve regeneration [13]. The material must promote regeneration of the nervous tissue at the interface by attraction or rejection of ions and polar groups between the cells and the material. In addition to this, it has been shown that electrical stimulation alters the absorption of proteins and the interaction with the nerve cells [52], which could also favor nerve regeneration processes. Although the breaking of rings in the plasma polymerization process results in a polymer complex of low conductivity, when is introduced into a biological system its sensitivity to humidity increases its conductivity [40]. It is known that the electric conductivity of conductive polymers

synthesized by chemical or electrochemical methods oscillates within a range of 10^{-10} to 10^{-5} S cm^{-1} [39]. The electric conductivity of the plasma-synthesized PPy measured at 30 % relative humidity is around 10^{-12} S cm^{-1} , while at 90 % of relative humidity it is 10^{-9} S cm^{-1} [40]. The PPy/PEG copolymer has a conductivity of 10^{-12} S cm^{-1} at 30 % of relative humidity [36] and of 10^{-9} to 10^{-8} S cm^{-1} when it is dampened with ionic solutions [51].

Due to their physical and chemical properties, the PPy does not alter the biological functions of the cell cultures and provides better cell attachment and an increased rate of proliferation, which may be due to the accumulation of amino groups ($-\text{NH}_2$) and interaction with other groups generated during the process of plasma polymerization [34], which may explain the better results obtained when using PPy synthesized by plasma vs the PPy synthesized by conventional chemical or electrochemical methods.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by CONACyT grant No. 155239 and by IMSS grant No. FOFOI 2005/1/I/149. Ana Laura Álvarez received a scholarship from CONACyT, No. 172211. The authors want to thank to María del Carmen Baltazar for her technical assistance.

REFERENCES

1. C.A. Oyinbo, "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade," *Acta Neurobiol Exp*, vol. 71, pp. 281-299, 2011.
2. W. Tetzlaff, E.B. Okon, S. Karimi-Abdolrezaee, C.E. Hill, J.S. Sparling, J.R. Plemel, W.T. Plunet, E.C. Tsai, D. Baptiste, L.J. Smithson, M.D. Kawaja, M.G. Fehlings, B.K. Kwon "A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury," *J Neurotrauma*, vol. 28, no. 8, pp. 1611-1682, 2011.
3. S. Venkatachalam, "Fetal neural tissue transplantation for spinal cord injury repair," Chapter 23 in N. Bhattacharya, P. Stubblefield (eds.), *Human Fetal Tissue Transplantation*. Springer London, pp. 297-305, 2013.
4. H. Salgado-Ceballos, I. Grijalva, G. Guizar-Sahagun, A. L. Espitia, A. Martínez, A. Feria-Velasco, "Predegenerated peripheral nerve graft with and without methylprednisolone administration after traumatic spinal cord injury in adult rats," *Neurosci. Res. Comm.*, vol. 33, no. 2, pp. 77-85, 2003.
5. M.P. Côté, A.A. Amin, V.J. Tom, J.D. Houle "Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury," *Neurotherapeutics*, vol. 8, no. 2, pp. 294-303, 2011.
6. H. Kanno, Y. Pressman, A. Moody, R. Berg, E.M. Muir, J.H. Rogers, H. Ozawa, E. Itoi, D.D. Pearse, M.B. Bunge, "Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 5, pp. 1838-1855, 2014.
7. Y.J. Rao, W.X. Zhu, Z.Q. Du, C.X. Jia, T.X. Du, Q.A. Zhao, X.Y. Cao, Y.J. Wang "Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury," *Genet. Mol. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 4124-4129, 2014.
8. Z.A. Sobani, S.A. Quadri, S.A. Enam, "Stem cells for spinal cord regeneration: Current status," *Surg Neurol Int.*, vol. 1, pp. 93, 2010.

- biomolecule release from electroactive host polymer systems," *Polymer Preprints*, vol. 40, no. 1, pp. 307, 1999.
23. T.F. Otero, M.T. Cortés, "Artificial muscles with tactile sensitivity," *Adv. Mater.*, vol. 15, no. 3, 279-289, 2003.
 24. X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen, G. Chen, "Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*," *J Biomed Mater Res A*, vol. 68A, no. 3, pp. 411-422, 2004.
 25. R.L. Williams, P.J. Doherty, "A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies," *J. Mater Sci-Mater M.*, vol. 5, no. 6-7, pp. 429-433, 1994.
 26. H. Castano, E.A. O'Rear, P.S. McFetridge, V.I. Sikavitsas "Polypyrrole thin films formed by admicellar polymerization support the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Macromol Biosci*, vol. 4, no. 8, pp. 785-794, 2004.
 27. H.K. Song, B. Toste, K. Ahmann, D. Hoffman-Kim, G.T. Palmore, "Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: a new platform for characterizing neurite extension in complex environments," *Biomaterials*, vol. 27, no. 3, pp. 473-484, 2006.
 28. D.D. Ateh, P. Vadgama, H.A. Navasaria, "Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues," *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 11, pp. 741-752, 2006.
 29. N. Gomez, C.E. Schmidt, "Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 81, no. 1, pp. 135-149, 2007.
 30. J.Y. Lee, C.A. Bashur, A.S. Goldstein, C.E. Schmidt, "Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications," *Biomaterials*, vol. 30, no. 26, pp. 4325-4334, 2009.
 31. D. Kai, M.P. Prabhakaran, G. Jin, S. Ramakrishna, "Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 99, no. 3, pp. 376-385, 2011.
 32. A.D. Bendrea, L. Cianga, I. Cianga, "Review paper: progress in the field of conducting polymers for tissue engineering applications," *J. Biomater. Appl.*, vol. 26, no. 1, pp. 3-84, 2011.
 33. Z. Zhang, M. Rouabhia, Z. Wang, C. Roberge, G. Shi, P. Roche, J. Li, L.H. Dao, "Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration," *Artif Organs*, vol. 31, no. 1, pp. 13-22, 2007.
 34. E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, R. Godínez, "Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization," *J Biomater Sci Polym Ed.*, vol. 25, no. 7, pp. 729-747, 2014.
 35. X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen, G. Chen "Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*," *J Biomed Mater Res A*, vol. 68, no. 3, pp. 411-422, 2004.
 36. R. Olayo, C. Ríos, H. Salgado-Ceballos, G. Cruz, J. Morales, G. Olayo, L. Alvarez, R. Mondragón, A. Morales-Guadarrama, G. Guizar-Sahagun, A. Diaz-Ruiz, "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and

- polyethylene glycol obtained by plasma," *J Mater Sci:Mater Med*, vol. 19, no. 2, pp. 817-826, 2008.
37. G.J. Cruz, R. Mondragón-Lozano, A. Diaz-Ruiz, J. Manjarrez, R. Olayo, H. Salgado-Ceballos, M.G. Olayo, J. Morales, L. Alvarez-Mejía, A. Morales, M. Méndez-Armenta, N. Plascencia, M. Fernandez, C. Ríos "Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection," *J Mater Sci:Mater Med*, vol. 23, no. 10, pp. 2583-2592, 2012.
 38. A. Morales-Guadarrama, H. Salgado-Ceballos, J. Morales, C. Ríos, G.J. Cruz, A. Diaz-Ruiz, M.G. Olayo, L. Alvarez-Mejia, R. Mondragón-Lozano, R. Olayo, "CAT and MRI studies of spinal cord injured rats implanted with PPy/I," *Revista Mexicana en Ingeniería Biomédica*, vol. 34, no. 2, pp. 145-155, 2013.
 39. T.V. Vernitskaya, O.N. Efimov, "Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications," *Russian Chemical Reviews*, vol. 66, no. 5, pp. 443-457, 1997.
 40. G.J. Cruz, J. Morales, R. Olayo, "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole," *Thin solid films*, vol. 342, no. 1-2, pp. 119-126, 1999.
 41. J. Morales, E. Pérez-Tejada, C.R. Montiel, V.H. Torres, R. Olayo, "Modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales [Surface modification by plasma applied to biomaterials]," In: *La Física Biológica en México: Temas Selectos 2* [Biological Physics in Mexico:Selected Items 2]. México D. F.: Colegio Nacional, pp. 241-257, 2008.
 42. J. Luo, R. Borgens, R. Shi, "Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury," *J Neurochem*, vol. 83, no. 2, pp. 471-480, 2002.
 43. R. Shi "Polyethylene glycol repairs membrane damage and enhances functional recovery: a tissue engineering approach to spinal cord injury," *Neurosci Bull*, vol. 29, no. 4, 460-466, 2013.
 44. D.M. Basso, M.S. Beattie, J.C. Bresnahan "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats," *J. Neurotrauma*, vol. 12, pp. 1-21, 1995.
 45. J. Wang, K.G. Neoh, E.T. Kang, "Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films," *Thin Solid Films*, vol. 446, no. 2, pp. 205-217, 2004.
 46. M.M. Kamal, A.H. Bhuiyan, "Structural and optical characterization of plasma polymerized pyrrole monolayer thin films," *Advances in Optoelectronic Materials (AOM)*, vol. 1, no. 2, pp. 11-17, 2013.
 47. C.Y. De Leon, B. Garem, "A New Approach to porphobilinogen and its analogs," *Tetrahedron*, vol. 23, no. 9, pp. 7731-7752, 1997.
 48. A.M. Manning, D.J. Davis, "Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?," *Nat Rev Drug Discov.*, vol. 2, no. 7, pp. 554-565, 2003.
 49. P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, C.C. Perry, "Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications," *J Mater Sci Mater Med.*, vol. 18, no. 7, pp. 1263-1277, 2007.
 50. L.M. Gómez, M.G. Olayo, G.J. Cruz, M. González-Torres, O.G. López, C. De Jesús, "Interaction of

- plasma polypyrrole particles with ionic solutions," *Macromolecular Symposia*, vol. 325-326, no. 1, pp. 112-119, 2013.
51. E. Colín, M.G. Olayo, G.J. Cruz, L. Carapia, J. Morales, R. Olayo, "Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body," *Progress in Organic Coatings*, pp. 64322-326, 2009.
52. A. Kotwal, C.E. Schmidt, "Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials," *Biomaterials* vol. 22, no. 10, pp. 1055-1064, 2001.



Anexo 3. Artículo de investigación

J Mater Sci: Mater Med (2015)26:209
DOI 10.1007/s10856-015-5541-0



BIOCOMPATIBILITY STUDIES

Original Research

Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training

Laura Alvarez-Mejía^{1,2,7} · Juan Morales³ · Guillermo J. Cruz⁴ · María-Guadalupe Olayo⁴ · Roberto Olayo³ · Araceli Díaz-Ruiz⁵ · Camilo Ríos⁵ · Rodrigo Mondragón-Lozano^{1,5,7} · Stephanie Sánchez-Torres^{2,6,7} · Axayacatl Morales-Guadarrama^{1,7} · Omar Fabela-Sánchez^{1,7} · Hermelinda Salgado-Ceballos^{2,7}

Received: 8 April 2015 / Accepted: 3 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Currently, there is no universally accepted treatment for traumatic spinal cord injury (TSCI), a pathology that can cause paraplegia or quadriplegia. Due to the complexity of TSCI, more than one therapeutic strategy may be necessary to regain lost functions. Therefore, the present study proposes the use of implants of mesoparticles (MPs) of polypyrrole/iodine (PPy/I) synthesized by plasma for neuroprotection promotion and functional recovery in combination with treadmill training (TT) for neuroplasticity promotion and maintenance of muscle tone. PPy/I films were synthesized by plasma and pulverized to obtain

MPs. Rats with a TSCI produced by the NYU impactor were divided into four groups: Vehicle (saline solution); MPs (PPy/I implant); Vehicle-TT (saline solution + TT); and MPs-TT (PPy/I implant + TT). The vehicle or MPs (30 μ L) were injected into the lesion site 48 h after a TSCI. Four days later, TT was carried out 5 days a week for 2 months. Functional recovery was evaluated weekly using the BBB motor scale for 9 weeks and tissue protection using histological and morphometric analysis thereafter. Although the MPs of PPy/I increased nerve tissue preservation ($P = 0.03$) and promoted functional recovery ($P = 0.015$), combination with TT did not produce better neuroprotection, but significantly improved functional results ($P = 0.000$) when comparing with the vehicle group. So, use these therapeutic strategies by separately could stimulate specific mechanisms of neuroprotection and neuroregeneration, but when using together they could mainly potentiate different mechanisms of neuronal plasticity in the preserved spinal cord tissue after a TSCI and produce a significant functional recovery.

Graphical Abstract The implant of mesoparticles of polypyrrole/iodine into the injured spinal cord displayed good integration into the nervous tissue without a response of rejection, as well as an increased in the amount of preserved tissue and a better functional recovery than the group without transplant after a traumatic spinal cord injury by contusion in rats. The relevance of the present results is that polypyrrole/iodine implants were synthesized by plasma instead by conventional chemical or electrochemical methods. Synthesis by plasma modifies physicochemical properties of polypyrrole/iodine implants, which can be responsible of the histological response and functional results. Furthermore, no additional molecules or trophic factors or cells were added to the implant for obtain such results. Even more, when the implant was used

✉ Hermelinda Salgado-Ceballos
melisalce@yahoo.com

¹ Department of Electric Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, CP 09340, Mexico, DF, Mexico

² Medical Research Unit in Neurological Diseases, Specialties Hospital, National Medical Center XXI Century, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06703 Mexico, DF, Mexico

³ Department of Physics, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, CP 09340 Mexico, DF, Mexico

⁴ Department of Physics, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carr. México-Toluca, km 36.5, CP 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

⁵ Department of Neurochemistry, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Av. Insurgentes Sur 3877, CP 14269 Mexico, DF, Mexico

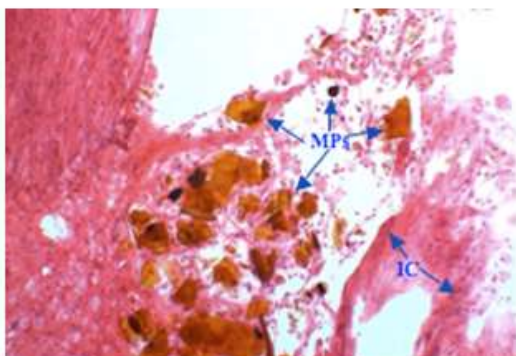
⁶ Division of Biological Sciences and Health, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, CP 09340 Mexico, DF, Mexico

⁷ Proyecto Camina A.C., Calzada de Tlalpan 4430, Col. Toriello Guerra, CP 14050 Mexico, DF, Mexico

Published online: 14 July 2015

Springer

together with physical rehabilitation, better functional recovery was obtained than that observed when these strategies were used by separately.



1 Introduction

Traumatic spinal cord injury (TSCI) is one of the most significant health problems worldwide because it produces paraplegia or quadriplegia and a broad range of secondary complications [1]. To date, TSCI remains a devastating condition with no universally accepted treatment.

Although the surviving neurons at or near the site of injury have the ability to rearrange their anatomy and functional connectivity [2], this reconstruction can take several years, or not occur at all, due to the adverse environment produced by inflammation, ischemia, lipid peroxidation, and glial scarring, all of which limit spontaneous plasticity and decrease neuronal survival and functional recovery [3].

To protect spinal cord nervous tissue and/or to promote nervous tissue regeneration, various cells or tissues have been implanted into the injured spinal cord, including Schwann cells [4], peripheral nerves [5], fetal tissue [6], and neural stem cells [7], among others. Nevertheless, these treatments have provided only modest functional improvements because of the lack of structural and biochemical frameworks for guiding, protecting, and encouraging the regrowth of axons across the injured zone of the spinal cord. To achieve this structural support, different tissue engineering strategies have been tested that use natural and synthetic materials to create cellular or cell-free bridges through the injured spinal cord or by constructing scaffolds with various types of cells or neurotrophic factors for spinal cord repair [8–11].

Among the natural polymers used as a scaffold after a TSCI in rats are alginate, which reduces the astrocytosis

and enhances axonal regeneration [12]; agarose, which supports linear axonal growth through implantation [13]; and acellular spinal cord scaffolds seeded or not with bone marrow stromal cells (BMSC), which enhance the survival of BMSC, reduce apoptosis and improve functional recovery after a hemisection or partial injury of the spinal cord [14]. The synthetic polymers used in an injured spinal cord until now have been poly(2-hydroxy-ethyl methacrylate) or poly(2-hydroxy-ethyl methacrylate)-co-methyl methacrylate (PHEMA/PHEMA-MMA), which increase angiogenesis and axonal regeneration [15, 16]; poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (PHPMA), which induces the myelination of axons and reduces astrocytosis and glial scar formation [17]; and polypyrrole (PPy) polymer, which our research group has shown exhibits neuroprotective effects through increasing the amount of preserved spinal cord tissue and increases the functional recovery [18, 19]. The combined strategies include the three-dimensional nanofibrous core-sheath scaffold with a nanorough sheath and alginate core constructed on the poly(lactic-co-glycolic acid) or PGLA scaffolds, which supports axon regeneration and functional recovery after a TSCI by hemisection [20].

PPy is a non-biodegradable semiconductor polymer, which due to its conductivity and low inflammatory response has been used *in vitro* to promote cell adhesion, proliferation and growth of different types of cells such as neurons [21] and even to enhance neurite extension [22]. Nevertheless, the method of PPy synthesis is crucial for the construction of an adequate implant for biological systems because traditional chemical and electrochemical polymerization methods use compounds such as accelerators, solvents or intermediary products that present harmful traces to the organism and produce undesirable or adverse reactions in the body when implanted, especially if the implants are placed into the central nervous system, which has a very delicate physicochemical equilibrium. A non-contaminant method that uses electric variables instead of chemical reagents to induce the polymerization is the synthesis by plasma, which only requires the monomer (pyrrole) and dopants, without other potentially harmful compounds [23]. Our research group has used PPy iodine-doped (PPy/I) polymer synthesized by plasma for implantation into the transected spinal cord tissue, where we showed that polymer is biocompatible and is able to reduce the inflammatory response, increase tissue preservation and improve functional recovery after a lesion [18, 19]; however, the results have also shown that it is necessary to apply an additional therapeutic option to improve the functional recovery.

To date, the only acceptable therapeutic strategy used in the clinic, once the patient is stable, is passive and active physical rehabilitation with the aim of strengthening those muscles that still are active and to prevent spasticity

thereof because physical rehabilitation increases the neurotrophin levels in the muscles and spinal cord and induces and potentiates neuronal plasticity [24–26]. Moreover, active exercise performed mainly by locomotor training treadmill (TT) with or without partial body-weight support or robotic or manual assistance, has been shown to not only enhance locomotor function in both experimental and clinical studies but to also induce plasticity [27–29]. Therefore, to preserve the greatest amount of spinal cord tissue and to induce the neuroregenerative processes with the aim to obtain a higher functional recovery rate, the present study proposes the use of implants of PPy/I synthesized by plasma in therapeutic combination with TT for the treatment of a TSCI produced by contusion in rats.

2 Materials and methods

2.1 Synthesis of PPy/I implants

Thin films of PPy/I were synthesized by resistive radiofrequency (RF) glow discharges using a vacuum tubular glass reactor of 9 cm in diameter and 25 cm in length with stainless steel flanges and two stainless steel flat electrodes of 7.0 ± 0.05 cm in diameter and separated by 5.0 ± 0.05 cm. One electrode was connected to the ground and the other to the rf signal at 13.56 MHz and 80 W of an Advanced Energy RFX-600 power supply combined with a matching network. The pressure in the reactor was in the 10^{-1} mBar interval and the time of synthesis was 240 min. Under these conditions, electrical glow discharges were established with pyrrole (Aldrich, 98 %) and iodine (Aldrich, 99.8 %) used as monomer and dopant, respectively. No carrier gases or other chemical reagents were used during the synthesis. Both reactants were vaporized and entered into the reactor via separated ports and were mixed inside.

The glow discharges promoted simultaneous polymerization and doping processes producing thin films of PPy/I adhered to the internal reactor walls. After the synthesis the films were washed, swollen with acetone and distilled water, and removed from the reactor walls [23]. The films were dried and pulverized manually in an agate mortar for 10 min to obtain powder with particles of different geometry and size, called mesoparticles (MPs). Then, the MPs were sterilized in an autoclave and prepared in a suspension with saline solution at 5 mg/ml.

2.2 Characterization of PPy/I implants

The morphology of the MPs was analyzed with a Jeol JMS 5900LV scanning electron microscope (SEM) coupled with an EDS Oxford INCA-XACT probe for elemental analysis

and the images were processed with the Olympus Measure IT program (Olympus Soft Imaging Solutions GMBH, Johann-Krane-Weg 39 48149, Munster, Germany). The chemical structure was analyzed by infrared spectroscopy (IR) with a Nicolette 550 spectrophotometer at $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ intervals using 32 scans.

2.3 Traumatic spinal cord injury

All of the animals used in the present study were maintained under standard laboratory conditions with free access to food and water and handled in accordance to the General Mexican Law in Health [30]. The protocol was approved by the Scientific and Ethics Committees of the Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2010-3601-60).

Female Long Evans rats weighing 220–260 g were subjected to surgery under ketamine and xylazine anesthesia (77.5 and 12.5 mg/kg, respectively) intramuscular following the asepsis and antisepsis protocols. A skin incision from the middle back and the paravertebral muscles was made and the thoracic nine laminae were removed carefully, exposing the spinal cord tissue. Then, a moderate TSCI by contusion was produced using a NYU impactor and then paravertebral muscles and skin were sutured separately.

After the surgical procedures, animals were treated with an anti-inflammatory (5 mL/2L of paracetamol into the drinking water) and antibiotic (200 μ L of benzatinic penicillin, in one intramuscular dose). The rats recovered from the surgery and anesthesia in an intensive care unit for small animals (Schoer Manufacturing CO., Kansas City, MO, USA). Then, they were placed into individual acrylic cages with sterile sawdust where they received food and water ad libitum. Their intestine and bladder were handled with manual expression twice a day until automatism was recovered; visual inspection was performed daily to detect any skin irritation or *decubitus* ulcers.

The rats were allocated into four experimental groups as follows: Group 1. Vehicle (30 μ L of saline solution); Group 2. MPs (30 μ L of MPs); Group 3. Vehicle-TT (30 μ L of saline solution plus treadmill training); Group 4. MPs-TT (30 μ L of PPy/I MPs plus treadmill training).

2.4 Implantation of PPy/I into the injured spinal cord zone

Two days after the TSCI, rats were re-anesthetized as described before with the aim to expose the spinal cord. Then, the rats were injected using a Hamilton syringe into the injured spinal cord zone with vehicle (saline solution) or MPs (5 mg/mL). Afterwards, animals were sutured as previously described. The analgesic and antibiotic

treatments as well as the postsurgical cares were provided similarly to that after the TSCI surgery.

2.5 Treadmill training

The animals from the corresponding groups received physical rehabilitation on a walking treadmill of 42 inches for pets which was adapted with several lanes for the experiments. The rehabilitation was applied in a quadruped position, where the animals supported 100 % of their body weight. The TT began 6 days post-injury, and lasted 20 min daily, 5 days a week for a period of 2 months. The speed of the treadmill ranged from 13.9 to 16.7 cm/s.

2.6 Functional recovery

The recovery of motor function from the hind limbs of the rats was assessed individually during 4–5 min in an open field using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale. The test was applied by two observers blind to the treatment of each animal. The first evaluation was conducted 24 h after the TSCI with the aim to corroborate the paralysis on both of the hind limbs and then once a week during the following 9 weeks. The BBB functional scale is a 22-points test that evaluates the movements of the hip, knee and ankle joints, where 21 represents a normal function and 0 indicates no movement of none of the joints of the hind limbs [31].

2.7 Histological and morphometric analysis

Nine weeks after the TSCI, animals were anesthetized followed by an intraperitoneal administration of 0.2 mL of heparin. Then, a wide thoracotomy was performed, the ascending aorta was cannulated and 200 mL of cool physiological saline solution followed by 400 mL of 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer were perfused through the heart, using a peristaltic pump at 30 mL/min. Then, the spinal cord was obtained including the injured zone and the neighboring areas. The specimens were embedded in paraffin. Serial longitudinal sections of 10 μ m thickness were cut and stained with hematoxylin and eosin for histological and morphometric analysis. Digital images were obtained using a light microscope with a computerized system equipped with the IM 500 software and a CCD-IRIS Sony camera. The morphometric assessment was performed with the Image Database V.4.01 software from Leica. The preserved spinal cord tissue was measured in an area of 25.07 mm² surrounding the lesion. To have comparable evaluation areas, the ependyma was taken as a reference for the cuts.

2.8 Statistical analysis

The BBB scores were evaluated using the ANOVA of repeated measures followed by Dunnett's test. The preserved spinal cord tissue was statistically analyzed by the Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney U test. Significant differences were considered when $P < 0.05$. The analyses were performed using the SPSS 16.0 software.

3 Results

3.1 Morphology of MPs from PPy/I

Different morphological aspects of PPy/I are presented in Fig. 1, where particles of different size and irregular geometry with a tendency to form agglomerates with other neighboring particles can be observed. The MPs normal size distribution ranged from 0.006 and 25.9 μ m, with a mean of 4.2 μ m.

3.2 Chemical structure from MPs of PPy/I

An infrared (FT-IR) spectrum from the MPs of PPy/I is shown in Fig. 2, where the most significant absorption is found at 3430 cm^{-1} , which corresponds to the N–H bonds of pyrrole and O–H, as previously described [32]. The absorption at 2932 cm^{-1} indicates the presence of C–H aliphatic groups. The triple bonds of $\text{C}\equiv\text{N}$ and $\text{C}\equiv\text{C}$ are located at 2220 and 2364 cm^{-1} , and the double bonds between N, C and O such as $\text{N}=\text{C}=\text{C}$, $\text{O}=\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{C}=\text{C}$ can also be identified in different combinations in that region. The individual double bonds, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$, and $\text{C}=\text{N}$ can be related with the absorption in 1630 cm^{-1} , where $\text{C}=\text{C}$ bonds are part of the PPy structure and therefore of the polymers. The peak at 1435 cm^{-1} can be associated with the substitution of hydrogens in heteroaromatic rings. One of these possible substitutions can be identified in the small peak centered in 604 cm^{-1} , which indicates the presence of iodine in the polymeric particles.

3.3 Elemental analysis

The analysis of atomic percentage of C, N, O and I in MPs of PPy/I indicated that the C (74.78 %), N (14.38 %) and I (0.78 %) are part of MPs structure, but O (9.12 %) is an additional element that could be added by oxidation after synthesis as a consequence of the atmospheric interaction. The participation of I is low because this element has a doping function in the polymer.

Fig. 1 **a** SEM micrographs of mesoparticles (MPs) from polypyrrole/iodine (PPy/I) obtained with a Jeol JMS 5900LV scanning electron microscope at 1000 \times , where agglomerated particles of different sizes and shapes can be distinguished. **b** Graphic displaying the size distribution of MPs from PPy/I

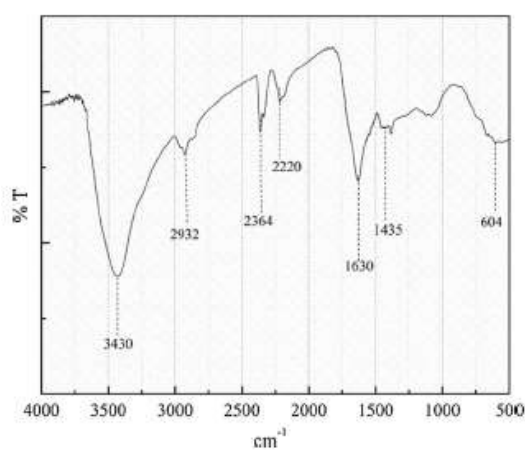
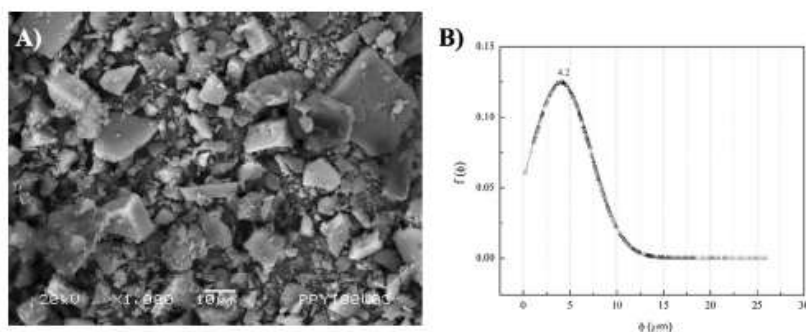


Fig. 2 Infrared (FT-IR) spectrum of mesoparticles (MPs) from polypyrrole/iodine (PPy/I), displaying the most important peaks observed during the analysis of the biomaterial before implantation into the injured spinal cord

3.4 Functional recovery

Motor function of the hind limbs was evaluated 24 h after the TSCI with the aim to corroborate complete bilateral paralysis in all of the rats (BBB = 0). Afterwards, the gradual improvement of each animal was assessed once a week during 9 weeks (Fig. 3). At the end of the follow up, the animals belonging to the vehicle group showed the poorest functional recovery, reaching only 8 in the BBB scale, which means that the rats had extensive movement of the three joints of the hind limbs (knee, hip and ankle) but without body weight support. Animals from the Vehicle-TT group had an average assessment of 10 in the BBB scale, which means that the rats showed extensive movement of the three joints, occasional body weight support, and plantar placement of the paw, whereas animals treated with MPs showed a better functional recovery (10.8)

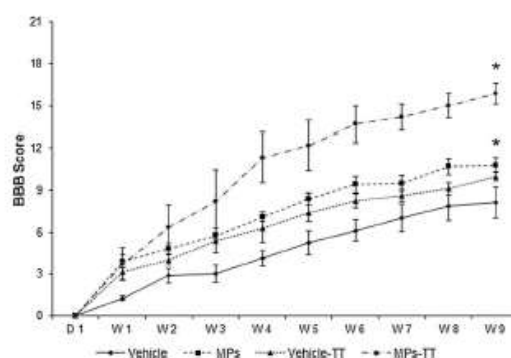


Fig. 3 Time course of functional recovery measured by BBB open field score after traumatic spinal cord injury (TSCI). Vehicle: saline solution; Vehicle-TT: saline solution plus treadmill training; MPs: implant of mesoparticles; MPs-TT: implant of mesoparticles plus treadmill training. The results are expressed as the mean \pm SE. Repeated-measures ANOVA test followed by Dunnett's test. *MPs and MPs-TT groups were significantly different from the Vehicle group ($P = 0.015$ and 0.000 , respectively)

because they had extensive movement in the three joints of the hind limbs, plantar steps and frequent or consistent weight support (Fig. 3). The rats with the MPs-TT therapeutic combination showed the highest score (15.8) in the BBB scale at week 9, which indicated that the animals were able to consistently support their body weight and display coordination during walking between hind limbs and fore limbs, and take plantar steps with a predominantly parallel paw position to the body. This behavior was significantly different in the MPs group ($P = 0.015$) and the MPs-TT group ($P = 0.000$) from that observed in the vehicle group.

3.5 Histological and morphometric analysis

Nine weeks after the TSCI, the animals were sacrificed to analyze the preserved tissue of the spinal cord and the

implants' integration into the nervous tissue. The amount of preserved spinal cord tissue was quantified in an area of 25.07 mm² per each spinal cord included in the analysis. Morphometric analysis showed that a better preservation of nervous tissue was observed in the groups implanted with MPs alone ($P = 0.034$) or in combination with TT ($P = 0.05$) when compared with the group that just received the vehicle.

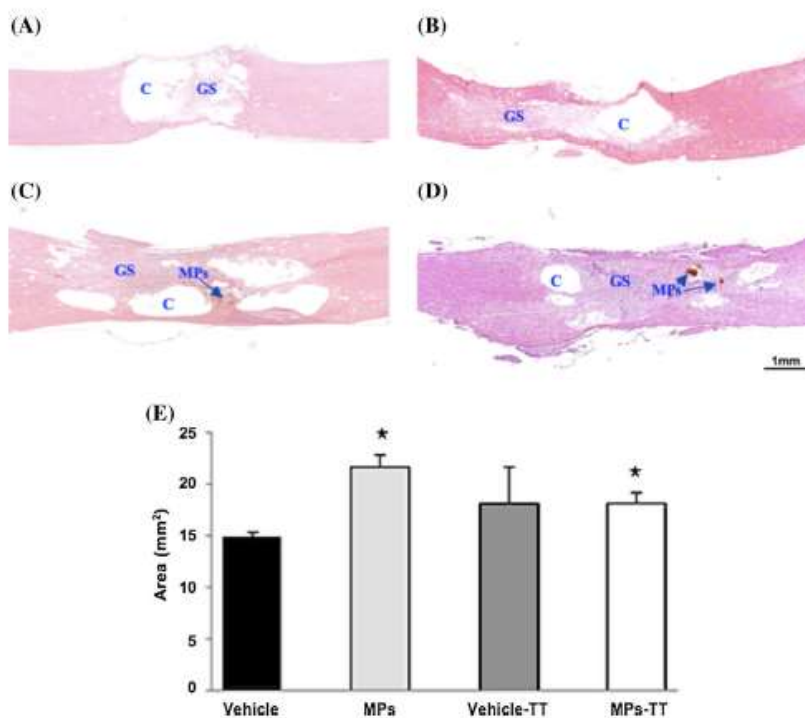
Photomicrographs of the spinal cords from the vehicle group showed the greatest tissue destruction, the biggest cystic cavities and a complete loss of histological architecture, with no differences between this and the vehicle-TT group ($P = 0.724$). The MPs-TT group showed a better preservation of the spinal cord tissue and fewer cystic cavities of different size at the injured zone than the rest of the groups. Although the animals with an implant of MPs displayed a good integration into the spinal cord tissue, the MPs tended to move toward the cephalic area without a response of rejection, but with an acute inflammatory response; however, this response was lower than that observed in the vehicle group (Fig. 4). Although the animals that received MPs showed a large glial scar that spread beyond the injury site toward the cephalic and caudal area, this scar was less evident when the rats received the implant of MPs in combination with TT

treatment, whereas the presence of inflammatory cells was less in the implanted group than in the non-implanted groups. Moreover, no evident response of rejection to the implant of MPs was detected in any case (Fig. 5).

4 Discussion

In the present study, we evaluated the effect of MPs of PPy/I that were synthesized using plasma and implanted 2 days after a TSCI by contusion. Because others have described the functional improvement after implantation of different biopolymers to be modest (for review see [33]), one of the goal of the present work was to increase the potential beneficial effects that our research group obtained before using implantation of PPy/I [18, 19]. Thus, this therapeutic strategy was used in combination with locomotor training on a treadmill. This combination increased the functional recovery in paraplegic animals, but did not increase the protection of the nervous tissue after a TSCI. These results could be due to an acceleration in the spontaneous plasticity of the surviving neural circuits of the spinal cord, more so than by neuroprotection of the spinal cord tissue in the acute phase of the lesion because the implants were

Fig. 4 Longitudinal sections of the spinal cord from representative rats from each experimental group that show the epicenter of the injured zone, the preserved tissue and the cystic cavities formed 2 months after a traumatic spinal cord injury, **a** Vehicle: saline solution; **b** Vehicle-TT: saline solution plus treadmill training; **c** MPs: implant of mesoparticles; **d** MPs-TT: implant of mesoparticles plus treadmill training. Magnification 2 \times . Hematoxylin/eosin stain. *MPs* implant of mesoparticles of PPy/I, *GS* glial scar; *C* cyst. **e** Graphic showing the results from the morphometric analysis where the MPs and MPs-TT groups were significantly different from the vehicle group ($P = 0.034$ and 0.05, respectively). Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test



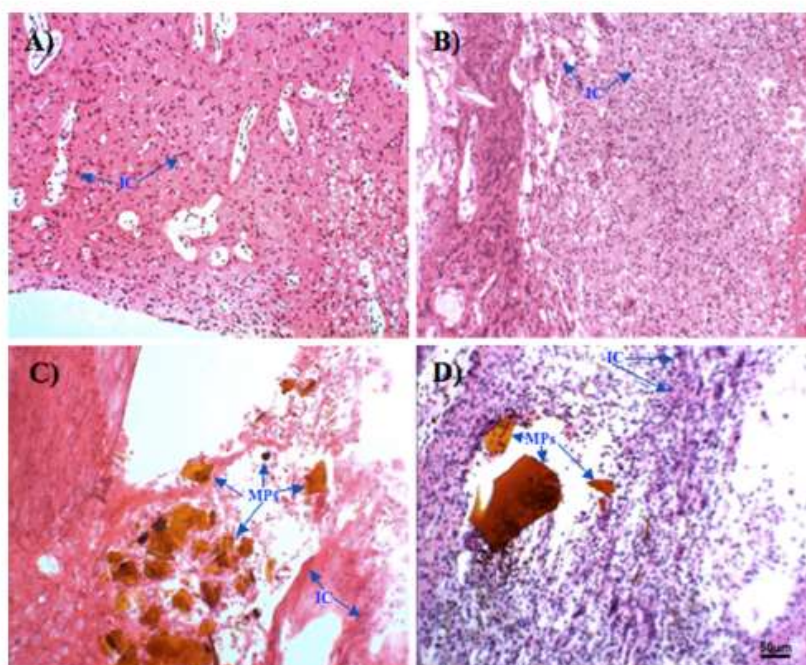


Fig. 5 Magnification of longitudinal sections of the spinal cord from representative rats of each group that show the epicenter of the injured zone, with and without the implants and the inflammatory response. **a** Vehicle: saline solution; **b** Vehicle-TT: saline solution plus

treadmill training; **c** MPs: implant of mesoparticles; **d** MPs-TT: implant of mesoparticles plus treadmill training. Magnification 20 \times . Hematoxylin/eosin stain. *MPs* mesoparticles of polypyrrole/iodine (PPy/I) implant; *IC* inflammatory cells

injected 2 days after the TSCI and the TT began 5 days later.

In previous studies, our research group showed that implants of films of PPy/I synthesized by plasma were able to decrease the inflammatory response, produce neuroprotection and promote functional recovery when implantation is performed immediately after a complete section of the spinal cord in adult rats [18, 19]. Nevertheless, in humans, the TSCI is usually produced by contusion and not by complete section, where surgical manipulation of the nervous tissue by implantation of scaffolds, films or solid neuronal bridges can produce further damage. So, in the present study, the TSCI model by contusion was used and the biomaterial was applied as MPs into the injured zone by direct injection 2 days after the lesion. Under these conditions, after 2 months, the MPs promoted more tissue preservation and functional recovery in comparison with the animals that received just the vehicle; however, the functional results improve if both therapeutic strategies were used together although without an increase in the amount of preserved tissue. So, this combination could stimulate specific mechanisms of neuronal plasticity in the

preserved spinal cord tissue more that stimulate mechanisms of neuroprotection or neuroregeneration.

Although different injectable biomaterials have been used previously in rats as implants after a TSCI such as collagen, fibrin, fibronectin and poly (lactic acid)-polyethylene glycol-poly(lactic acid), those implants enhance and support the oriented growth of axons but with a modest functional recovery [33–35]. Cigognini et al. [36] reported a self-assembling of the peptide RADA 16-I functionalized with a bone marrow homing motif (BMHP1) and optimized via the insertion of a 4-glycine-spacer (RADA16-4G-BMHP1) that was implanted immediately after a TSCI by contusion in rats. This peptide provided both physical and trophic support to nervous tissue ingrowth, increased cellular and axonal infiltration within the cyst, and improved functional recovery. Other researchers studied the effects of collagen, viscous fibronectin (FN), fibrin (FB) and fibrin/fibronectin (FB/FN) injected into an experimental cavity in the spinal cord of rats. A number of them displayed good integration with the host and were able to support axonal ingrowth in association with the infiltration of Schwann cells and deposit of laminin [37]; however, the

collagen implant resulted in uneven axonal growth because these implants contained a dense inclusion that the axons were not able to penetrate, whereas the animals implanted with FN had large cavities at the interface between the implant and host, and few surviving neurons in the intact spinal cord adjoining the implant site. Only the animals implanted with FB/FN showed a robust growth of axons [33]. Among the main characteristics of these materials is their rapid transformation from a liquid to a gel after being injected into the injured spinal cord and the formation of a scaffold thereafter; however, even if the implants show good integration into the nervous tissue and they promote axonal regeneration, one must consider that they are biodegradable materials. Thus, it is important to take note of any degradation products that can be produced because they could be toxic for the host, as well as the degradation rate, which should be synchronized with the frequency of nerve regeneration with the aim to avoid the risk of nerve compression or limitation of axonal growth. In the present work, the MPs did not generate a scaffold because they were suspended into a saline solution (vehicle). Thus, the MPs were dispersed throughout the lesion site and the surrounding areas without the risk of compression and cell growth between the implant was not limited. Although the MPs of PPy/I are non-biodegradable, the risk of toxicity was reduced because they were synthesized by plasma. Moreover, the implantation of MPs into the injured spinal cord was well-tolerated as it generated a discrete acute inflammatory response with no response of rejection, and no additional alterations in the animals' health during the 2 months of follow up. This positive effect could be also due to the method through which the implants were synthesized because if the MPs of PPy/I are obtained by plasma, no potentially toxic external agent is included during polymerization as is the case for traditional chemical and electrochemical methods [23]. In the polymerization by plasma, the reactions are performed by means of electric discharges that ionize the reactant monomers on their gaseous phase and the produced plasmas. Molecules, electrons and ions increase their kinetic energy and collide, breaking some chemical bonds in the monomers that will form the polymer, where only chemical compounds involved in this process are the monomers and its derivatives. This mechanism partly explains why polymers synthesized by plasma have different physical and chemical properties than those obtained by traditional chemical or electrochemical methods.

At the end of the follow up, the animals implanted with MPs of PPy showed a significant functional recovery in comparison with the animals that received just the vehicle, most likely due to the implant's physical and chemical properties. Polymer's conductivity is able to alter the local electric fields and modify the extracellular matrix and the

environment around the implant, promoting neuronal interactions, preventing cell death, controlling cell growth and inducing plasticity [38–41]. Because the resulting polymer synthesized by plasma can be a three-dimensional cross linked structure, this structure may affect the conductive properties of PPy. Moreover, the polymer was combined with iodine (PPy/I) during the synthesis with the aim to increase its ability to transfer electrical charges and thus negate a requirement for external sources of electrical stimulation for exerting its effect. Furthermore, the heteroaromatic amine groups of the polymer are well-tolerated by cells and they can promote interactions between them; however, more studies are needed to understand which molecules and neurotrophic factors are specifically involved in this process, and which mechanisms are responsible for improving functional recovery in the animals that received the implant of MPs of PPy/I.

Even though the implant of MPs had positive effects on neuroprotective processes and functional recovery after a TSCI, the best functional results were obtained when the implant of MPs was used together with the therapeutic strategy of rehabilitation with TT. Although different strategies of rehabilitation, such as swimming, bicycling, exercise via wheel running and TT have been applied in experimental models of TSCI with the aim to improve locomotion, not all of them have had a significant effect on functional recovery. Some authors showed no improvement in functional recovery assessed with the BBB scale using swimming as rehabilitation therapy, and compared with untrained animals with a TSCI by contusion since it has been proved that swimming induces extravasation in and around the site of injury [42]. Bicycling has been shown to help prevent muscle atrophy and restore the frequency-dependent depression of the H-reflex to the level of that of intact animals but without significant effects on the functional recovery in rats with spinal cord transection [43, 44]. Although exercise via wheel running has improved functional recovery in rats with contusion [45], TT with or without partial body-weight support or with robotic or manual assistance after a TSCI has a better effect on functional recovery because it engages new coordinative strategies that, although different from normal locomotion, generate foot motion very similar to normal; promotes reorganization of locomotor networks, both above and below the lesion site; and induces rostral and caudal plasticity to the injury zone because the circuits that control stepping as well as standing are highly plastic and their functional connectivity can be modulated by TT [46, 47]. Others have shown that TT induces plasticity by enhancing axonal outgrowth and Erk1/2 activation and promotes functional recovery in rodents and cats with spinal cord section or contusion [48–50]. In the present work, TT was implemented without body weight support,

with the aim that rats were able to walk voluntarily in their natural quadruped position, and thus the confusing variables associated with movements without voluntary control in a bipedal position due to external manipulation of researcher were avoided.

Although it was previously shown that TT promotes functional recovery, any protection of the nervous tissue was demonstrated in comparison with untrained animals in the present work. Nevertheless, results suggest that TT could induce and accelerate the spontaneous plasticity in the surviving axons and spinal cord circuits by altering their organization, structure and function, more so than by forming new fibers, which gives rise to better functional recovery when used in combination with PPy/I implants, but in a non significant way when applied alone; however, in accordance with other reports using rats with moderate contusion and TT without body weight support, TT is able to improve locomotor function through increasing the neuroplasticity in the spinal cord neural circuits where the recovery directly depends on TT rather than the spontaneous reorganization of the spinal circuits [51]. Therefore, untrained animals achieve an incomplete degree of recovery due to the spontaneous plasticity, which is limited.

In the present work, the combined therapeutic strategy of the implant of MPs plus TT had an additive effect on functional recovery. In the animals from the group that received the implant of MPs, a better functional recovery was observed than in the animals from the groups without the implant, from the first week post injury to the end of the follow up. Nevertheless, when the implant of MPs was combined with TT, the animals exhibited faster recovery than the animals in the other experimental groups until the fourth week. Thereafter, recovery continuously increased, although at a lower rate; however, no additive effects were demonstrated when both treatments were applied together. The results suggest the possibility that the implants of MPs alone induce plasticity due to the reorganization of the surviving neural circuits. When the implants are combined with TT, this plasticity is accelerated even more, but without direct association with the amount of preserved tissue, thus partly explaining why the combination of both therapeutic strategies produces better functional results than if they are applied separately.

Despite previous work, it is important to continue studying the physicochemical and morphological properties of the biomaterial and test different vehicles that prevent the mobilization of MPs far away from the injury site to improve the beneficial responses, in addition to studying their effect in the chronic phase. Furthermore, if implants of MPs of PPy have future applications in biomedicine, mainly in the central nervous system because of their size and the possibility to apply them without further damage to the nervous tissue, the use of injectable biomaterials for the

treatment of TSCI is still being tested; thus, it is necessary to continue studying and developing new strategies that may enable this treatment to be applied to humans with TSCI alone or in combination with other therapies to further enhance the previous and present results.

5 Conclusions

The implants of MPs of PPy/I synthesized by plasma displayed good integration into the nervous tissue without a rejection response when they were applied 2 days after a TSCI.

Although no additive effect on the preservation of nervous tissue was demonstrated when the implantation of MPs of PPy/I was used in combination with TT, the promotion of functional recovery was positively affected.

The use of both therapeutic strategies by separately could stimulate mechanisms of neuroprotection and neuroregeneration, but when using together they could potentiate the stimulation of mechanisms of neuronal plasticity in the preserved spinal cord tissue after a TSCI and produce a significant functional recovery.

Acknowledgments The work was supported by Instituto Mexicanos del Seguro Social (IMSS), Grant No. FIS/IMSS/PROT/G11/943 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Grant No. 47467. Laura Alvarez received a scholarship from CONACyT (No. 172211). The authors thank María del Carmen Baltazar for her invaluable technical assistance.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

References

1. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*. 2001;26(24 Suppl.):S2–12.
2. Raineteau O. Plastic responses to spinal cord injury. *Behav Brain Res*. 2008;192:114–23.
3. Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci*. 2004;24(18):4432–43.
4. Oudega M, Xu XM. Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *J Neurotrauma*. 2006;23:453–67.
5. Levi AD, Dancausse H, Li X, Duncan S, Horkey L, Oliviera M. Peripheral nerve grafts promoting central nervous system regeneration after spinal cord injury in the primate. *J Neurosurg*. 2002;96(2 Suppl):197–205.
6. Coumans JV, Lin TT, Dai HN, MacArthur L, McAtee M, Nash C, Bregman BS. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci*. 2001;21:9334–44.
7. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, et al. Transplantation of mesenchymal

- stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29:1614–25.
8. Straley KS, Foo CW, Heilshorn SC. Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *J Neurotrauma*. 2010;27(1):1–19.
 9. Wang M, Zhaid P, Chen X, Schreyer DJ, Sun X, Cui F. Bio-engineered scaffolds for spinal cord repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17:177–94.
 10. Josten EA. Biodegradable biomatrices and bridging the injured spinal cord: the corticospinal tract as a proof of principle. *Cell Tissue Res*. 2012;349:375–95.
 11. Ahn HS, Hwang JY, Kim MS, Lee JY, Kim JW, Kim HS, Shin US, et al. Carbon-nanotube-interfaced glass fiber scaffold for regeneration of transected sciatic nerve. *Acta Biomater*. 2015;13:324–34.
 12. Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M, Hashimoto T, Chou H, Bai H, Ohta M, Wu S, Suzuki K, et al. Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats. *Tissue Eng*. 2004;10:493–504.
 13. Stokols S, Tuszynski MH. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2006;27:443–51.
 14. Chen J, Zhang Z, Liu J, Zhou R, Zheng X, Chen T, Wang L, et al. Acellular spinal cord scaffold seeded with bone marrow stromal cells protects tissue and promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *J Neurosci Res*. 2014;92(3):307–17.
 15. Bakshi A, Fisher O, Dageci T, Himes BT, Fischer I, Lowman A. Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2004;1:322–9.
 16. Hejcl A, Urdzikova L, Sedy J, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Burian M, et al. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine*. 2008;8:67–73.
 17. Woerly S, Doan VD, Sosa N, de Vellis J, Espinosa-Jeffrey A. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J Neurosci Res*. 2004;75:262–72.
 18. Olayo R, Rios C, Salgado-Ceballos H, Cruz GJ, Morales J, Olayo MG, Alcaraz-Zubeldia M, et al. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19:817–26.
 19. Cruz GJ, Mondragón-Lozano R, Diaz-Ruiz A, Manjarrez J, Olayo R, Salgado-Ceballos H, Olayo MG, et al. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23:2583–92.
 20. Zamani F, Amani-Tehran M, Latifi M, Shokrgozar MA, Zaminy A. Promotion of spinal cord axon regeneration by 3D nanofibrous core-sheath scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(2):506–13.
 21. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Kiani S, Al-Deyab SS, et al. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(4):e17–35.
 22. Gomez N, Schmidt CE. Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81:135–49.
 23. Cruz GJ, Olayo MG, López OG, Gomez LM, Morales J, Olayo R. Nanospherical particles of polypyrrole synthesized and doped by plasma. *Polymer*. 2010;51:4314–8.
 24. Vaynman S, Gomez-Pinilla F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005;19:283–95.
 25. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 2007;30:464–72.
 26. Lynskey JV, Belanger A, Jung R. Activity-dependent plasticity in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*. 2008;45:229–40.
 27. Nessler JA, De Leon RD, Sharp K, Kwak E, Minakata K, Reinkensmeyer DJ. Robotic gait analysis of bipedal treadmill stepping by spinal contused rats: characterization of intrinsic recovery and comparison with BBB. *J Neurotrauma*. 2006;23:882–96.
 28. Knikou M. Plasticity of corticospinal neural control after locomotor training in human spinal cord injury. *Neural Plast*. 2012. doi:10.1155/2012/254948.
 29. Martinez M, Delivet-Mongrain H, Rossignol S. Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *J Neurophysiol*. 2013;109:2909–22.
 30. Ley General de Salud de la República Mexicana. 6th ed. México D.F.: Porrúa; 1995.
 31. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12:1–21.
 32. Morales J, Olayo MG, Cruz GJ, Olayo R. Synthesis by plasma and characterization of bi-layer aniline-pyrrole thin films doped with iodine. *J Polym Sci Part B*. 2002;40:1850–6.
 33. Krishna V, Konakonda S, Nicholas J, Varma A, Kindy M, Wen X. Biomaterial-based interventions for neuronal regeneration and functional recovery in rodent model of spinal cord injury: a systematic review. *J Spinal Cord Med*. 2013;36(3):174–90.
 34. Piantino J, Burdick JA, Goldberg D, Langer R, Benowitz LI. An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006;201:359–67.
 35. King VR, Alovskaya A, Wei DY, Brown RA, Priestley JV. The use of injectable forms of fibrin and fibronectin to support axonal ingrowth after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2010;31:4447–56.
 36. Cigognini D, Satta A, Colleoni B, Silva D, Donegà M, Antonini S, Gelain F. Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold. *PLoS ONE*. 2011;6:e19782.
 37. Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH. Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials*. 2006;27:519–33.
 38. Fine EG, Valentini RF, Bellamkonda R, Aebischer P. Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials*. 1991;12:775–80.
 39. Kotwal A, Schmidt CE. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials*. 2001;22:1055–64.
 40. Zhang Z, Rouabhia M, Wang Z, Roberge C, Shi G, Roche P, Li J, et al. Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artif Organs*. 2007;31:13–22.
 41. HajjHassan M, Chodavarapu V, Musallam S. Neuro MEMS: neural probe microtechnologies. *Sensors*. 2008;8:6704–26.
 42. Smith RR, Brown EH, Shum-Siu A, Whelan A, Burke DA, Benton RL, Magnuson DSK. Swim training initiated acutely after spinal cord injury is ineffective and induces extravasation in and around the epicenter. *J Neurotrauma*. 2009;26:1017–27.
 43. Nothias JM, Mitsui T, Shumsky JS, Fischer I, Antonacci MD, Murray M. Combined effects of neurotrophin secreting transplants, exercise, and serotonergic drug challenge improve function in spinal rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005;19:296–312.
 44. Reese NB, Skinner RD, Mitchell D, Yates C, Barnes CN, Kiser TS, Garcia-Rill E. Restoration of frequency-dependent

- depression of the H-reflex by passive exercise in spinal rats. *Spinal Cord*. 2006;44:28–34.
45. Engesser-Cesar C, Ichiyama RM, Nefas AL, Hill MA, Edgerton VR, Cotman CW, Anderson AJ. Wheel running following spinal cord injury improves locomotor recovery and stimulates serotonergic fiber growth. *Eur J Neurosci*. 2007;25:1931–9.
 46. Grasso R, Ivanenko YP, Zago M, Molinari M, Scivoletto G, Castellano V, Macellari V, et al. Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients. *Brain*. 2004;127:1019–34.
 47. Edgerton VR, Courtine G, Gerasimenko YP, Lavrov I, Ichiyama RM, Fong AJ, Cai LL, et al. Training locomotor networks. *Brain Res Rev*. 2008;57:241–54.
 48. Moshonkina T, Azelev V, Gerasimenko Y, Mathur R, Bijlani RL. Treadmill training accelerates restoration of locomotion after complete spinal cord transection in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2002;46:499–503.
 49. Oh MJ, Seo TB, Kwon KB, Yoon SJ, Elzi DJ, Kim BG, Namgung U. Axonal outgrowth and Erk1/2 activation by training after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2009;26:2071–82.
 50. Foret A, Quertainmont R, Botman O, Bouhy D, Amabili P, Brook G, Schoenen J, et al. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem*. 2010;112:762–72.
 51. Sun T, Ye C, Wu J, Zhang Z, Cai Y, Yue F. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2013;8:2540–7.

Anexo 4. Dictamen del Comité Local de Investigación en Salud 3601 de IMSS

Carta Dictamen Página 1 de 1



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado
COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3601

FECHA 28/06/2010

Estimado Hermelinda Salgado Ceballos

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

Implante de un polímero semiconductor sintetizado por plasma en combinación con rehabilitación física para restablecer la función motora después de una lesión traumática de la médula espinal

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes; por lo que el dictamen emitido fue de: **AUTORIZADO**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional

No. de Registro R-2010-3601-60

Atentamente


Dr(a). Carlos Freddy Cuevas García
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3601

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD MEXICANA

Anexo 5. Escala BBB para evaluar la función locomotora

- **Grado 0:** No se observan movimientos de las patas traseras (PT).
- **Grado 1:** Movimiento limitado (arco<50%) de una o dos articulaciones, usualmente de la cadera y/o rodilla.
- **Grado 2:** Movimiento amplio (arco<50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de otra.
- **Grado 3:** Movimiento amplio de dos articulaciones.
- **Grado 4:** Movimiento limitado de las tres articulaciones de la PT (cadera, rodilla y tobillo).
- **Grado 5:** Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
- **Grado 6:** Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
- **Grado 7:** Movimiento amplio de las tres articulaciones de la PT (Cadera rodilla y tobillo).
- **Grado 8:** Movimientos rítmicos (coordinados) de ambas patas PT sin soporte del peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
- **Grado 9:** Colocación plantar con soporte de peso cuando no está caminando o pasos ocasionales ($\leq 50\%$), frecuentes (51% al 94%) o constantes (95% al 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
- **Grado 10:** Pasos ocasionales con soporte plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.
- **Grado 11:** Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
- **Grado 12:** Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación ocasional entre PD y PT.
- **Grado 13:** Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación frecuente entre PD y PT.

- **Grado 14:** Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de patas, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También da pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT, y pasos dorsales ocasionales.
- **Grado 15:** Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo.
- **Grado 16:** Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.
- **Grado 17:** Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
- **Grado 18:** La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.
- **Grado 19:** Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
- **Grado 20:** Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constante. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, la cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.
- **Grado 21:** Igual al anterior, pero, tronco constantemente estable.

Anexo 6. Procedimiento de tinción. Método de Hematoxilina y Eosina de Harris

FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%, estabilizada, fijadores de Bovino o de Zenker.

SECCIONES: En parafina, celoidina o por congelación, de 3 a 20 micrones

SOLUCIONES:

Alcohol ácido al 1%:

Ácido clorhídrico	1ml
Etanol	99ml

Agua amoniacal:

Hidróxido de amonio al 28%	2 a 4ml
Agua destilada.	800ml a 1000ml

Solución saturada de carbonato de litio:

Carbonato de litio	1.54g
Agua destilada.	100ml

Solución de eosina-floxina.

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	5.0g
Etanol al 100%	50.0ml
Alumbre de potasio o de amonio	100.0g
Agua destilada	1000.0ml
Oxido rojo de mercurio	2.5g

Use un frasco de 2000ml para el alumbre y el agua, y uno más pequeño para el etanol y la hematoxilina. Disuelva completamente el alumbre en el agua destilada con la ayuda de calor y un agitador magnético. Agite vigorosamente para disolver la hematoxilina en el alcohol, a temperatura ambiente. Remueva el alumbre y el agua destilada de la fuente de calor. Lentamente combine las dos soluciones. Devuelva las soluciones ya combinadas a la fuente de calor. Haga hervir la mezcla tan rápido como sea posible, aproximadamente 1min o menos. Remueva del calor y lentamente añada el óxido de mercurio. Si el óxido de mercurio se añade muy rápidamente, la reacción hará que la solución hierva y se derrame. Devuelva la solución a la fuente de calor hasta que se torne de un color púrpura oscuro, remuévala del calor, y póngala en un recipiente con agua fría hasta que baje la temperatura. La solución entonces esta lista. Añada 20ml de ácido acético glacial para intensificar la tinción nuclear. Filtre la solución cada vez antes de usarla.

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinice las láminas e hidrate hasta llegar al agua destilada. “Dezenkerice,” si es necesario, antes de teñir.
2. Tiña en hematoxilina de Harris, filtrada recientemente, de 6 a 15min.
3. Lave en agua corriente de 2 a 5min.
4. Diferencie en alcohol ácido al 1%, 1 a 2 remojones.
5. Lave brevemente en agua corriente.
6. Coloque las láminas en una solución débil de agua amoniacal o en una solución saturada de carbonato de litio hasta que las secciones se vean de un color azul brillante.
7. Lave concienzudamente en agua corriente por 10min.
8. Coloque en etanol al 80% por 1 ó 2min.
9. Contraste en la solución de toxina-floxina por 2min.
10. Deshidrate y aclare a través de 2 cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto, y luego xileno, 2min en cada cambio.
11. Montar con medio resinoso.

RESULTADOS

Núcleo	azul
Citoplasma	de rosado a rojo
La mayoría de otros tejidos	de rosado a rojo



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00132
Matrícula: 2038296

IMPLANTE DE UN POLÍMERO SEMICONDUCTOR SINTETIZADO POR PLASMA EN COMBINACIÓN CON REHABILITACIÓN FÍSICA PARA RESTABLECER LA FUNCIÓN MOTORA DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de marzo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE EFREN ISRAEL GRIJALVA OTERO
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES




ANA LAURA ALVAREZ MEJIA
ALUMNA

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


DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMÉDICA)

DE: ANA LAURA ALVAREZ MEJIA

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

Aprobar

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LA RAISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI




DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE




DR. JOSE EFREN ISRAEL GRIJALVA OTERO

VOCAL



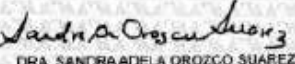
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL




DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

VOCAL



DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

SECRETARIO



DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES