



Casa abierta al tiempo

2

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**Unidad-Iztapalapa
Departamento de Ingeniería Eléctrica
Área de Ingeniería Biomédica**

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

**Estudio de implante de polímero semiconductor en
lesión de médula espinal en rata mediante tomografía
axial computarizada e imagenología por resonancia
magnética.**

Presenta:

Juan Carlos Axayacatl Morales Guadarrama

Febrero 2009



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad-Iztapalapa

Departamento de Ingeniería Eléctrica

Área de Ingeniería Biomédica

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

**Estudio de implante de polímero semiconductor en lesión de médula
espinal en rata mediante tomografía axial computarizada e
imagenología por resonancia magnética.**

Presenta:

Juan Carlos Axayacatl Morales Guadarrama

Asesores:

**Dr. Roberto Olayo González
Dr. Alfredo Odón Rodríguez González**

Sinodales:

**Dr. Camilo Ríos Castañeda
Presidente**

**Dr. Roberto Olayo González
Secretario**

**M. en I. Oscar Yáñez Suárez
Vocal**

Febrero 2009

Con amor y respeto dedico este trabajo a mis padres:

Juan Morales Corona.

Bertha Ma. Del Carmen Guadarrama Barraza.

por su comprensión, confianza y apoyo.

A

Joyce Rojas Hernández y Ajitzi Itzcoatl Morales Rojas

por su paciencia, cariño, comprensión y apoyo.

A

Laura, Rodrigo, Mario, Aldo y Fausto.

A todo aquel que sabe merece mi gratitud por la realización de esta tesis

Nemi Tinej Nemij, In Cem Anahuac Yolotly

Axayacatl

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) a través de una beca para Axayacatl Morales, proyecto SEP-2004-C01-46467.

Por su apoyo y colaboración:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Dr. Juan Morales Corona.
M. en C. Miguel Cadena Méndez.
Dr. Joaquín Azpiroz Leehan.
Ing. Ana Laura Alvarez Mejía.
Ing. Rodrigo Mondragón Lozano
Ing. Aldo Escalona Delgado

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA



Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz.
Dr. Camilo Ríos Castañeda.

PROYECTO CAMINA A.C.



Dra. Hermelinda Salgado Ceballos.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES.



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

VANDERBILT UNIVERSITY INSTITUTE OF IMAGING SCIENCE



M. en C. Richard A Baheza.

Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Conceptos (marco teórico)	5
3.1. Sistema nervioso	5
3.1.1. Tejido nervioso	5
3.1.1.1. Las neuronas.....	5
3.1.1.2. Células gliales.....	5
3.1.2. Estructura y función del sistema nervioso	6
3.2. Lesión de médula espinal	10
3.2.1. Epidemiología.....	11
3.2.1.1. Edad de riesgo	11
3.2.1.2. Nivel neurológico y magnitud de la lesión	12
3.2.2. Patofisiología.....	12
3.2.2.1. Lesión primaria	12
3.2.2.2. Lesión secundaria.....	13
3.2.2.2.1. Interrupción axonal y degeneración Walleriana.	17
3.2.2.2.2. La cicatriz glial.....	18
3.2.3. Estrategias terapéuticas	19
3.3. Polímeros	21
3.3.1. Polímeros semiconductores	21
3.3.1.1. Definición	21
3.3.1.2. Espectroscopía infrarroja	23
3.3.1.3. Polímeros conductores en aplicaciones biomédicas.	24
3.3.2. Métodos de polimerización	25
3.3.2.1. Químico.....	25
3.3.2.2. Electroquímico	26
3.3.2.3. Enzimático	26
3.3.2.4. Plasma de radiofrecuencia	27
3.3.3. Polimerización por plasma.	27
3.3.4. Ventajas de la polimerización por plasma.....	29
3.4. Tomografía Axial Computarizada	29
3.4.1. Historia	30
3.4.2. Rayos X.....	30
3.4.2.1. Características y propiedades.....	32
3.4.2.2. Rayos X y las sustancias.....	32
3.4.2.3. Calidad radiográfica	33
3.4.2.4. Factores que controlan la calidad.....	34
3.4.2.4.1. Densidad y corriente.....	34
3.4.2.4.2. Contraste y diferencia de potencial.....	34
3.4.3. Conceptos asociados al estrato explorado.	35
3.4.4. Densidad y atenuación	39
3.4.5. Absorción de la radiación	39
3.4.6. Irradiación axial	40
3.5. Imagenología por resonancia magnética	41

3.5.1.	Contraste en IRM	42
3.5.1.1.	Contraste por relajación longitudinal (T_1)	44
3.5.1.2.	Contraste por relajación transversa (T_2)	44
4.	Desarrollo experimental	46
4.1.	Síntesis del material	46
4.2.	Fabricación de la pastilla para implante	47
4.3.	Modelo de lesión e implante	48
4.4.	Tomografía axial computarizada	49
4.5.	Sacrificio y estudio histológico	50
4.6.	Imagenología por resonancia magnética	52
5.	Resultados	54
5.1.	Caracterización del Material	54
5.1.1.	Espectroscopia de infrarrojo, FT-IR	54
5.1.2.	Propiedades eléctricas	55
5.1.3.	Análisis termogravimétrico (TGA)	56
5.1.4.	Análisis de Rayos-X	56
5.1.5.	Análisis Morfológico	57
5.2.	Tomografía axial computarizada	58
5.2.1.	Coefficiente de absorción de PPy/I y médula espinal.	59
5.2.2.	Análisis de imágenes	62
5.3.	Estudio histológico	66
5.3.1.	Morfometría	70
5.4.	Reconstrucciones tridimensionales	73
5.5.	Tomografía e histología	75
5.5.1.	Grupo PPy/I	75
5.5.2.	Grupo control	76
5.6.	Capacidad de análisis con IRM en LPSCME e implante PPy/I.	77
6.	Conclusiones	83
6.1.	Conclusiones	83
6.2.	Perspectivas	84
	Apéndice A. Procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris.	88

Índice de figuras

Figura 2.1 Roedores con lesión por sección completa de la médula espinal.	3
Figura 3.1 Esquema de una neurona.	6
Figura 3.2 Estructura de la médula espinal (modificado de [7]).	7
Figura 3.3 Estructura de la médula espinal y las meninges[6].	8
Figura 3.4 Imagen de corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal [6].	9
Figura 3.5 Extensión de la lesión después del daño en segmentos específicos de la espina.	11
Figura 3.6 Causas de lesiones desde el año 2000[16].	12
Figura 3.7 Médula espinal 1 hora y 60 días post-LME.	13
Figura 3.8 Médula espinal intacta.	15
Figura 3.9 Médula espinal después de LME.	16
Figura 3.10 Degeneración Walleriana.	17
Figura 3.11 Representación esquemática del sitio de LME.	19
Figura 3.12 Fuentes potenciales de células madre / progenitoras para transplantar dentro de LME.	20
Figura 3.13 Regiones de absorción características para deformaciones de enlaces comúnmente observados.	24
Figura 3.14 Espectro de Infrarrojo para ácido propiónico.	24
Figura 3.15 Formas de radiación.	31
Figura 3.16 Rayos X y materia	33
Figura 3.17 Relación de densidad con mAs.	34
Figura 3.18 Campo de visión.	35
Figura 3.19 Matriz y Pixel	36
Figura 3.20 Voxel & Número CT.	36
Figura 3.21 Escala de números CT o escala de Hounsfield.	37
Figura 3.22 Ventana & Efecto del control de la ventana.	38
Figura 3.23 Efecto de la densidad en la transmisión de los rayos X.	39
Figura 3.24 Absorción total después de atravesar n capas.	40
Figura 3.25 Irradiación axial de un estrato.	41
Figura 3.26 Una serie de pulsos de 90°: secuencia saturación-reestablecimiento.	43
Figura 3.27 Secuencia saturación-reestablecimiento con T_R reducido.	44
Figura 3.28 Efecto del contraste en T_2	45
Figura 4.1 Diagrama del sistema para sintetizar PPy/I.	46
Figura 4.2 Cámara de reacción y PPy/I sintetizado.	47

Figura 4.3 Cortes tomográficos con diferentes parámetros, región anterior a LME.....	50
Figura 4.4 Muestra extraída de médula espinal.....	51
Figura 4.5 Cortes histológicos a médula espinal con implante de PPy/I. Muestran la integración del implante y el tejido nervioso.....	52
Figura 4.6 Imagen de resonancia magnética obtenida con los parámetros definidos.....	53
Figura 5.1 Espectro de infrarrojo de PPy/I	54
Figura 5.2 Descomposición térmica del PPy/I	56
Figura 5.3 Difractograma de rayos-X de PPy/I	57
Figura 5.4 Microfotografía SEM de PPy/I 500x (A), 10,000x (B) y 20,000x (C)	58
Figura 5.5 Microfotografías laterales SEM a)1;000x y b)2;000x	58
Figura 5.6 Estudios sin procesamiento	59
Figura 5.7 Estudio TAC de columna vertebral muestra los coeficientes de absorción de la médula espinal.	60
Figura 5.8 Estudio TAC de laminectomía muestra los coeficientes de absorción de la médula espinal en zona de lesión segmentados con Osirix.	61
Figura 5.9 Estudio TAC de médula espinal de rata con LPSCME e implante de PPy/I.	61
Figura 5.10 Segmentación del implante por la herramienta OSIRIX, para obtener los coeficientes de absorción del polímero.....	62
Figura 5.11 Estudios con color falso en tejido nervioso	63
Figura 5.12 Estudios sin procesamiento	63
Figura 5.13 Ampliación: disco vertebral y tejido nervioso.	63
Figura 5.14 Tinción en zona de lesión.....	64
Figura 5.15 "n" colores falsos aplicados.....	65
Figura 5.16 Imágenes a diferente distancia del epicentro de lesión -3.6mm, -3.2mm, 0, 3.4mm y 4mm respectivamente	65
Figura 5.17 Corte histológico a la médula espinal con implante a una semana de evolución.	66
Figura 5.18 Corte histológico a la médula espinal con implante a cuatro semanas de la lesión.....	67
Figura 5.19 Corte histológico a la médula espinal con implante a ocho semanas de evolución.....	67
Figura 5.20 Corte histológico a la médula espinal grupo control a una semana de evolución.	68
Figura 5.21 Corte histológico a la médula espinal grupo control, cuatro semanas post lesión.	68
Figura 5.22 Corte histológico a la médula espinal grupo control con ocho semanas de evolución.....	68
Figura 5.23 Histologías, primer semana	69
Figura 5.24 Histologías, segunda semana.....	69
Figura 5.25 Histologías, tercer semana.....	69
Figura 5.26 Histologías, cuarta semana	70
Figura 5.27 Histologías, quinta semana	70

Figura 5.28 Histologías, sexta semana	70
Figura 5.29 Histologías, octava semana	70
Figura 5.30 Histología control con a una semana post lesión, segmentada para morfometría.	71
Figura 5.31 Histología grupo PPy/I con una semana de rehabilitación, segmentada para determinar rasgos característicos.	71
Figura 5.32 Histología control octava semana post lesión, segmentada para morfometría.	72
Figura 5.33 Histología grupo PPy/I con ocho semanas de rehabilitación, segmentada para determinar rasgos característicos, centro relleno como polímero, se asume que se pierde ese polímero durante la técnica histológica.....	73
Figura 5.34 Reconstrucción 3D con implante.....	74
Figura 5.35 Imagen 3D extensión de la laminectomía	74
Figura 5.36 Imagen 3D anterior a la laminectomía con tejido preservado.....	75
Figura 5.37 Imagen 3D del implante PPy/I a 4hrs post-lesión y 4 semanas post-lesión.....	75
Figura 5.38 Prueba histológica y reconstrucción de la zona de lesión grupo PPy/I	76
Figura 5.39 Reconstrucción ortogonal e histología en zona de lesión, grupo control	76
Figura 5.40 Reconstrucción 3D en zona de lesión y extensión del quiste del epicentro de lesión, grupo control.....	77
Figura 5.41 Imagen de resonancia magnética obtenida con los parámetros definidos.....	78
Figura 5.42 IRM de médula espinal tratada y ubicación del corte anterior a la zona de lesión.	78
Figura 5.43 Reconstrucción 3D en la zona del corte de la Figura 3.36	79
Figura 5.44 IRM al inicio de la zona de lesión, ubicación ortogonal.....	80
Figura 5.45 Reconstrucción 3D en la zona anterior a la lesión	80
Figura 5.46 IRM en zona de implante, ubicación ortogonal.	81
Figura 5.47 Reconstrucción en zona de lesión	81
Figura 5.48 Reconstrucción 3D IRM. A) Materia gris y meninges, B) zona de lesión.....	82
Figura 5.49 Reconstrucción 3D expansión de la lesión.	82
Figura 5.50 Comparación entre una fotografía histológica e IRM(sin procesamiento), ambas en zona de lesión.	83

1. Resumen

Cuando existe una lesión de médula espinal (LME) la función de transmitir señales desde y hacia el cerebro a través de está se ve comprometida, generando así paraplejía o tetraplejía según el nivel de la lesión, este tipo de lesión afecta principalmente a la población económicamente activa. En la actualidad no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para reestablecer la función neurológica normal. Durante varios años se ha propuesto el posible efecto benéfico de los implantes en el tejido nervioso después de una LME con el fin de promover una posible recuperación funcional.

Diferentes polímeros derivados del pirrol sintetizados por plasma han sido recientemente implantados en ratas con lesión por sección completa de médula espinal (LPSCME), demostrando contribuir a la recuperación después de dicha lesión. La LPSCME puede ser estudiada usando técnicas radiológicas como: IRM, TAC o PET, estas técnicas ofrecen una forma no invasiva de poder estudiar la evolución de la lesión en animales. Los estudios obtenidos ofrecen ventajas sobre los procedimientos histológicos tradicionales, principalmente por que los sujetos de experimentación no tienen que ser sacrificados para estudiar los diferentes tejidos de interés a diversas etapas durante la evolución de la lesión.

En este trabajo, se analizan y estudian imágenes de tomografía axial computarizada *in vivo*, tomadas cronológicamente a los especímenes con LPSCME con y sin implante, usando técnicas de procesamiento digital que permitan mejorar el contraste entre hueso, tejido nervioso y polímero implantado facilitando la ubicación del implante, determinar el grado de disgregación del mismo (factor determinante en la recuperación funcional motora) permitiendo también realizar comparación entre la cantidad de material perceptible a diferentes semanas post-lesión para el mismo sujeto experimental; así como reconstrucciones tridimensionales que aportan una mejor percepción del arreglo estructural del polímero, la ubicación del implante y la existencia de quistes.

Se obtuvieron IRM de una médula espinal aislada, con implante de polímero. Las cuales también son procesadas para su mejor apreciación. Obteniendo una calidad superior de detalles anatómicos sobre las imágenes por TAC, permitiendo una clara diferenciación entre materia blanca, materia gris, el material implantado y la formación de quistes debido al daño secundario de lesión. En este caso las reconstrucciones tridimensionales nos permiten observar tejidos y la preservación de los mismos en la zona de lesión (como la discontinuidad de los cuerpos neuronales), el grado de destrucción de la citoarquitectura de la médula espinal y la extensión de la lesión.

2. Introducción

La médula espinal es responsable de transmitir señales desde y hacia el cerebro, cuando existe una lesión de médula espinal (LME) esta función se ve comprometida y afecta principalmente a la población económicamente activa. En la actualidad no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para reestablecer la función neurológica normal, esto se debe a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario, así como la baja capacidad de regeneración espontánea de las células neuronales.

Durante varios años se ha propuesto el posible efecto benéfico de los implantes en el tejido nervioso después de una LME con el fin de promover una posible recuperación funcional. Los implantes pueden estimular el crecimiento axonal, quizá por la adecuada combinación de diversos tipos celulares y la interacción con diversos factores de crecimiento. Se han desarrollado diferentes protocolos como cultivos celulares, implantes de células progenitoras neuronales de embriones, implantes de polímeros conductores, etc. Estos estudios han demostrado que los implantes promueven una mayor recuperación funcional, sin embargo; los mecanismos que la favorecen son poco claros.

Los polímeros conductores son aquellos materiales formados por largas cadenas de hidrocarburos con dobles enlaces alternos o conjugados; los cuales reúnen las propiedades eléctricas de los metales y mecánicas de los plásticos. Los polímeros conductores pueden ser sintetizados y dopados por métodos químicos, electroquímicos, enzimáticos o por plasma de radiofrecuencia (polimerización por plasma).

El uso de materiales sintéticos, o materiales naturales modificados para aplicaciones biomédicas es extenso. Estos materiales se conocen como biomateriales (material o combinación de materiales de origen natural o sintético utilizados para la confección de sistemas destinados a la interacción con el medio biológico) y ejemplos de estos son los polímeros semiconductores.

Los polímeros conductores sintetizados por plasma e implantados en ratas adultas con lesión por sección completa de médula espinal favorecen en la protección del tejido nervioso adyacente a la lesión así como en la recuperación funcional de los animales de forma significativa, al compararlos con animales lesionados pero sin implante (Figura 2.1).

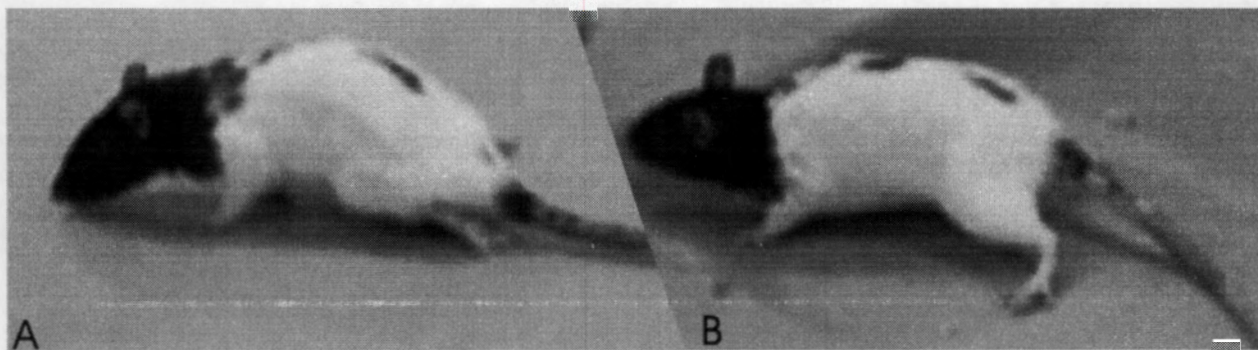


Figura 2.1 Roedores con lesión por sección completa de la médula espinal.

A) Muestra el resultado de una lesión por sección completa de médula espinal, el tren posterior es arrastrado por completo. **B)** Animal con mismo procedimiento quirúrgico con implante de PPy/I, donde el tren posterior es soportado por las patas traseras.

El grado de daño inicial y los eventos patobiológicos subsecuentes a la lesión son principalmente evaluados usando métodos invasivos o terminales como histología o inmunohistoquímica para correlacionar con el comportamiento (generalmente función motora) en los modelos de LME. Aunque estos métodos tradicionales son esenciales para establecer los caminos y los mecanismos implicados en los acontecimientos post-lesión, es necesario sacrificar a los animales en diferentes etapas para obtener los tejidos requeridos, para su estudio se usan métodos de tñido y un análisis extenso de pruebas histológicas.

Otras aproximaciones, como tomografía axial computarizada e imagenología por resonancia magnética, ofrecen una manera de sondear la evolución de la lesión de una manera no invasiva, de modo que cada animal puede actuar como su control a través del tiempo in vivo.

Hipótesis.

Después de una lesión por sección completa de la médula espinal en ratas adultas es posible llevar a cabo un seguimiento prospectivo de rasgos geométricos de la zona de lesión con y sin implante de polímero semiconductor mediante tomografía axial computarizada e imagenología por resonancia magnética.

Objetivos.

- Determinar rasgos morfométricos en la zona de lesión: longitud de la laminectomía, existencia de quistes, ubicación espacial del polímero, arreglo estructural del polímero y grado de disgregación del polímero usando tomografía axial computarizada.
- Obtener el coeficiente de absorción de rayos X del polímero empleado.

- **Determinar la capacidad de análisis de la lesión y zona de implante con IRM.**
- **Determinar correspondencia entre la arquitectura de pruebas histológicas de la médula espinal con sus correspondientes estudios radiológicos.**

3. Conceptos (marco teórico)

3.1. Sistema nervioso

Las neuronas del cerebro y de la médula espinal forman el sistema nervioso central, que está conectado con el resto del cuerpo a través de nervios periféricos. El cerebro y el cuerpo se comunican entre sí a través de miles de millones de señales eléctricas y químicas. Esta incesante actividad emana de las neuronas, o células nerviosas y de sus fibras de gran longitud (axones).

3.1.1. Tejido nervioso

El tejido nervioso es una compleja red de células. Se compone de 2 tipos de células básicas: las neuronas y las células gliales.

3.1.1.1. Las neuronas.

Las neuronas realizan todas las funciones especializadas atribuidas al sistema nervioso (SN) como recibir e integrar en forma simultánea estímulos provenientes de varias fuentes, traducir el estímulo en una diferencia de potencial eléctrico entre las superficies de sus membranas, propagar esta diferencia de potencial, traducir la señal eléctrica en mensajeros químicos y llevar estos mensajeros a células blancas[1, 4].

Una neurona tiene 4 regiones definidas morfológicamente (Figura 3.1): cuerpo celular o soma, es el centro metabólico celular; del soma nacen múltiples prolongaciones ramificadas que constituyen las principales áreas receptoras de la neurona, las dendritas que reciben señales de miles de puntos de contacto con otras neuronas; cada neurona tiene un axón que abandona el soma, estos transmiten las señales nerviosas a otras células; los axones presentan ramificaciones cerca de sus terminaciones por donde pasan las señales a través de conexiones especializadas (sinapsis), la señal puede ser transmitida mediante neurotransmisores en una sinapsis química o transmitida por iones en una sinapsis eléctrica [1, 4].

3.1.1.2. Células gliales

En el sistema nervioso central (SNC) las células gliales forman la neuroglia y se dividen en: oligodendrocitos cuya función es proveer de un recubrimiento de mielina a los axones; la astrogía encargada de múltiples funciones, entre ellas la regulación de diversos sustratos y precursores para la síntesis de citosina, neurotransmisores, etc.; finalmente la microglia, que es de origen mesodérmico (embrionario), cumple la función de responder como células inflamatorias cuando existe un estímulo traumático o infeccioso sintetizando citocinas.

Mientras que en el sistema nervioso periférico (SNP) las células encargadas de mielinizar los axones son las células de Schwann (CS). Las funciones de estas células incluyen sostén estructural y nutricional de las neuronas, aislamiento eléctrico y aumento, mediante las vainas de mielina, de la velocidad de conducción del impulso a lo largo de los axones [1, 3, 4].

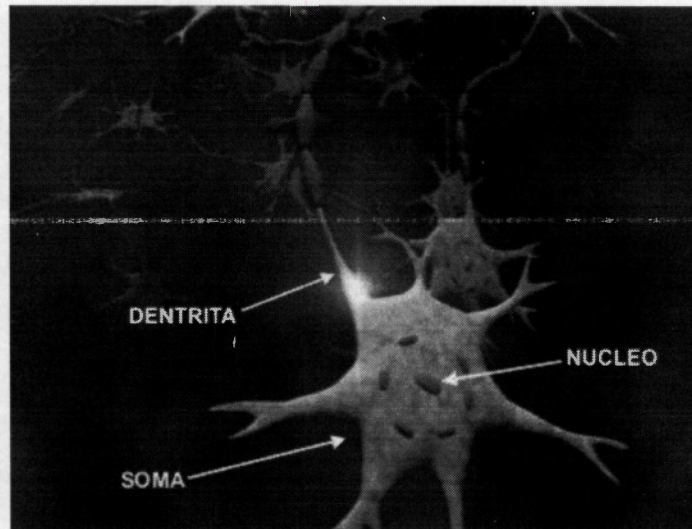


Figura 3.1 Esquema de una neurona.

3.1.2. Estructura y función del sistema nervioso

El sistema nervioso está altamente integrado, pero, se puede dividir en 2 subsistemas: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico[5].

El sistema nervioso central (SNC) incluye al encéfalo y a la médula espinal (Figura 3.2). En el SNC, los grupos de cuerpos celulares neuronales (con sus dendritas y porciones proximales de sus axones) constituyen la sustancia gris; los grupos de los axones en su mayor parte mielinizados son llamados sustancia blanca. El SNC, esta ubicado en un plano profundo del organismo, rodeado y protegido por el hueso, consiste del cerebro dentro del cráneo y la medula espinal que se extiende por el conducto vertebral, hasta aproximadamente la primera y segunda vértebras lumbares.

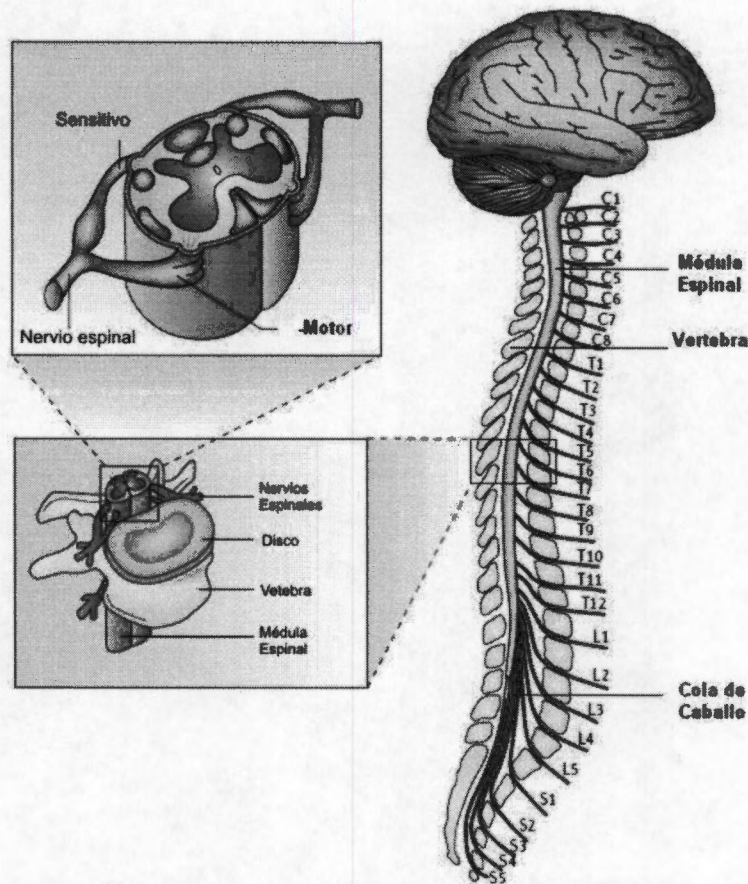


Figura 3.2 Estructura de la médula espinal (modificado de [7]).

La columna vertebral humana consta de 33 vértebras unidas por ligamentos y cartílagos. Existen 3 membranas que rodean a la médula espinal: La duramadre, la aracnoides y la piamadre, llamadas en conjunto meninges (Figura 3.3). La duramadre es la más externa, es una cubierta tubular fibrosa y resistente que desciende hasta la segunda vértebra sacra donde termina en forma de saco [6]. El espacio epidural separa a la duramadre de la columna vertebral y contiene tejido areolar laxo y plexos venosos. El espacio subdural es un espacio estrecho entre la duramadre y aracnoides subyacente. La aracnoides es una membrana transparente delgada, separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo que contiene el líquido cefalorraquídeo. La piamadre se adosa íntimamente a la médula espinal.

En sección transversal (Figura 3.4) se ve que la médula espinal contiene una masa de sustancia gris en forma de "H" rodeada por sustancia blanca, la sustancia gris está constituida por dos mitades simétricas unidas en la línea media por una conexión transversal (comisura), de sustancia gris, a través de la cual corre un pequeño conducto central. La columna gris anterior (asta anterior) está delante del conducto central y contiene las células que dan origen a las fibras de las raíces ventrales. La columna lateral contiene células preganglionares del sistema nervioso

autónomo. La columna gris posterior (asta posterior) es una columna larga y delgada que llega casi hasta el surco colateral posterior. Esta cubierto por una masa en forma de media luna, de tejido translucido, que contiene células nerviosas.

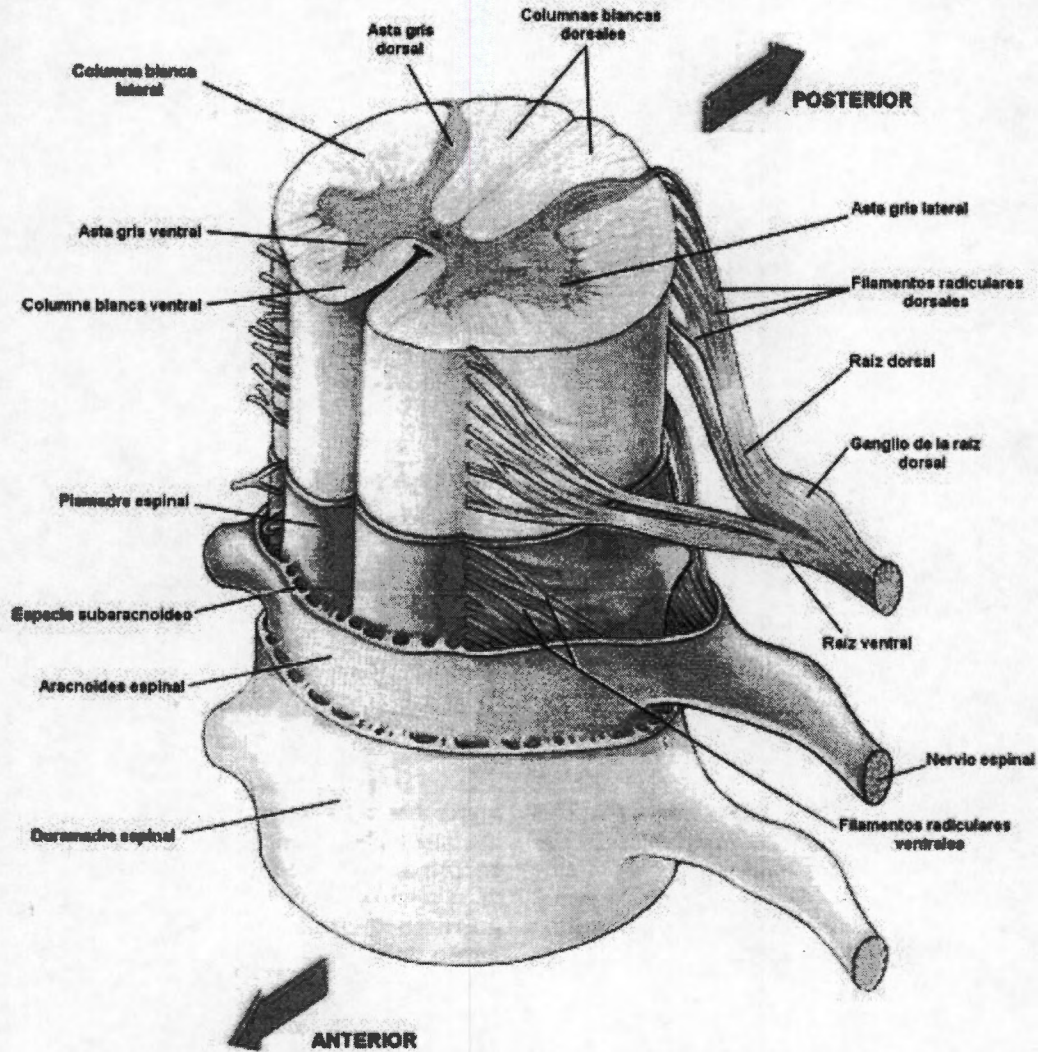


Figura 3.3 Estructura de la médula espinal y las meninges[6].

La formación reticular es una red de prolongaciones que se extienden dentro del cordón lateral situado entre los cordones anterior y posterior. La forma, cantidad y aspecto de la sustancia gris varía a diferentes niveles. La sustancia gris de la médula espinal puede ser dividida en 2 componentes: motor y receptor. La parte motora comprende a las columnas anterior y lateral y da origen a las raíces anteriores. Contiene el asta anterior con motoneuronas que inervan a la musculatura estriada voluntaria. Las células de la columna lateral dan origen a fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo, torácico y lumbosacro las cuales abandonan la médula espinal con la raíces anteriores[6].

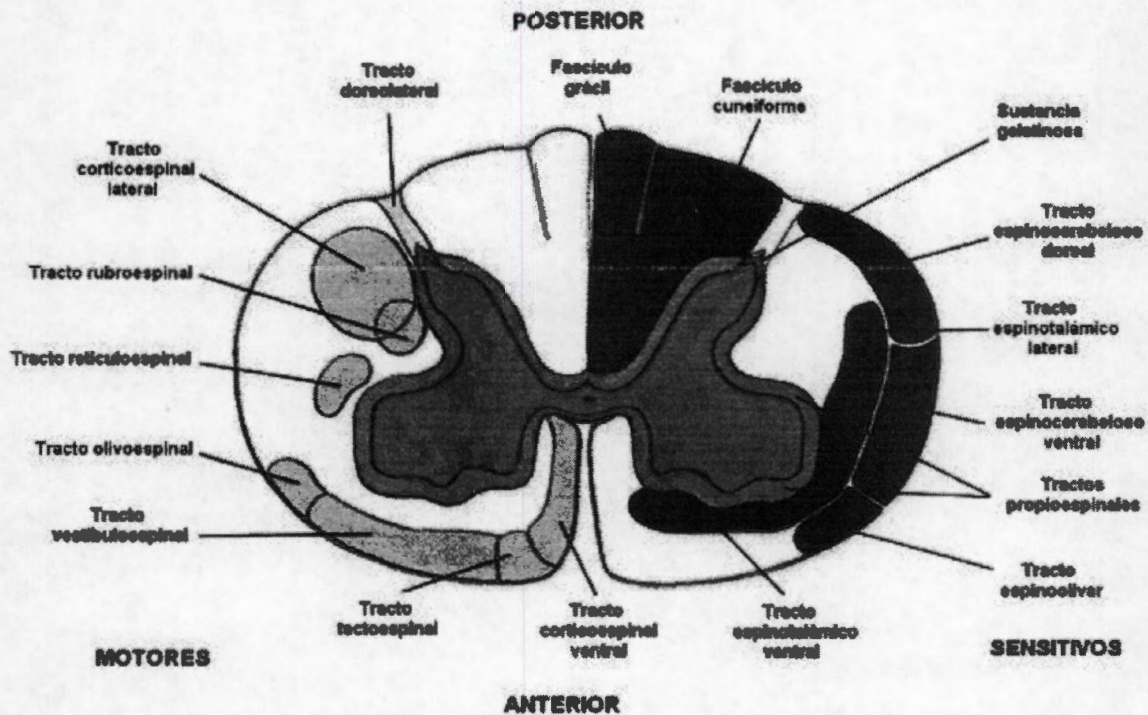


Figura 3.4 Imagen de corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal [6].

En el sistema nervioso periférico (SNP) los axones están protegidos por 3 envolturas separadas de tejido conjuntivo: endoneuro, perineuro y epineuro, presentes a todo lo largo del nervio. Cada fibra nerviosa con sus respectivas CS son envueltas por un endoneuro de tejido conjuntivo formado por una fina malla de microfibrillas de colágena orientadas longitudinalmente, que está en contacto directo con la lámina basal de las CS y envuelve además a los capilares que nutren a la fibra nerviosa, fibroblastos, macrófagos y células cebadas[8].

Las fibras nerviosas individuales se agrupan constituyendo fascículos ceñidos por un perineuro que anatómicamente es continuación de la aracnoides que envuelve a la médula espinal. El perineuro consta de una o varias capas celulares, según el diámetro del nervio, alternadas con redes de microfibrillas de colágena. Las células que forman este tejido son planas, escamosas y producen una delgada lámina basal en ambas caras celulares, que funciona como una barrera protectora semipermeable entre las fibras nerviosas y el tejido epineural; estas células son contráctiles debido a que contienen una gran cantidad de microfilamentos similares a los que poseen las células musculares lisas[8]. Todo el conjunto de haces de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y tejido adiposo se encuentra envuelto por el epineuro, formado por abundantes fibras de colágeno[9, 8].

Las fibras del nervio periférico (NP) se clasifican en mielínicas y amielínicas de acuerdo a la presencia o no de la vaina que forman las CS alrededor del axón. Las

fibras amielínicas se origina por la asociación de los axones con las CS formando haces de aproximadamente 5 a 20 fibras inmersas en una misma CS la cual envuelve y protege al conjunto de axones que integren columnas continuas y se interdigitan a lo largo del NP[2, 10] En las fibras mielinizadas, la vaina de mielina se produce cuando las CS envuelven al axón originando un estrecho contacto entre las caras externas de su membrana; una vez formada la vaina, esta se interrumpe a intervalos de los nódulos de Ranvier por lo que cada segmento se halla mielinizado por una sola CS.

3.2. Lesión de médula espinal

El trauma a la médula espinal causa la disfunción de la médula, con la pérdida de función sensorial y motora, distal al punto de lesión. La mayoría de las lesiones de médula espinal (LME) en la vida urbana, se deben a la fractura o dislocación de la columna vertebral. Esto se presenta comúnmente por compresión con flexión torácica así como flexión o hiperextensión en la médula cervical. Los indicadores que aumentan el riesgo de LME como resultado de trauma mínimo son: preexistencia de espondilosis, estenosis espinal congénita, hipertrofia del ligamento e inestabilidad en la unión de las apófisis debido a artritis reumatoide[11].

La manifestación de la LME tiene grados que varían y es enteramente dependiente en la severidad y el nivel de lesión en la médula (Figura 3.5). La regla es que cuanto más alto es el nivel de la lesión, más severas son las consecuencias. En el caso de alta lesión cervical, los pacientes requieren de respiración artificial para permanecer con vida. Este tipo de lesión conduce a tetraplejía, a la debilitación de la función en órganos pélvicos y a la pérdida de función motora y sensorial de los brazos, tronco y piernas. La lesión para bajos niveles de la médula, depende también del nivel exacto, puede dejar la función de los miembros superiores con debilitación limitada hasta miembros más abajo. La paraplejía se restringe a lesiones de la cuerda torácica o lumbar[12]. Hay cuatro tipos generales de lesión de la médula espinal

1. Maceración de la médula, en la cual la morfología de la médula se tuerce seriamente
2. Laceración de la médula (Heridas por arma de fuego o cuchillo);
3. Contusión de la médula, que puede desarrollarse en siringomielia (formación de quistes).
4. Lesión sólida de la médula, en la cual no hay foco central de necrosis como en lesión por contusión.

Dentro de estos cuatro tipos de lesión, el grado de completud debe ser considerado, pues las lesiones incompletas beneficiarán dramáticamente las intervenciones experimentales que las lesiones completas, en términos del grado de la recuperación que puede ser obtenido[13].

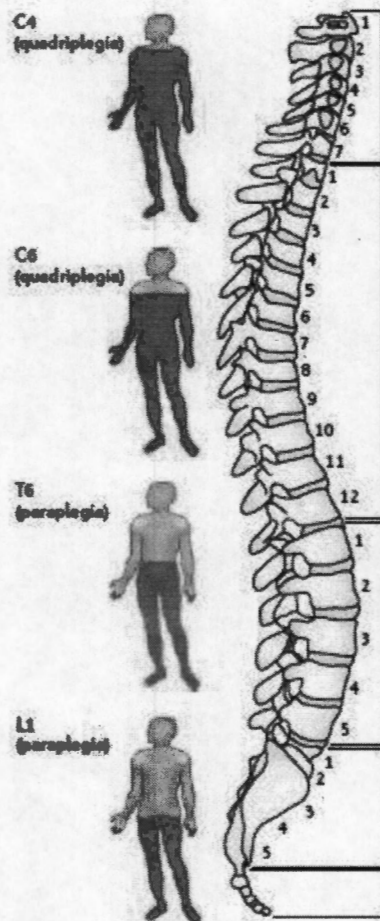


Figura 3.5 Extensión de la lesión después del daño en segmentos específicos de la espina. (Modificado[14]).

3.2.1. Epidemiología

En el mundo se estiman 2.5 millones de personas que viven con una lesión de médula espinal (LME), con más de 130,000 nuevos casos reportados al año[15]. Por ejemplo en EE. UU, se presentan aproximadamente 40 casos por millón, aproximadamente 11,000 casos nuevos por año[16].

3.2.1.1. Edad de riesgo

La mayoría de casos de trauma a la médula espinal ocurre en jóvenes adultos. De 1973 al 1979, el promedio de edad del daño fue 28.7 años, y la mayoría de estas heridas ocurrieron entre las edades de 16 a 30. Sin embargo, mientras la edad media de la población ha aumentado por aproximadamente 8 años desde 1970, el promedio de edad de lesión también ha aumentado. Desde el 2000, el promedio de edad de trauma ha aumentado a los 38 años. Además, el porcentaje de personas mayor de 60 años lesionados ha aumentado de 4.7% antes de 1980 a 11.5% desde el 2000. Este aumento en la edad de lesionados podría ser atribuido por cambios en la

manera de reportar del Centro de Estadísticas la localización geográfica de los sistemas modelos, el porcentaje de sobrevivencia de las personas mayores lesionadas o la edad específica del índice de incidencia[16].

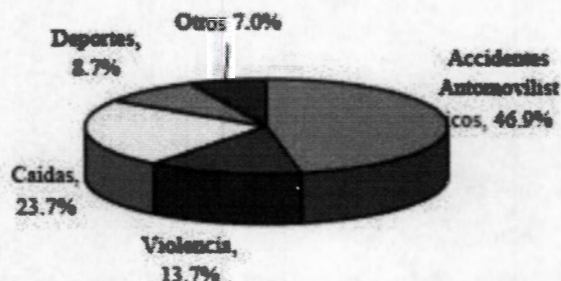


Figura 3.6 Causas de lesiones desde el año 2000[16].

3.2.1.2. Nivel neurológico y magnitud de la lesión

Personas con tetraplejía han sostenido daño a una de los ocho segmentos cervicales de la médula espinal; aquellos con paraplejía tienen lesiones en las regiones torácica, lumbar, o sacro de la médula espinal. Desde el 2000, la categoría más frecuente al dar de alta de las personas reportadas al banco de datos es tetraplejía incompleta (34.1 %), seguido por paraplejía completa (23.0 %), tetraplejía completa (18.3 %), y paraplejía incompleta (18.5 %). Menos de 1% de personas experimentaron recuperación neurológica completa al tiempo de salir del hospital. El porcentaje de personas con tetraplejía incompleta ha disminuido mientras paraplejía completa y tetraplejía completa han incrementado [16].

3.2.2. Patofisiología

Hay tres fases en la respuesta de la LME que ocurren después de la lesión: los procesos agudos, secundarios, y crónicos de lesión[17].

La lesión primaria abarca la destrucción focal del tejido fino de los nervios causada por trauma mecánico directo. Este insulto inicial instiga a una onda progresiva de lesión secundaria, que vía la activación de una cascada de mecanismos patofisiológicos nocivos exagera la LME. Pues esto conduce a la destrucción de las zonas axonales cercanas intactas por el trauma inicial esto es un impedimento importante en la recuperación funcional después de LME [18].

3.2.2.1. Lesión primaria

En el impacto o lesión primaria, hay daños mecánicos inmediatos al tejido nervioso y a otros tejidos, incluyendo las células endoteliales de la vasculatura. Así la necrosis, o muerte celular, resultado de insultos mecánicos e isquémicos es instantánea, y en lesión por contusión, parece ser más predominantes en la materia gris de la médula espinal que en la materia blanca, dando por resultado un anillo de materia blanca preservada en el sitio de contusión. Esto debido a la consistencia suave y a la naturaleza altamente vascular de esta región [19].

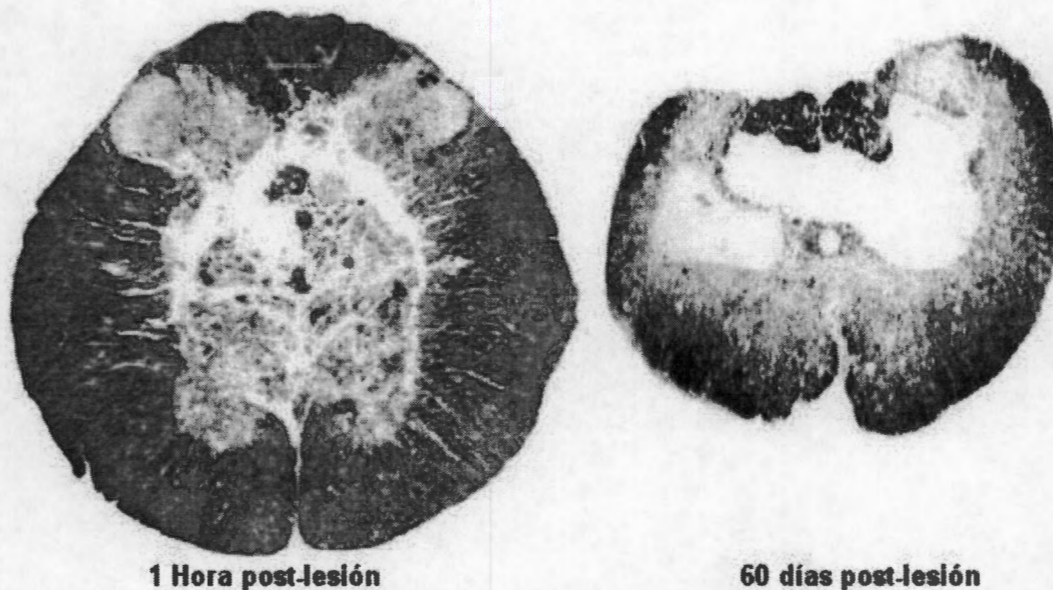


Figura 3.7 Médula espinal 1 hora y 60 días post-LME.

La pérdida de células continua radialmente en todas direcciones, de modo que la lesión se expande con el tiempo. Alrededor de 60 días post-LME, sólo queda un delgado aro de materia blanca (derecha). Es evidente que la muerte celular se produce masiva e inmediatamente después del impacto inicial en el epicentro.

La durabilidad axonal después de la LME también depende de la presencia de mielina. La lesión por contusión puede causar un daño difuso mayor del axon con fibras mielinizadas debido a que son las más vulnerables [20].

Los axones mielinizados son más vulnerables, porque las fuerzas longitudinales que estiran las fibras se concentran en los nodos de Ranvier, esto es apoyado por la observación de que la interrupción del microtubulo axonal después de la LME tiende a ser localizado en las regiones nodales [21]. En una réplica experimental de LME usando un modelo de compresión por clip (15s de compresión), hubo una mayor cantidad de destrucción de mielina por mm^2 comparado con la destrucción de materia gris, con un grado de aumento de lesión (un área más grande de la médula comprimida) [22]. Esto sugiere una vulnerabilidad distinta de la materia blanca al grado de LME por compresión.

Además, con la persistencia de la compresión en la médula espinal, ocurren los acontecimientos moleculares y celulares específicos que se desarrollan en mecanismos secundarios de lesión.

3.2.2.2. Lesión secundaria

Los procesos secundarios y crónicos de lesión, inician dentro de minutos y semanas después de lesión (Figura 3.7).

Aparte de la hemorragia en la materia gris, la lesión primaria no causa un daño total a la médula espinal a pesar de la muerte directa de las células que ocurre en el sitio

de lesión. Sin embargo, con el advenimiento de mecanismos perjudiciales secundarios este cuadro cambia drásticamente. El signo más rápido (2h) es la expansión de la hemorragia en el sitio de lesión y la aparición de numerosas hemorragias locales[18, 19]. Después de eso (6h), una penumbra rodea la lesión primaria y el edema predomina en la materia blanca. Al primer día del trauma (12-24 h), los frentes hemorrágicos continúa expandiéndose y llegan a ser más confluentes. Además, junto a la lesión, la materia gris y blanca pierden su definición, se convierte más suave e inflamada debido al incremento del edema[19]. La hemorragia sigue siendo evidente por 3 días, al octavo día post-lesión se detiene y el sitio es mucho más amplio de la lesión primaria. En 21 días post-lesión, la médula espinal ha desarrollado cavidades claramente visibles, que alrededor de la 14a semana se unen para formar grandes regiones enquistadas. Estas regiones son rodeadas por una cicatriz que se origina principalmente de glía y en un grado inferior del SNP. En etapas más crónicas de LME, la secuela patofisiológica conduce a atrofia de la médula en el sitio de lesión primaria. Sin embargo, debido a la degeneración Walleriana en las zonas ascendentes y descendentes, la atrofia de la médula puede también ser rostral y caudal al sitio del trauma inicial [19].

Una cascada de acontecimientos patofisiológicos que causan necrosis y apoptosis gobierna la biología de la lesión secundaria después de LME (Figura 3.8 y Figura 3.9).

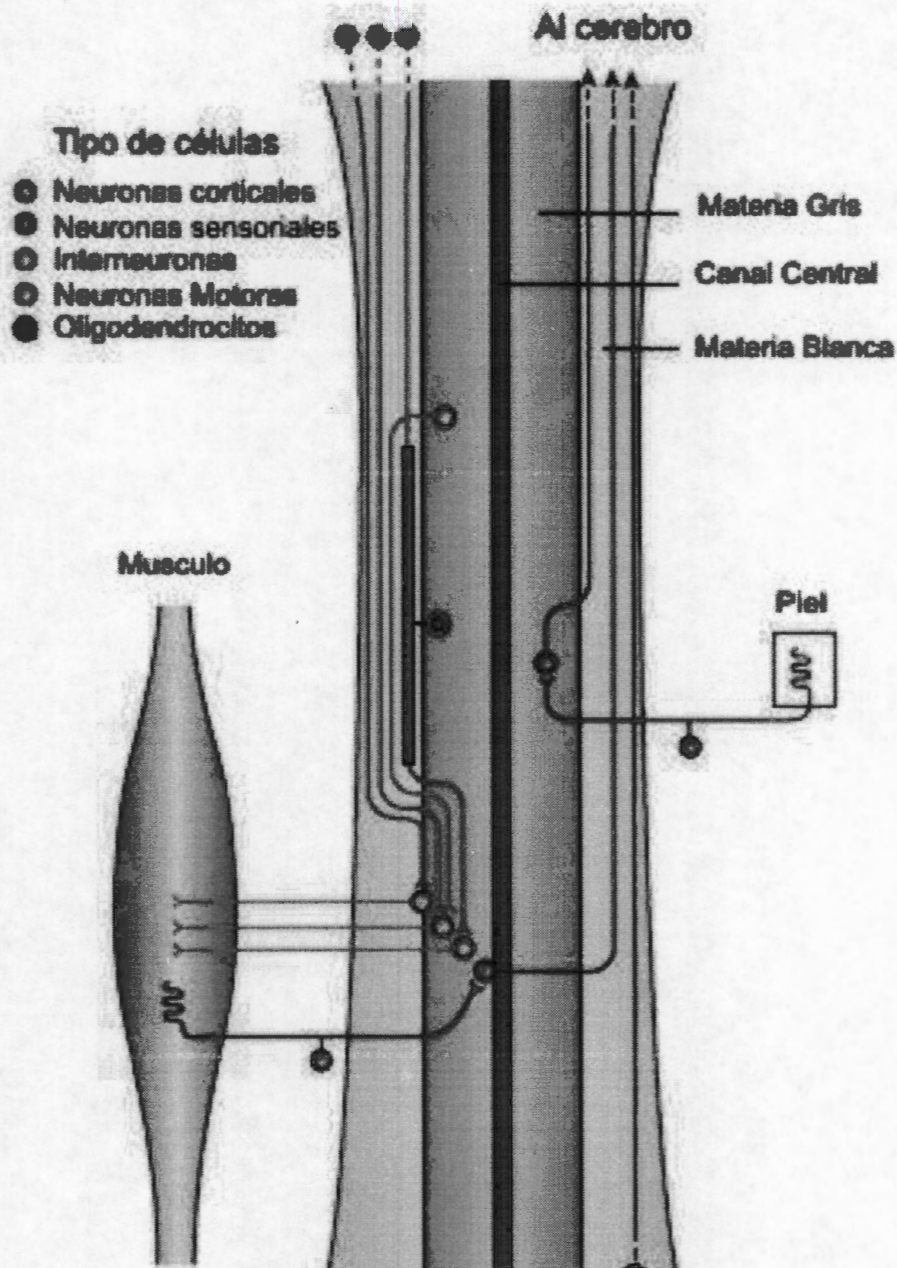


Figura 3.8 Médula espinal intacta.

Los axones espinales, corticales y del tálamo proyectan a las neuronas motoras a través de la materia gris de la médula espinal, que a su vez envían los axones a través del SNP a los órganos, incluyendo músculos. Los axones sensoriales primarios envían axones a través del SNP a las neuronas sensoriales (de segundo orden en la materia gris del SNC), a su vez, envían los axones a través de la materia blanca en las columnas dorsales a las regiones supraespinales (modificado de [14]).

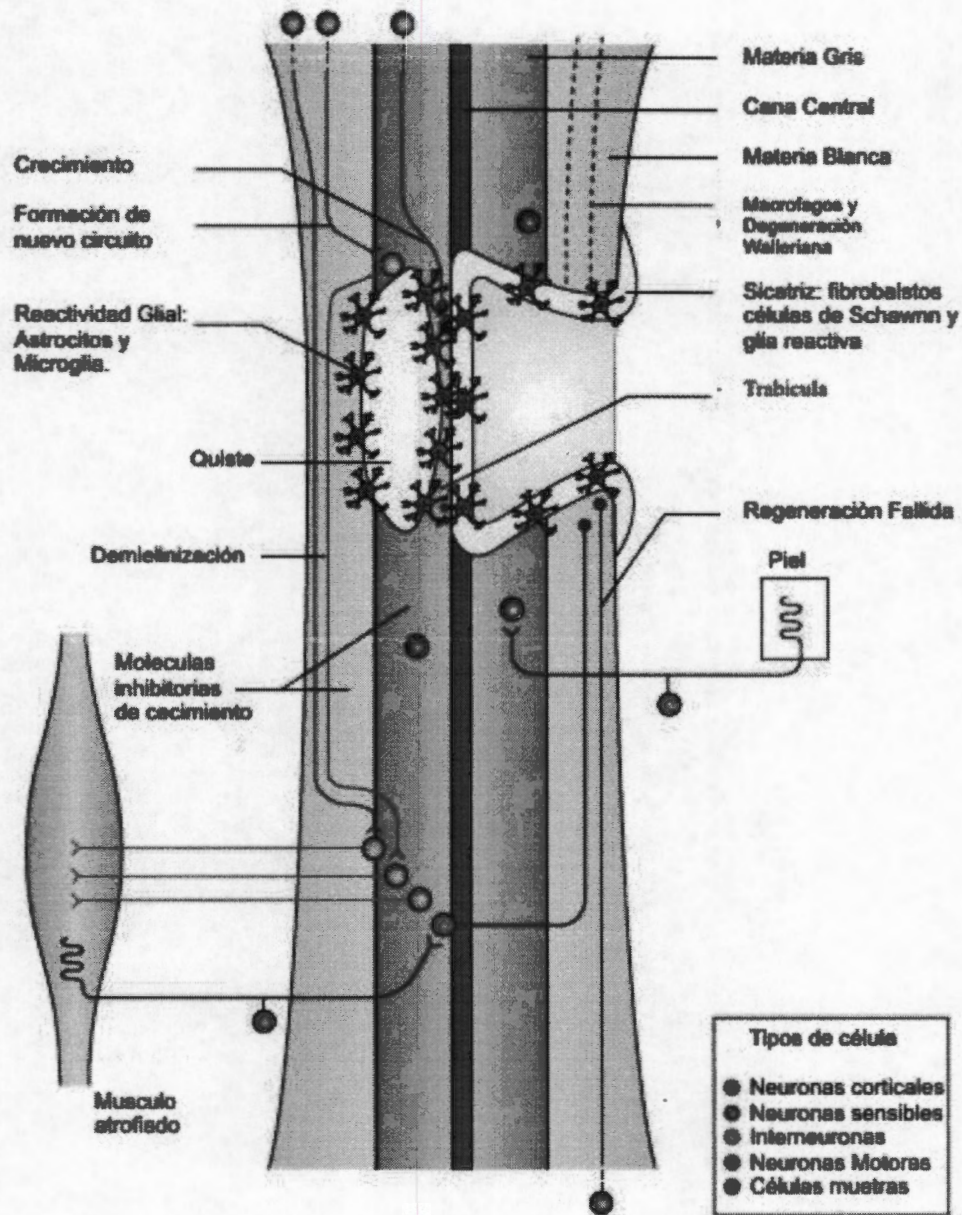


Figura 3.9 Médula espinal después de LME.

Se muestra un corte sagital con una LME región cervical, representando una combinación de características de diversos tipos de lesión. Muchas células mueren inmediatamente, así como progresivamente, después de la LME. Los quistes se forman generalmente después del daño inicial. Después las células del SNP invaden a menudo el sitio de lesión para formar una cicatriz del tejido fino conectivo que incorpora astrocitos y microglia. Muchos axones ascendentes y descendentes se interrumpen y no pueden regenerar largas distancias. Algunos axones forman nuevos circuitos con las neuronas motoras vía interneuronas. En el sitio de la formación del quiste, los axones pueden brotar en los trabéculas que se forman de las células ependimales. Segmentos desconectados demielinizados del axón son fagocitados por los macrófagos. Alguna remielinización espontánea ocurre, en gran parte junto a las células de Schwann del SNP, mientras que los músculos denervados se atrofian [14].

3.2.2.2.1. Interrupción axonal y degeneración Walleriana.

La patología axonal que sigue la LME es profusa. Desde 15 minutos después de lesión existe hinchazón del axon. En este momento, también existe ruptura de mielina, y alrededor de 24h, el contenido axonal se puede observar en el espacio extracelular. Los axoplasmas neuronales experimentan también cambio; exhiben un aspecto granular con desorden en sus neurofilamentos y en muchos axones hay una abundancia inusual de organelos intracelulares. Conforme pasa el tiempo, hay otras características patológicas de axones dañados, tales como la demielinización extensa y conos abortivos de crecimiento que incrementan con éste. De hecho, por 24h, un fenómeno común es el aspecto de los axones gigantes (mayor de 40 μ m), que exhiben una combinación de todas las características patológicas ya mencionadas[23]. Estos cambios del axón son acompañados en última instancia por la degeneración de Walleriana (Figura 3.10), que en roedores dura por varios meses y en los seres humanos por años[24]. La degeneración Walleriana se describe como la fulminación de los segmentos axonales separados de su soma neuronal. El proceso comienza con la degeneración de fibras separadas, que es acompañada por la fragmentación de su mielina asociada. Continúa con la acumulación de los restos y culmina con la fagocitosis de estos por los macrófagos y microglia[25]. Como la lesión primaria separa zonas ascendentes y descendentes axonales, la degeneración Walleriana actúa rostral y caudal a la lesión inicial[26].

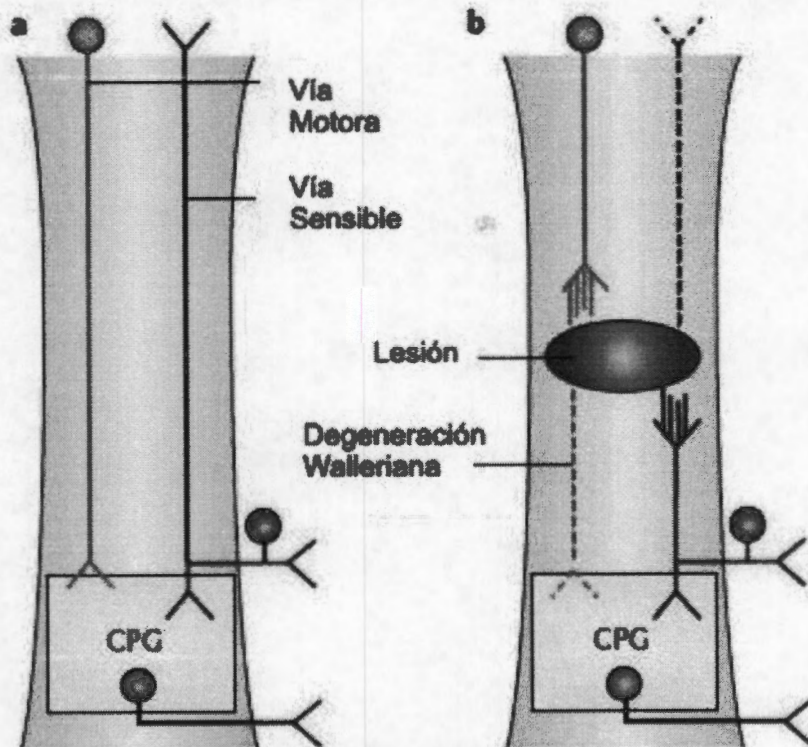


Figura 3.10 Degeneración Walleriana.

El principal déficit funcional se asocia a LME se presenta de la interrupción de zonas espinales ascendentes y descendentes. Cuando los axones de las zonas espinales ascendentes y descendentes(a) son (b) dañados, el segmento distal experimenta la degeneración Walleriana y el segmento próximo no

puede regenerarse con éxito. Por lo tanto, la información (sensorial) ascendente no alcanza el sitio supraspinal y los sistemas descendentes motores y autonómicos se desconectan, incluyendo los generadores centrales de patrones (CPGs), que son responsables de la función locomotora coordinada[7].

3.2.2.2.2. La cicatriz glial.

Como en cualquier otra lesión del SNC, la LME inicia gliosis reactiva. En esta respuesta, las células gliales invaden el sitio de lesión primaria. Despejan los restos y los aíslan para evitar que los mecanismos perjudiciales patofisiológicos secundarios se propaguen. Sin embargo, con la deposición masiva de moléculas se inhibe posible crecimiento axonal[27]. Los primeros componentes que hacen crecer la cicatriz glial son los restos de mielina y de oligodendrocitos, así como los oligodendrocitos que sobreviven la lesión primaria. Este componente inicial es seguido por la activación y la migración de microglia (48h), que también es acompañada por la invasión de macrófagos. Hasta este punto, los componentes celulares de la cicatriz glial a excepción de los restos de mielina son permisivos al crecimiento axonal[27]. De hecho, la fagocitosis por la microglia de los restos de mielina, que es altamente inhibitoria al crecimiento axonal, se postula que promueve el brote axonal[24]. Después de estos acontecimientos iniciales, la cicatriz glial comienza a ser dominada por los componentes que bloquean el crecimiento axonal[27]. Después de la intrusión de fagocitos, precursores de oligodendrocitos (35 días post-LME) con un marcador superficial NG2 (un inhibidor protooncológico de sulfato de Condrotina) y un derivado de plaqueta receptor del factor de crecimiento α (PDGFR α) se introducen en la cicatriz glial[27]. Como la diferenciación de estas células es inhibida por la mielina del SNC, pueden potencialmente distinguir oligodendrocitos maduros a 2 semanas de la lesión, en áreas donde los axones no tienen mielina[28, 29]. Al mismo tiempo, las meninges de la superficie del SNC también emigran en la cicatriz glial[27]. Después de eso, las células madre del canal central espinal también invaden el sitio de lesión primaria [30]. El punto final en la evolución de la cicatriz glial es la migración y proliferación de astrocitos. Estas células regulan la producción de la proteína ácida fibrilosa glial (GFAP), se convierten en hipertróficas. Los astrocitos aíslan el sitio de lesión primaria delineando el área necrótica y envolviéndola con un recubrimiento glial denso [31]. Mientras que los astrocitos también llenan el espacio vacío producido por la lesión primaria formando un bulto de la cicatriz glial[27]. Más importantemente, los astrocitos procuran restablecer la integridad del microambiente lesionado para conservar la función los circuitos no dañados.

Facilitan esto regulando la barrera sangre médula espinal(BSCB), concentraciones de los aminoácidos excitatorios (EAA), concentraciones iónicas y la secreción de factores tróficos y citosinas[32]. Estas células son también productoras de la mayoría de moléculas inhibitorias extracelulares de crecimiento axonal[27]. Como resultado de la interrupción de BSCB, los fibroblastos pueden también emigrar a la cicatriz glial[33]. En etapas más crónicas (cerca de 3 semanas), otra célula que no es del SNC, la célula de Schwann, puede emigrar a la lesión, las células de Schwann tienen la capacidad de remielinizar los axones desnudos[34].

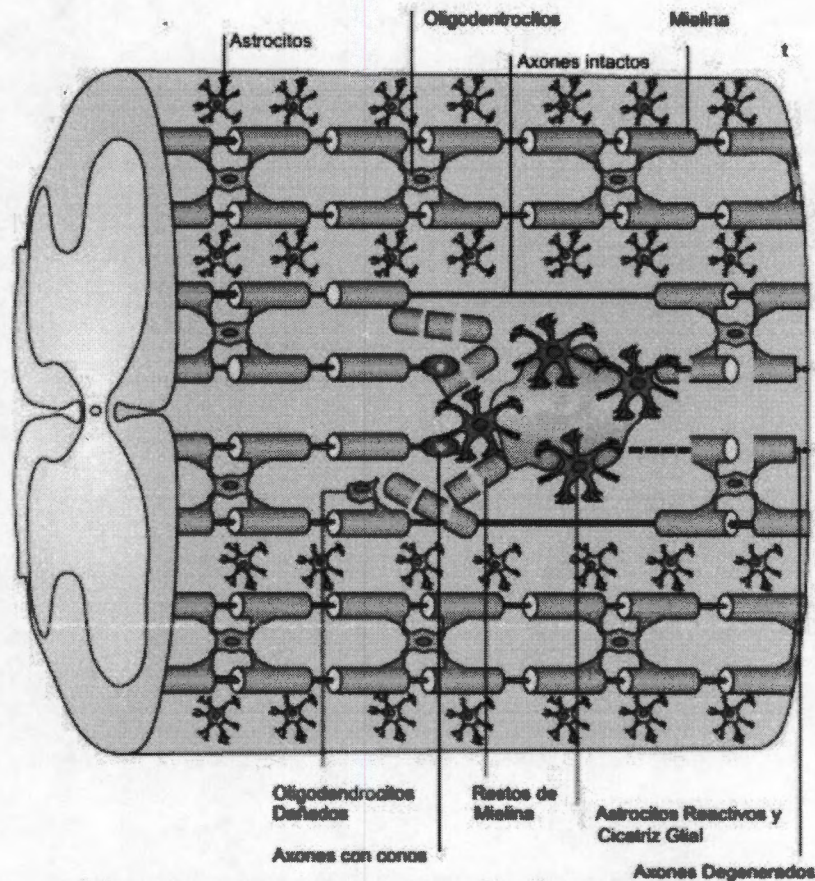


Figura 3.11 Representación esquemática del sitio de LME.

La LME en adulto da lugar a menudo a la transección de fibras nerviosas y al daño de tejidos finos circundantes. Los extremos distales de los axones separados forman los conos distróficos característicos que crecen en el ambiente glial dañado. Durante la fase temprana de lesión, oligodendrocitos intactos y restos de mielina pueden restringir el crecimiento del axón. El reclutamiento de células inflamatorias y en un cierto plazo los astrocitos reactivos conducen a la formación de una cicatriz glial, acompañada a menudo por un quiste lleno de fluido. Este proceso que marca con una cicatriz se asocia al lanzamiento creciente de los proteoglicanos de sulfato de chondroitin, que pueden limitar la regeneración. Estos inhibidores moleculares del ambiente glial del SNC presentan un ambiente hostil para la reparación del axón (Modificada de [35]).

3.2.3. Estrategias terapéuticas

Aunque no hay tratamientos restaurativos para LME, existen numerosos informes preclínicos (terapias rehabilitativas, celulares y moleculares) que se han probado en modelos animales. Muchos de éstos han alcanzado, o se están acercando a ensayos clínicos. Los mecanismos que son la base de la recuperación no se han establecido o han sido raramente establecidos[7, 14].

En contraste con los acontecimientos destructivos, las características patológicas comúnmente observadas indican una cierta reparación espontánea después de LME[36]. Mientras que hay poco o nada de neurogénesis en la médula espinal dañada, la proliferación en el canal ependimal y del peri-ependimal genera nuevas

células precursoras que exclusivamente se diferencian en células gliales[37]. Ocorre una regeneración limitada del axón[83, 87]. El crecimiento es impedido en gran parte por factores geométricos y moleculares y pocos axones regeneran largas distancias hacia sus destinos originales. Sin embargo, las varias formas de plasticidad espinal podrían contribuir limitadamente a la recuperación. Después de LME, los nuevos circuitos espinales pueden puentear la lesión, incluyendo el brote en axones dañados[38].

Por lo tanto, aunque hay una cierta reparación espontánea después de lesión del SNC, es incompleta. La recuperación adicional de la función requerirá una combinación de estrategias terapéuticas eficaces y seguras[14].

Dentro de estas estrategias terapéuticas se encuentran:

- Trasplante de nervio periférico. [38, 39, 40, 41, 42]
- Trasplante de las células de Schwann. [43, 44, 45]
- Trasplante de células del sistema nerviosas olfatorio. [46, 47, 48, 49]
- Trasplante de tejido de SNC embrionario. [50, 51, 52, 53]
- Transplante de células madre embrionarias. [54, 55, 56, 57]
- Trasplante de células madre de adulto. [58, 59, 60, 61]

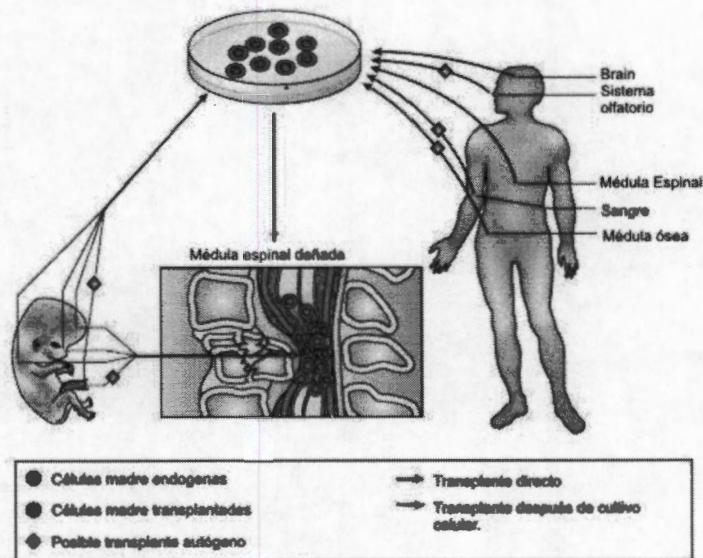


Figura 3.12 Fuentes potenciales de células madre / progenitoras para trasplantar dentro de LME. (Modificado[14]).

- Trasplante de macrófagos activados. [62, 63]
- Terapias neuroprotectoras. [64, 65, 66, 67]
- Administración de factores de crecimiento. [68, 69, 70, 71, 72, 73]

- Rehabilitación [74, 75, 76, 77]

3.3. Polímeros

Diferentes materiales han sido investigados como guías potenciales de canales de nervios (NGCs). Puesto que las cargas eléctricas parecen jugar un rol importante en la estimulación de la regeneración axonal[78], el uso de materiales electroactivos como NGCs esta bajo una activa investigación. Aunque los mecanismos exactos por los cuales la estimulación eléctrica incrementa la regeneración nerviosa, no esta bien entendida, esta bien documentado que la estimulación eléctrica incrementa el crecimiento de neurito *in vitro*[79, 80, 81] y regeneración de nervio *in vivo*[82, 83]. Incremento del crecimiento de células nerviosas axonales *in vitro* fue reportado usando polipirrol con aplicación de corriente constante y voltaje constante[84]. El polipirrol ha sido usado como sustrato para incrementar la interfase electrónica entre neuronas y micro maquinas con micro electrodos[85].

3.3.1. Polímeros semiconductores

En términos estrictos un polímero es una sustancia compuesta de moléculas que tienen una larga secuencia de una o más especies de átomos o grupos de átomos ligados a otros, principalmente, a través de enlaces covalentes. Los polímeros en general presentan algunas semejanzas estructurales mientras que sus propiedades pueden ser muy diferentes, estas varían por el tipo de monómero y el método de síntesis[86, 87].

La conducción de la electricidad se debe al movimiento de electrones (e-), es necesario que los e- se muevan libremente por el material. En los sólidos conductores los e- se mueven por estados discretos de energía denominados bandas. Sólo son capaces de conducir la electricidad aquellos sólidos cuya última banda esté semillena (buen conductor o conductor metálico) o estando vacía se encuentre energéticamente cerca de la última banda llena (semiconductor). Si el salto banda-llena=) banda-vacía es energéticamente grande es un aislante.

El campo de polímeros conductores ha llamado la atención debido a sus interesantes propiedades eléctricas y ópticas. Desde su descubrimiento, han sido investigados para muchas aplicaciones tecnológicas como baterías orgánicas, microelectrónica, recubrimientos antiestáticos, etc.[88]

3.3.1.1. Definición

El primer polímero conductor se sintetizó a principios de la década de los 70's, por Hideki Shirikawa, del Instituto de Tecnología de Tokio, confundió las cantidades requeridas en la formula para obtener poliacetileno y añadió mil veces más catalizador del que correspondía. El producto que obtuvo fue una película lustrosa de color plateado similar al papel de aluminio, pero que se estiraba como la película que sirve para proteger los alimentos [86].

Los polímeros conductores son aquellos materiales formados por largas cadenas de hidrocarburos con dobles enlaces alternos o conjugados; los cuales reúnen las propiedades eléctricas de los metales y mecánicas de los plásticos. Su conductividad se debe principalmente a la adición de ciertas cantidades de otros productos químicos (dopado), pero también a la presencia de dobles enlaces conjugados que permiten el paso de un flujo de electrones (e-).

Aunque no se conozcan aún con precisión los mecanismos físicos que convierten los polímeros en semiconductores, la pureza y la organización de las cadenas poliméricas parecen tener mucha importancia. Así, cuando se modifica la organización estructural del polímero, se puede mejorar la conductividad [86].

Los polímeros utilizados como semiconductores están constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, dispuestos en unidades monoméricas repetidas, como cualquier otro polímero. Además en general estas unidades suelen llevar algún heteroátomo como nitrógeno o azufre.

Los átomos de carbono están unidos entre sí por una serie alternada de enlaces dobles y simples (...=C-C=CC=C-...), es decir, presentan hiperconjugación de enlaces, esta es una característica general de todos los polímeros semiconductores.

La técnica de dopado consiste en el agregado de átomos que ayudan a aumentar las propiedades eléctricas.

Estos átomos pueden actuar cediendo e- libres a los enlaces poliméricos o sustrayendo e-, lo que equivale a generar cargas positivas o huecos. En ambos casos la cadena del polímero se torna eléctricamente inestable y al aplicar una diferencia de potencial, los e- se desplazan por el polímero [86].

Las bandas de energía singulares que existen en los polímeros conductores no existen en los semiconductores clásicos. Estas bandas desempeñan cierto papel en el mecanismo de conducción de los modernos semiconductores a altas temperaturas.

El dopado consiste en la contaminación atómica con átomos diferentes de los de la estructura original alterando así el perfil energético de las bandas captando e- (conductividad tipo p) o cediendo e- (conductividad tipo n). Una vez dopado el polímero y convertido en polímero semiconductor se produce un cambio en la posición de los átomos debido a la introducción de carga. Este cambio favorece la formación de islas de carga (tanto positiva como negativa) llamadas solitones, polarones y bipolarones. Estas islas crean nuevas bandas de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia, que son en último término los responsables de la conducción en los polímeros. Las moléculas contaminantes no reemplazan átomos del polímero, sino que actúan como meros donadores/aceptores de carga, esta carga se reparte por el resto de la cadena carbonada.

En realidad este tipo de polímeros no necesita agentes dopantes, ya que son capaces de transmitir la carga por sí solos de un extremo a otro de la cadena

carbonada. Pero esta cadena no es infinita, un polímero no tiene la estructura tan ordenada como un cristal, con lo que necesita de estos agentes para poder transmitir los e- de cadena en cadena. Esto es, la carga se transmite a lo largo de la cadena carbonada hasta que se encuentra con el final de esta, es entonces cuando actúan los solitones, que se encargan de "unir" los extremos de las cadenas de polímeros.

Los polímeros conductores poseen una amplia gama de conductividades cuya razón no se ha podido demostrar, pero si se conocen factores que afectan la conductividad: porcentaje de dopado, concentración de las cadenas de material, asimetría del polímero, etc.

La pureza también es otro factor determinante en cuanto a conductividad se refiere, ya que las impurezas (que no son dopantes) pueden entorpecer el movimiento de los e- llegando incluso a cortar el paso a través de las cadenas.

3.3.1.2. Espectroscopía infrarroja

Las energías de vibraciones de átomos en una molécula con respecto a otra son cuantificables, la absorción de radiación electromagnética en la región infrarroja lleva a transiciones entre diferentes estados de vibración. La absorción resulta de un acoplamiento de una vibración con la oscilación del campo eléctrico de la radiación infrarroja y esta interacción puede ocurrir sólo cuando la vibración produce un momento oscilante dipolar [87]. Las vibraciones atómicas están ligadas a enlaces químicos y usualmente se refiere a las vibraciones como "deformación estructural", que son alargamientos o acortamientos de estos. Para una particular deformación estructural, la absorción se dará cuando la frecuencia de la radiación sea, n , definida por la ecuación de Planck.

$$\nu = \Delta E/h$$

donde:

ΔE = diferencia entre los niveles de energía vibracional alto y bajo para una particular deformación estructural.

h = Constante de Plack.

La base de la espectroscopia infrarroja (IR) es que para un particular tipo de deformación estructural DE, dependen los átomos involucrados (ΔE y ν para N-H son más altos que para C-H). Al medir la absorción de radiación infrarroja sobre un rango de ν , un espectro es obtenido conteniendo una serie de absorciones en diferente ν .

Cada absorción corresponde a un tipo específico de deformación de un particular enlace o enlaces (Figura 3.13). La absorción para un particular deformación estructural ocurre aproximadamente a la misma n para todas las moléculas (incluyendo polímeros) que contienen ese enlace [87].

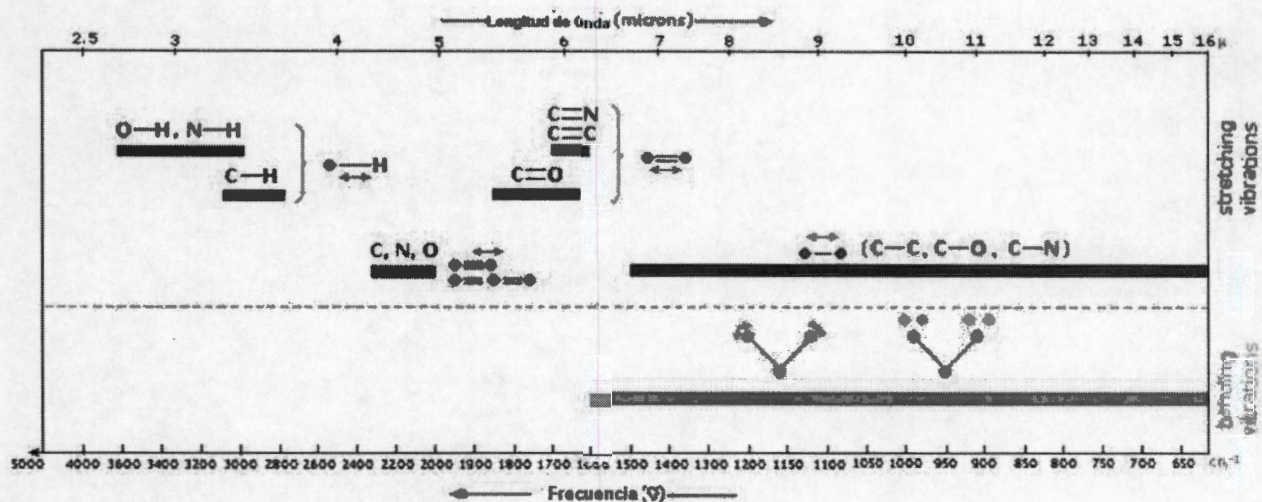


Figura 3.13 Regiones de absorción características para deformaciones de enlaces comúnmente observados.

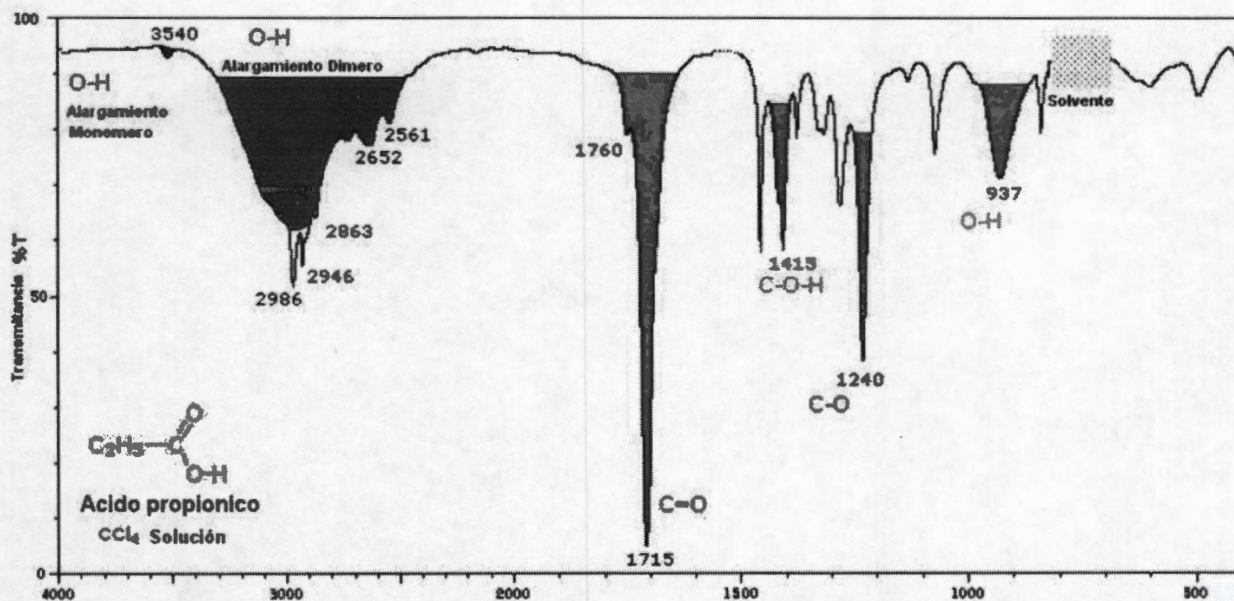


Figura 3.14 Espectro de Infrarrojo para ácido propiónico.

La comparación de las posición de absorción en el espectro IR de una muestra de polímero con las regiones características de absorción, nos permite identificar los enlaces y grupos funcionales presentes en el polímero (Figura 3.13 y Figura 3.14). El espectro IR puede proveer información de la microestructura molecular [87].

3.3.1.3. Polímeros conductores en aplicaciones biomédicas.

La siguiente generación de biomateriales implantados va a ser interactiva y programable, y serán capaces de comunicarse con tejidos al rededor. Especialmente los que incorporan señales estimulantes, como señales eléctricas,

pueden ser usadas para regular unión, proliferación y diferenciación de células[89]. Por ejemplo, campos eléctricos han demostrado que estimulan la cura de huesos[89], cartilago[90], piel y tejido conectivo[91], nervios craneales y espinales[92] y nervios periféricos[93]. Para tomar ventajas de estos efectos, los investigadores han intentado incorporar señales eléctricas directamente dentro de los biomateriales. El uso de materiales electroactivos podría permitir liberar localmente estímulos eléctricos en el sitio de daño. Con este fin, los polímeros están siendo procesados para desplegar cargas permanentes o para generar cargas superficiales transitorias. Estudios empleando estos materiales han demostrado incremento en el crecimiento de células de huesos y nervios *in vitro* e *in vivo*[94]. Incremento del crecimiento de células nerviosas axonales *in vitro* fue reportado usando polipirrol con aplicación de corriente y voltaje constantes[84]. El polipirrol ha sido usado como sustrato para incrementar la interfase electrónica entre neuronas y micro maquinas con micro electrodos[85].

3.3.2. Métodos de polimerización

El requerimiento básico para la polimerización es que cada molécula debe ser capaz de unirse a dos (o más) moléculas de monómero. Teniendo este requerimiento, hay una gran cantidad de reacciones químicas y tipos de asociaciones monoméricas que se pueden emplear para el efecto de polimerización. Los polímeros conductores pueden ser sintetizados y dopados por métodos químicos, electroquímicos, enzimáticos o por plasma de radiofrecuencia (polimerización por plasma).

3.3.2.1. Químico

El método químico para la síntesis y dopado de polímeros conductores, consiste en la oxidación de monómeros, los cuales producen una alta actividad en sus cationes iniciándose así el proceso de polimerización; en el cual al reaccionar las moléculas de la solución monomérica se forman dímeros, oligómeros y polímeros productos de polimerización por oxidación.

Empleando técnicas electroquímicas la síntesis y el dopado se producen simultáneamente. Se introducen dos electrodos metálicos en una disolución que contenga el dopante y el monómero que más tarde constituirá el polímero. Para el dopado tipo "p" se extraen e- de los monómeros adyacentes al electrodo positivo, así la polimerización se produce sobre el electrodo. Al ser deficiente de e- el polímero atraerá hacia sí los iones negativos. En el caso de la conductividad tipo "n" el proceso es contrario, es decir, se extrae un e- de uno de estos dobles enlaces generando un radical catión, el cual no es estable, pero arrancando un segundo e- se forma un di-catión. Este catión puede desplazarse por la cadena pasando de un doble enlace a otro conduciendo de este modo la electricidad.

La extracción de e-, u oxidación, puede continuar formando más de un catión por cadena (hasta uno cada 4 unidades monoméricas). Sin embargo los materiales

tienden a ser neutros, tal y como nos indica el principio de electro-neutralidad, y un material lleno de cargas positivas necesita ser compensado por algo. Dado que la oxidación del material se lleva a cabo en una celda electroquímica alguno de los componentes de dicho sistema tendrá esa responsabilidad. Los electrodos están fijos y el disolvente es habitualmente neutro, pero debido a este último hecho se añade un electrólito que permite la conducción iónica a través del disolvente. Este electrólito (una sal o a veces un ácido) está formado por especies positivas (cationes) y negativas (aniones), siendo estas últimas las que compensarán las cargas positivas generadas en nuestro polímero (los cationes se desplazarán al electrodo contrario para compensar las cargas negativas ahí generadas manteniéndose nuevamente el principio de electro-neutralidad).

3.3.2.2. Electroquímico

La oxidación electroquímica de un polímero tiene lugar a través de la generación de cargas positivas a lo largo de las fibras poliméricas en la interfaz polímero/electrólito. La presencia de cargas positivas favorece los procesos de repulsión entre fibras y la apertura de canales con la consiguiente penetración de contraiones en el interior de la película. El proceso de oxidación progresa simultáneamente.

Los procesos inversos de expulsión de contraiones, consisten en la eliminación de las cargas positivas a lo largo de las fibras. Los enlaces de Van der Waals y el cierre de la estructura polimérica ocurren durante la reducción. La apertura y cierre de canales a lo ancho de una película polimérica, relacionados con un potencial eléctrico, imita procesos similares a través de membranas biológicas.

3.3.2.3. Enzimático

En las últimas dos décadas se ha desarrollado el uso de enzimas como catalizadores para la síntesis de polímeros. Nuevos polímeros se han desarrollado y "antiguos" polímeros se han obtenido con esta técnica.

La mayoría de las enzimas operan en un rango de temperatura, bajo condiciones acuosas neutras y en la ausencia de un sustrato. En síntesis orgánica esa biocatalisis puede ser usada como el único catalizador en la reacción, en combinación con otras enzimas o reactivos no biológicos. Muchas enzimas aceptan sustratos no naturales que pueden alterar su estabilidad, incrementar su especificidad del sustrato y su actividad específica. Moléculas con varios grupos funcionales poseen rechazo particular a métodos de síntesis no biológicos, pero son objetivos naturales de técnicas biológicas. Por ejemplo, moléculas de ADN y ARN pueden ser sintetizadas y manipuladas por procesos enzimáticos, mientras que alternativas equivalentes químicas con este fin no existen. La aplicación de enzimas en la síntesis representa una considerable oportunidad para el crecimiento de procesos químicos y farmacéuticos[95].

3.3.2.4. Plasma de radiofrecuencia

Es una técnica que ha sido explorada para producir películas de polímero que no es sencillo obtener con otras técnicas, la ventaja de esta técnica es que la película comienza su reacción en la fase gaseosa, entonces se propaga y se completa en una superficie. De esta manera, el monómero reacciona para producir el polímero sin la introducción de cualquier oxidante químico. La oxidación es promovida por el impacto de los e- libres que se encuentran a lo largo del campo eléctrico que colisionan con las moléculas del monómero. En estas condiciones, el polímero sintetizado por plasma es diferente debido a que puede ser formado sin un intermediario químico en la reacción.

Otra diferencia es que cuando se esta generando el polímero puede ocurrir un rompimiento y entrecruzado en las cadenas. Sin embargo, el entrelazado puede incrementar algunas propiedades mecánicas en los polímeros, pero, puede reducir la habilidad del material en otros aspectos[96]. Las películas depositadas por plasma y los materiales tratados por plasma ofrecen atractivas posibilidades en el desarrollo de nuevos biomateriales y para incrementar el funcionamiento de materiales y dispositivos existentes.

3.3.3. Polimerización por plasma.

El plasma es el resultado de ionizar parcialmente un gas. Se compone de toda una serie de partículas ionizadas; altamente reactivas; iones, e-, fotones, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras [97].

Para ser capaz de ionizar el gas de forma cuantitativa y controlada, en el caso del plasma a baja presión, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones de vacío (10^{-2} a 10^{-3} mbar). Una vez obtenido el vacío, se introduce el gas en la cámara de reacción y se ioniza con la ayuda de un generador de radio frecuencia (RF) que utiliza la energía de un campo eléctrico para disociarlo, obteniéndose de esta forma "el plasma", luz brillante de color fluorescente, azul, rosa, violeta dependiendo del gas ionizado. Las partículas ionizadas, interaccionan con la superficie del substrato sin dañarlo ya que la modificación superficial tan sólo afecta a una capa que oscila entre los 10-1000Å, pudiendo obtenerse las más diversas aplicaciones (activación, limpieza, polimerización).

La activación consiste en reemplazar a escala superficial enlaces débiles por grupos carbonil, carboxil, hidroxil, amino u otros, altamente reactivos. De esta forma la superficie queda activada después del tratamiento, fenómeno difícilmente aplicable sobre ciertas superficies de diferentes polímeros por métodos convencionales. La limpieza por su parte consiste en la eliminación de contaminantes orgánicos de la superficie del substrato y en la ruptura de enlaces covalentes débiles presentes en la superficie. La polimerización por plasma, es otro procedimiento mediante el cual

se deposita una fina capa de polímero (etileno, etano, acetileno, compuestos fluorcarbonados, compuestos de silicio, etc.), sobre la superficie del sustrato. Mediante la elección del gas y los parámetros de proceso adecuados (presión de trabajo, temperatura, flujo de gas, tiempo de proceso), estas capas pueden actuar confiriendo diferentes propiedades, relacionadas con la resistencia química, actuando como barrera. El polímero se formará a partir de las partículas reactivas resultantes de la fragmentación del monómero bajo la influencia del plasma. La mezcla de diferentes gases en el proceso de polimerización por plasma conducen a procesos en los que se combinan las principales ventajas del polímero con la funcionalidad de la superficie modificada por el plasma. La teoría de la polimerización atómica se basa en que la estructura del gas de monómero utilizado generalmente no es importante para crear una superficie con propiedades especiales, lo que importa principalmente es la composición elemental de la mezcla del gas con el que se alimenta la reacción, debido a sus propiedades químicas y a su concentración en el plasma, los fragmentos serán ensamblados en la superficie del sustrato.

El tipo de grupos funcionales introducidos depende del gas utilizado. Estos grupos se utilizan para aumentar la adhesión, la biocompatibilidad o las propiedades inherentes a la superficie.

El concepto de polimerización por plasma se basa en los procesos moleculares por lo cual el tamaño de las moléculas es importante, el acomodo de los átomos que constituyen las moléculas de un monómero es realizado durante la síntesis del monómero orgánico. En contraste al proceso molecular, la formación de polímeros en plasma se ha reconocido como un proceso atómico, en el cual aparecen nuevos enlaces entre los átomos, los cuales juegan un papel predominante, entonces se pueden encontrar nuevos procesos y materiales resultantes con características diferentes a las de los polímeros convencionales ya que la formación del polímero se ve afectada desde el nivel atómico[98].

La polimerización por plasma, a partir de un compuesto orgánico es un método efectivo para la preparación de películas delgadas con estructuras densas y entrecruzada que se puede usar como capa aislante, como recubrimiento protector, como membrana permeable, etc.[98]

La función del plasma es proveer moléculas reactivas que interactúen entre ellas, formando delgadas películas sobre la superficie expuesta al gas. Este tipo de comportamiento, permite controlar el espesor del polímero con un simple control en el tiempo de reacción. Esta técnica crea la posibilidad de construir capas delgadas (micrométricas y nanométricas) de diferentes monómeros. La formación de especies intermedias como los cationes son evidencia del comportamiento de la polimerización de los monómeros.

Muchos polímeros conductores electroactivos (CEP) pueden existir en diferentes formas de sus redox, sin embargo, la conductividad eléctrica es asignada

usualmente a sólo una de ellas, es decir, la media oxidación de un polímero muestra alta conductividad eléctrica mientras que otras formas de redox tienen una baja o nula conductividad.

En una escala de potencial electroquímico las regiones de existencia de diferentes formas de redox dependen generalmente de la naturaleza del CEP por ejemplo la acidez de la solución y otras variables.

3.3.4. Ventajas de la polimerización por plasma

El método de síntesis de polimerización por plasma ofrece diversas ventajas:

- **Recubrimiento de superficies:** el polímero se deposita sobre cualquier área expuesta al plasma.
- **Proceso atómico:** el plasma influye sobre la microestructura y propiedades de la película depositada, encontrando nuevos materiales con características diferentes a la de los polímeros convencionales, ya que la formación del polímero se ve afectada desde el nivel atómico.
- **Buena adhesión al sustrato:** la energía del gas parcialmente ionizado, puede inducir la mezcla e inserción entre la capa superior del sustrato y la película de polímero.
- **Preparación de películas delgadas:** es posible obtener polímeros con estructura densa y entrecruzada que se pueden usar como capa aislante, recubrimiento protectorio, membrana permeable, etc.
- **Esterilización:** los microorganismos que puedan estar presentes dentro de la cámara de reacción son destruidos al exponerse al plasma, quedando el material en condiciones estériles.

3.4. Tomografía Axial Computarizada

La obtención de imágenes mediante una tomografía axial computarizada (TAC) se realiza a través de un tubo de Rayos X (RX). Un haz de Rayos X colimado atraviesa al paciente mientras todo el sistema realiza un movimiento circular, mientras que un sistema detector mide la cantidad de radiación que ha logrado atravesar el tejido, ya que existe una relación directa y cuantificable entre la relación de la absorción de radiación X y la densidad del tejido; de esta forma los tejidos pueden ser representados por su diferente densidad de acuerdo con su índice de absorción de radiación. En el proceso de obtención de una imagen con valor diagnóstico se toman en cuenta un conjunto de factores diversos y estrechamente relacionados con la tecnología de los dispositivos.

La obtención de imágenes implica: adquirir los datos por medio de irradiación en torno al objeto; la creación de perfiles de atenuación; el cálculo de coeficientes; la

asignación de valores en una escala de gris y la formación de una imagen sobre la pantalla de dichos valores.

3.4.1. Historia

En 1917. J. Radon, un matemático austriaco, quien trabajaba con la teoría de la gravitación, demostró que objetos bidimensionales y tridimensionales pueden ser reproducidos conociendo un conjunto infinito de sus proyecciones (vistas). No hay duda de que su trabajo científico fundamentó la existencia del primer tomógrafo 55 años después. En 1956 R. Bracewell, un radioastrónomo, reconstruyó el mapa solar de emisión de microondas, midiendo la radiación en un patrón en forma de listón alrededor del sol en diferentes direcciones en distintas épocas del año.

Llegó a resultados similares a los de Radon por caminos diferentes; 1961 W. Oldendorf, científico que por primera vez utilizó una fuente de radiación a partir de un radioisótopo (yodo) y un cristal de centelleo (de sodio) acoplado a un fotomultiplicador para explorar (en forma de rastreador) estructuras biológicas y obtener sus proyecciones. Le tomaba una hora un rastreo; 1963, A. Cormack, físico en la Universidad de Tufts donde logró desarrollar un sistema de rastreo lineal, del tipo tubo de rayos X -cristal de centelleo. Por falta de financiamiento no pudo perfeccionarlo para aplicarlo clínicamente; 1967, G. Hounsfield, ingeniero de sonido en EMI LTD (Inglaterra) desarrolló el primer sistema de rastreo de segunda generación junto con un primer algoritmo computacional para la reconstrucción de imagen, clínicamente aplicable a rastreos del cerebro. Por su invento, en 1968 le confirieron el Premio Nóbel en Medicina. A Godfred Hunsfield se le considera el autor principal de la TAC; 1968 D. Kuhl, en la Universidad de Pensilvania construye el primer sistema de rastreo para imágenes de radionúclidos. Probablemente a Kuhl se le considere como el autor principal en la técnica de tomografía de emisión de positrones (Positron Emission Tomography, PET); 1973, G. Hounsfield, instala por parte de EMI LTD-división médica, el primer sistema TAC para cerebro en la Clínica Mayo (Massachusetts General Hospital) en Estados Unidos.

3.4.2. Rayos X

Los Rayos X descubiertos por W. K. Roentgen en 1895, son un tipo de radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra entre $1.5 \times 10^{-10}m$ y $120 \times 10^{-10}m$ por estas características son capaces de atravesar la materia, perdiendo parte de su energía o bien siendo desviados transmitiendo parte de su energía e ionizando a los átomos con quienes interacciona.

Esta radiación es generada en dos formas (Figura 3.15):

- Rayos X de frenado (bremsstrahlung). Se generan cuando un electrón acelerado choca con un blanco, generándose una pérdida de velocidad (frenado) liberándose energía en forma de fotones de una determinada longitud de onda (conversión de energía cinética en energía cuántica, según

la teoría electromagnética). El espectro de los rayos X, generado de esta manera es un espectro continuo.

- **Rayos X característicos.** Se generan cuando "n" átomo es excitado por un fotón (absorbe energía) y expulsa un fotoelectrón cercano al núcleo (nivel bajo de energía); en estas circunstancias se ha generado un hueco en este nivel que debe ser cubierto por un electrón de un nivel más alto, al efectuarse esta transición se libera la diferencia energética en forma de un fotón de rayos X. El espectro en este caso es discontinuo.

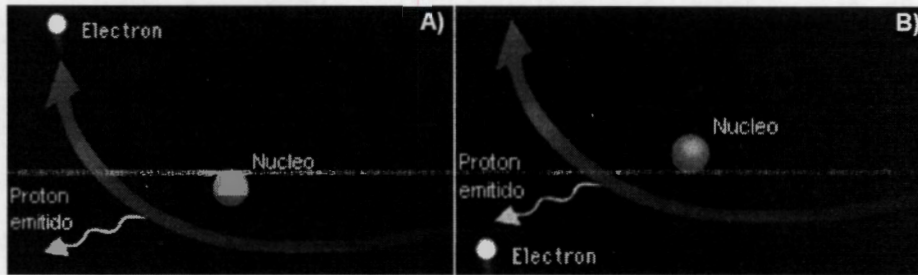


Figura 3.15 Formas de radiación.

Para el diagnóstico médico, normalmente se usan rayos X compuestos por un 70% de bremsstrahlung y un 30% de radiación característica.

Las dos características de este tipo de radiación que determinan su gran utilidad en aplicaciones biomédicas, son su gran capacidad de penetración en la materia, así como su capacidad de interacción con material biológico (capacidad de ionización). Las imágenes radiológicas se forman como resultado de la interacción entre la fuente de radiación y un sistema detector de fotones. La interacción de los fotones con el paciente, ya sea por la absorción de éstos o por su dispersión, produce un patrón de distribución de los fotones emitidos sobre el material de detección.

Los fotones emitidos por el tubo de rayos X entran dentro del paciente. Estos fotones pueden pasar sin interactuar con los tejidos, pueden absorberse o pueden ser dispersos por el cuerpo del paciente. Los fotones dispersos pueden eliminarse por medio de dispositivos, tales como rejillas o espacios de aire que absorben la radiación dispersa. Los fotones registrados pueden ser tanto fotones primarios, que pasaron a través del paciente sin interactuar, como fotones secundarios, que resultan de la interacción del paciente con la radiación. Estos últimos producen información útil pero interfieren con el proceso de formación de la imagen. Los fotones primarios proporcionan una medida de probabilidad de que un fotón pase a través de un paciente sin interactuar, y esta información es un reflejo de las características de los tejidos atravesados por la radiación. La imagen es una proyección de las propiedades de atenuación de los tejidos

3.4.2.1. Características y propiedades.

Los rayos X son eléctricamente neutros, es decir, no sufren desviación o deflexión cuando se encuentran en el interior de un campo eléctrico, magnético o electromagnético.

Los rayos X viajan en línea recta a la velocidad de la luz, lo cual se utiliza para dirigirlos y enfocarlos con el propósito de irradiar una determinada región del organismo a estudiar.

Producen efectos biológicos y químicos, es decir, al incidir sobre un organismo producen ionización y/o alteraciones celulares que pueden ser responsables de trastornos o mutaciones ulteriores.

Pertenecen a una región del espectro electromagnético. Cuanto mas elevado es la diferencia de potencial que produjo los rayos, más corta es la longitud de onda de los mismos, es decir, su frecuencia es mayor.

Producen imágenes sobre películas fotográficas y fluorescencia sobre ciertos tipos de cristales; ambos fenómenos se utilizan en medicina para obtener placas radiográficas y visualizar imágenes sobre pantallas especiales de fluoroscopia o sobre tubos de rayos catódicos.

Los rayos X producen radiación secundaria y radiación dispersa lo que significa que un objeto biológico que recibe rayos X produce a su vez, nuevos rayos de diferentes características. Estos rayos son, generalmente, inconvenientes en la generación de imágenes y para la seguridad de las personas que trabajan con rayos X.

3.4.2.2. Rayos X y las sustancias.

Después de que los rayos se han producido se propagan en línea recta, si en su camino encuentran cualquier tipo de sustancia se comportarán con respecto a ella de acuerdo a las características de la misma. De esta forma se pueden producir algunos de los efectos ya mencionados, tales como producir fluorescencia o desencadenar radiación secundaria; Se clasifica la ocurrencia de tres posibles efectos (Figura 3.16):

- **Absorción.** Si los rayos no atraviesan y son detenidos por la sustancia.
- **Transmisión.** La radiación X puede atravesar la sustancia sin ser absorbida.
- **Dispersión.** Si al atravesar la sustancia se produce tanto rayos X dispersos como secundarios.

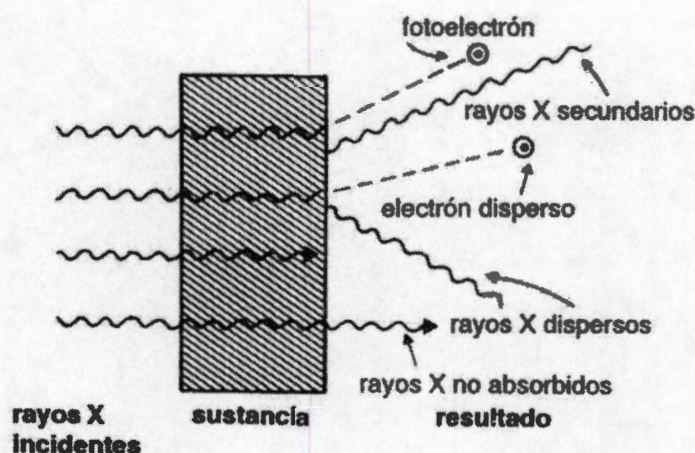


Figura 3.16 Rayos X y materia

Es necesario aclarar que los rayos X secundarios dependen de la energía y longitud de onda, así como de la sustancia que los rayos X originales encontraron en su camino. Tanto los rayos X secundarios como los dispersos representan una notoria desviación geométrica de la dirección inicial que tenían los rayos X primarios, lo cual tiene gran importancia práctica en la obtención de radiografías.

3.4.2.3. Calidad radiográfica

Se habla de calidad radiográfica al considerar los factores que determinan el buen resultado de una exposición.

Por ello la calidad de una radiografía depende de las siguientes propiedades:

- **Densidad.** Es la cantidad de ennegrecimiento de la placa, la cual es directamente proporcional a la radiación incidente. Una buena imagen debe tener el nivel de ennegrecimiento tal que permita diferenciar estructuras nítidamente. Existe un instrumento electrónico que mide la densidad por medio de la cantidad de luz transmitida y se llama densitómetro.
- **Contraste.** Se define a partir de la existencia de diferentes densidades, así la discriminación de dos densidades diferentes en dos estructuras contiguas se llama contraste; por ello se dice que el contraste es bajo si dos estructuras adyacentes no presentan una diferencia nítida en la escala de grises posibles. El mayor contraste se logra al tener el negro intenso junto al mayor blanco posible.
- **Definición.** Es la calidad con que se representan los detalles, es decir, la agudeza o nitidez con que aparecen en la imagen radiológica, los detalles de estructuras finas. La definición es afectada por la aparición de uno o más factores, algunos de los cuales tienen su origen en la calidad del equipo

radiológico: deformación por movimiento, deformación geométrica, deformación por el material.

3.4.2.4. Factores que controlan la calidad

La calidad del equipo y la pericia técnica del operador determinarán la capacidad de control sobre estos factores.

El operador emplea lo que se conoce como técnica radiográfica, con la que se conocen los valores que se seleccionan en el equipo y la posición del paciente.

Se entiende la manera determinante en que influyen los parámetros técnicos del equipo radiológico, especialmente los generadores, por lo que se debe conocer cuándo un estudio incorrecto es resultado de alteraciones de parámetros y cuándo es resultado de una inadecuada operación.

3.4.2.4.1. Densidad y corriente.

La densidad está determinada por tres factores técnicos:

1. La corriente del tubo o miliamperes (mA).
2. Tiempo de exposición (s).
3. El producto de corriente-tiempo (mAs).

La corriente que fluye por el tubo es resultado del calentamiento del elemento generador de electrones, conocido como filamento, dicha corriente combinada con un valor de tiempo, es el factor que ennegrece más o menos el estudio. Así la densidad radiográfica es directamente proporcional al valor de los mAs (Figura 3.17), de manera que cuando se modifican estos valores a la mitad o al doble se producen cambios en un cien por ciento de la densidad, más blanco o más negro, respectivamente.

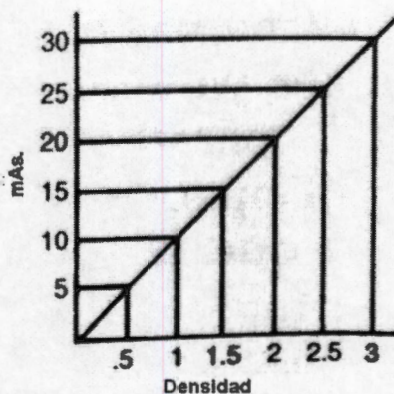


Figura 3.17 Relación de densidad con mAs.

3.4.2.4.2. Contraste y diferencia de potencial

El parámetro principal que controla el contraste es la diferencia de potencial, los rayos X generados por altos valores de potencial, atraviesan más el tejido y con ello crean diversos grados de gris, con lo que se empeora el contraste; menor diferencia

de potencial produce mayor absorción de rayos X de ciertas longitudes de ondas, con lo que obtiene más blanco en esa región de la película, lo que significa mejor contraste.

Es importante tener en cuenta que la penetración de los rayos X sobre el tejido no sólo depende de la diferencia de potencial, sino también está determinada por la densidad del material, el número atómico del mismo y su volumen. Por lo cual se utiliza una diferencia de potencial (kV) que indirectamente considera estas influencias, dicho nivel está entre 60 y 120 kV, lo que minimiza la radiación sobre el paciente y optimiza el contraste.

3.4.3. Conceptos asociados al estrato explorado.

En la tomografía axial computarizada, se obtienen imágenes bidimensionales, pero con la diferencia respecto a las radiografías, de corresponder a valores de absorción de radiación de volúmenes, es decir a los llamados elementos de volumen, en los que se ha dividido arbitrariamente un estrato o capa axial del cuerpo explorado.

Sobre la pantalla que muestra la imagen obtenida sólo se observa un plano bidimensional donde se deben definir algunos conceptos importantes.

Campo de visión. Se define como campo de visión (*field of view*) a la magnitud del área explorada: el área completa del plano bidimensional del estrato (Figura 3.18).

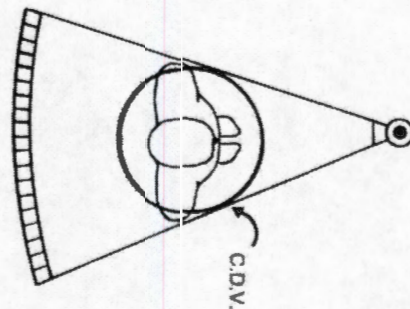


Figura 3.18 Campo de visión.

Matriz. Es un arreglo matricial de filas y columnas en que se divide el campo de visión: tenemos una matriz de números en la que cada número representa el valor de la imagen en esa ubicación. De esta forma el propósito básico de la computadora usada en el TAC, es calcular el valor numérico que se asignará a cada cuadrícula de la matriz, que corresponde a los valores de los coeficientes de absorción de radiación de cada una de las cuadrículas. Cuanto más pequeñas son las cuadrículas se tendrá una

imagen mucho mas detallada y con mayor información para el diagnóstico (Figura 3.19).

Pixel. Figura 3.19, el valor dimensional de cada cuadrícula en que dividimos el campo de visión es conocido como *pixel* (abreviación de *picture element*).

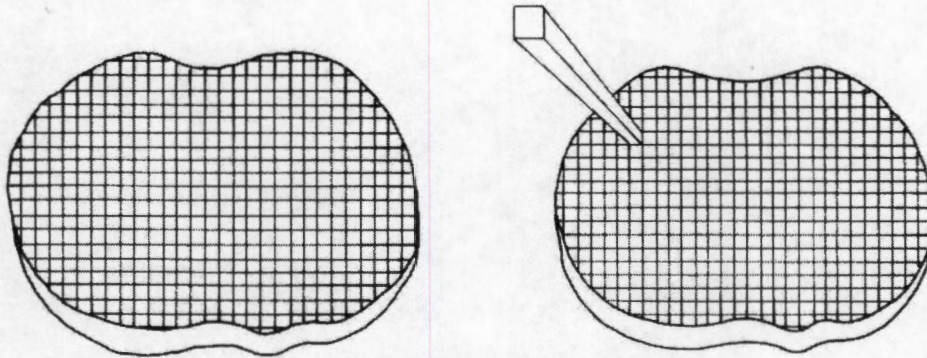


Figura 3.19 Matriz y Pixel

Voxel. El volumen formado por el pixel como superficie bidimensional y el ancho de estrato como tercera dimensión se define como elemento de columna o voxel. Este es considerado como el volumen más pequeño que absorbe la radiación aplicada (Figura 3.20).

Número CT. El valor numérico, dentro de una escala limitada, que se asigna previo cálculo a cada pixel y que representa la capacidad de absorción de radiación X de cada voxel del estrato estudiado se le define como número CT (Figura 3.20).

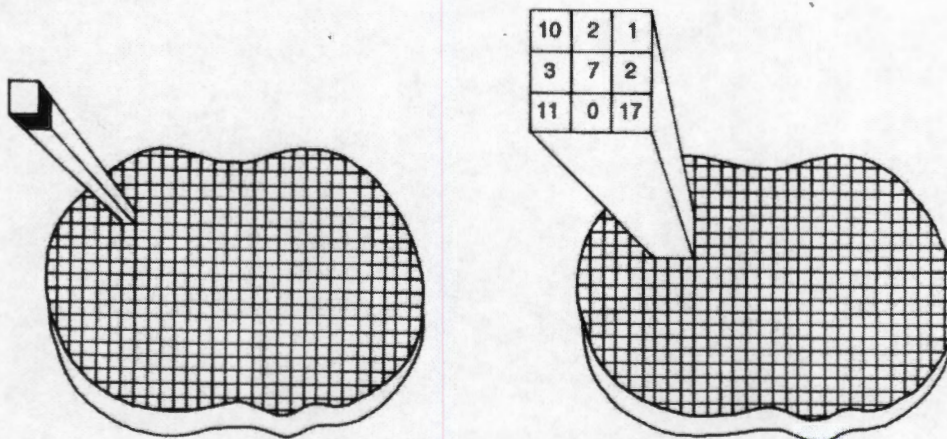


Figura 3.20 Voxel & Número CT.

Escala de Grises. Para obtener una imagen que muestre a la región comprendida en el campo de visión tal como se vería si fuera resultado de un corte físico de la región, se requiere que exista una correspondencia entre los valores escalonados de absorción del tejido y los valores

escalados de gris, desde blanco hasta negro. La escala de gris es útil para la asignación de un tono de gris (o de color) para cada valor calculado por la computadora, de los diferentes coeficientes de absorción en el estrato explorado, correspondientes a cada voxel.

Escala de Hounsfield. Para representar los valores numéricos de cada píxel, se requiere usar una escala numérica que valore cuantitativamente el coeficiente de atenuación de cada voxel. El valor negativo máximo, -1000, corresponde al aire que es el elemento con menor capacidad de atenuación que podía encontrarse en el organismo, y en el otro extremo, el valor de máxima absorción de radiación que corresponde al hueso (+1000). El valor intermedio de la escala corresponde a la atenuación o absorción de radiación por el agua. Debido al gran número de valores posibles de absorción de radiación que se encuentran en la escala anteriormente definida, se comprende que el ojo humano no pueda discriminar todos los valores, por lo que en la obtención de la imagen la asignación de valores de gris tiene que acomodarse al observador (Figura 3.21).

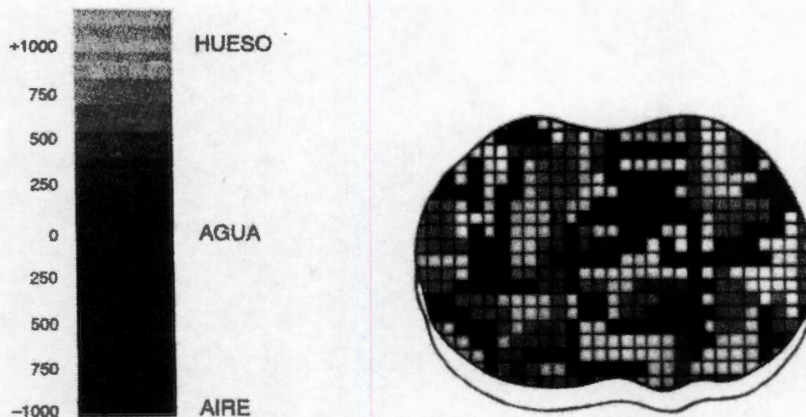


Figura 3.21 Escala de números CT o escala de Hounsfield.

Ventana. Debido a que cada nivel de gris corresponde a un nivel de atenuación, se tienen más de 2000 valores posibles de gris a representar. Sin embargo el ojo humano sólo puede distinguir aproximadamente unos 20 niveles de gris, por lo que debe hacerse una discriminación útil de las diferencias, con lo que se pierde una buena cantidad de información útil. Por esto se crea una llamada ventana de observación (Figura 3.22): que consiste en expandir o comprimir por regiones, para asignar los valores de gris. Así, una ventana estrecha exhibe un rango pequeño de números CT, pero lo hace de tal forma que se pueda hacer una fácil distinción de un número con relación a otro; una ventana amplia puede condensar varios

números CT en un tono, pero permite exhibir una rango amplio de números CT.

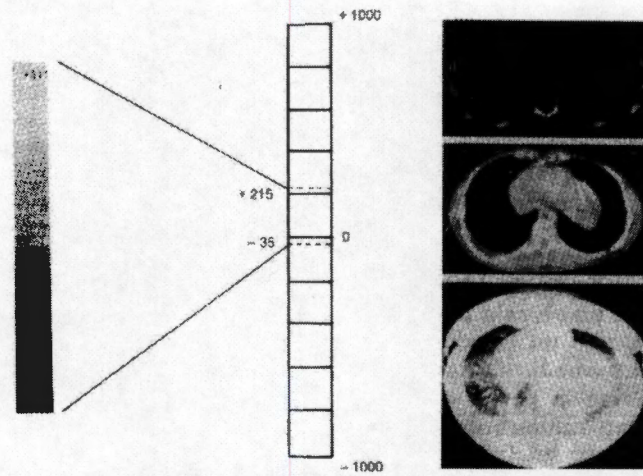


Figura 3.22 Ventana & Efecto del control de la ventana.

Tamaño de la matriz. El número de pixeles define el tamaño de la matriz, por lo que se obtienen diferentes valores de matriz. Los valores más utilizados en los diferentes equipos comerciales son 256, 320 y 512.

Tamaño de pixel. El tamaño del pixel es determinante en la calidad de la imagen y se define como la razón entre el tamaño del área explorada y el tamaño de la matriz.

Cálculo de los números CT. Para determinar los números CT se utiliza la ecuación que relaciona los valores de atenuación del agua y de cualquier estrato de acuerdo a la escala. Así tenemos que cada número resulta ser:

$$\text{númeroCT} = 1000x \frac{\mu_{\text{objeto}} - \mu_{\text{agua}}}{\mu_{\text{agua}}}$$

donde:

μ = Coeficiente de atenuación.

El agua es el elemento usado como referencia, ya que para fines médico es preferible expresar las unidades en valores absolutos, y debido a que cuando se fabricaron los primeros equipos se usaba como cuerpo compensador una bolsa de agua, destinada a evitar el endurecimiento irregular de la radiación y al mismo tiempo fijar el objeto a estudiar.

3.4.4. Densidad y atenuación

Los rayos X emitidos por un tubo atraviesan el objeto (Figura 3.23), y al llegar atenuados al detector sólo definen la atenuación total de la radiación en esa dirección. Al definir un número alto de direcciones se tiene, consiguientemente, un conjunto de atenuaciones totales, con las cuales puede formarse un conjunto de ecuaciones donde las incógnitas son los valores individuales de atenuación de cada una de las partes atravesadas por el haz de radiación en esa dirección. Así puede calcularse el valor característico de atenuación de los pequeños elementos de volumen, en que se ha dividido el objeto de estudio, posteriormente se asigna un tono de gris, entre el blanco de los huesos y hasta el negro que representa el aire, con el que cada tejido específico es identificado.

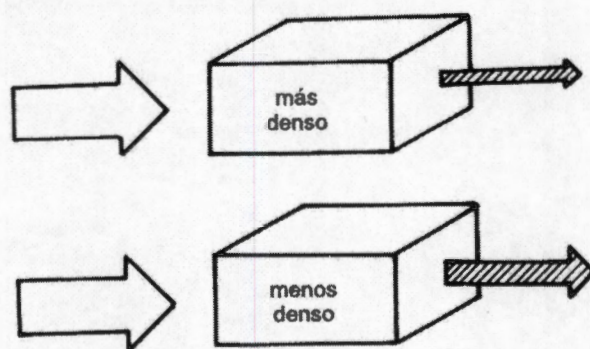


Figura 3.23 Efecto de la densidad en la transmisión de los rayos X

El conjunto de factores que son determinantes en la calidad de la imagen resultante son:

- Absorción de la radiación.
- Técnica de exploración y detección.
- Análisis matemático de los valores detectados.
- Factores técnicos de la reconstrucción de imagen.
- Complementos.

3.4.5. Absorción de la radiación

La penetración en la materia depende de la potencia eléctrica aplicada al tubo de rayos X, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\lambda_{Min.} = 12,35/kV (\text{Å})$$

La longitud de onda de la radiación, asociada a la penetración, esta en función inversa a la diferencia de potencial aplicada a los electrodos. El valor de los coeficientes de absorción de rayos X de las diferentes masas depende de:

- Frecuencia de los rayos X (longitud de onda).

- Concentración del número atómico (densidad del material).
- Número atómico del material en el camino del haz de radiación.

La absorción de rayos X está determinada por:

$$I = I_0 \times e^{-\int \mu dx}$$

I = Intensidad recibida en el detector después de pasar por el cuerpo.

I_0 = Intensidad emitida por el tubo de rayos X en el sentido lineal.

μ = Coeficiente de atenuación o absorción.

dx = Espesor del objeto.

Si se considera el efecto atenuador de un conjunto de capas delgadas puestas en línea una detrás de la otra en la dirección del haz, se tendría la intensidad recibida determinada por la suma de los coeficientes de cada uno de los estratos o capas (Figura 3.24).

Estos resultados se pueden expresar matemáticamente, de la siguiente manera:

$$I = I_0 \times e^{-(\mu_1 d_1 + \mu_2 d_2 + \mu_3 d_3 + \dots + \mu_n d_n)}$$

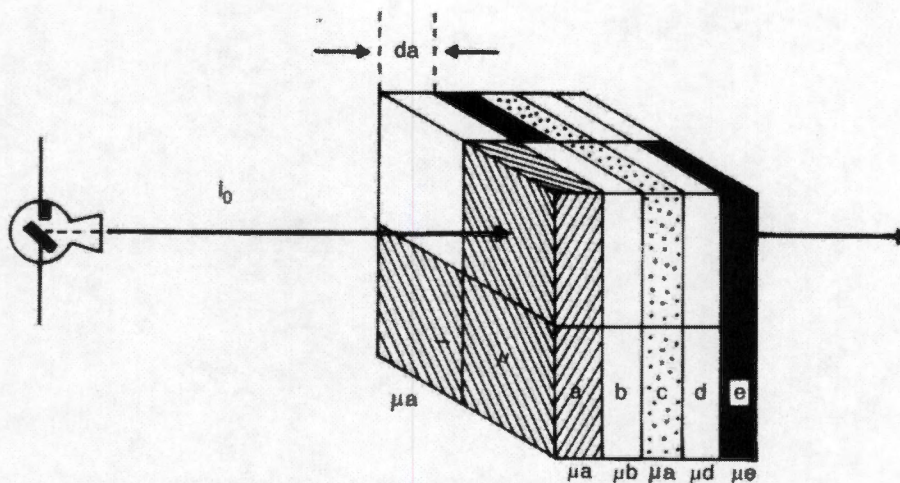


Figura 3.24 Absorción total después de atravesar n capas.

3.4.6. Irradiación axial

Si un conjunto de estratos es sometido a radiación rayos X, no en forma perpendicular sino en forma axial (Figura 3.25), de tal forma que el haz se aplica a una capa por vez y además se desplaza el tubo de rayos longitudinalmente a las capas, se obtiene un sistema de ecuaciones, formado por "n" ecuaciones de

intensidad con "n" incógnitas, que son los coeficientes de absorción de las "n" partes en que se divide el estrato, así la ecuación de absorción se convierte en:

$$I_1 = I_0 \times e^{-(\mu_1 d + \mu_2 d + \mu_3 d + \dots + \mu_n d)}$$

$$I_2 = I_0 \times e^{-(\mu_1 d + \mu_2 d + \mu_3 d + \dots + \mu_n d)}$$

$$I_3 = I_0 \times e^{-(\mu_1 d + \mu_2 d + \mu_3 d + \dots + \mu_n d)}$$

...

$$I_n = I_0 \times e^{-(\mu_1 d + \mu_2 d + \mu_3 d + \dots + \mu_n d)}$$

Con lo cual nos permite calcular los "n" coeficientes requeridos, posteriormente la computadora asignara tonos de gris o colores a los valores calculados.

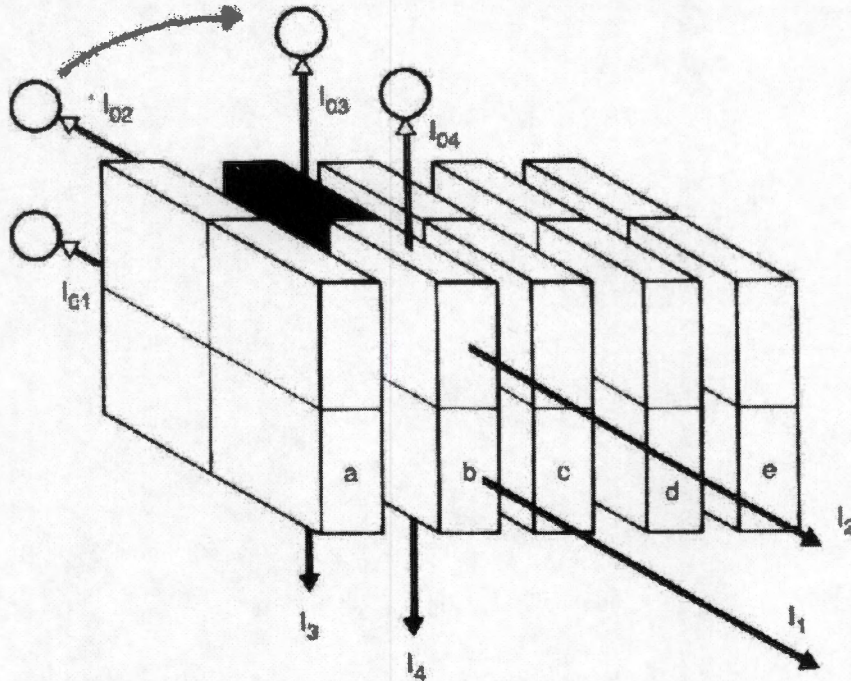


Figura 3.25 Irradiación axial de un estrato.

3.5. Imagenología por resonancia magnética

De acuerdo a la mecánica clásica la resonancia es un fenómeno oscilatorio que puede representarse por una senoidal con amplitud y frecuencia propia, y magnitud finita. Si un objeto se encuentra en presencia de una onda cuya frecuencia corresponda a la suya propia, entra en movimiento, su amplitud aumenta y entra en resonancia. Las ondas empleadas en resonancia magnética (RM) se encuentran entre 1 y 10 Mhz, ondas de radiofrecuencia (RF). La resonancia magnética nuclear

(RMN) es una herramienta que permite el estudio de propiedades físicas y químicas a pequeña escala, de acuerdo con la capacidad del sistema. Una aplicación específica de la RMN es la imagenología (IRM). La IRM es capaz de producir imágenes de órganos internos y estructuras de seres humanos vivos de forma relativamente no dañina[99], con una excelente resolución del contraste entre tejidos blandos[100]. La IRM se basa en la capacidad de algunos núcleos atómicos para absorber ondas de radiofrecuencia cuando son sometidos al efecto de un campo magnético. Dicha capacidad genera una señal que se detecta por un receptor y es procesada por una computadora para producir imágenes [101].

La IRM fue desarrollada en los 80's y es un proceso complejo basado en el fenómeno de RMN, fenómeno descubierto por Felix Bloch[102] y Purcell en 1946[103]. El concepto de extenderla a estudios in vivo en los humanos se atribuye Jasper Jackson, quien produjo la primera señal de RM de un animal vivo. Lauterbur[104] y Mansfield[105] ganaron el premio Nóbel por sus descubrimientos y aportaciones en IMR.

La adquisición de imágenes, está relacionado con la intensidad de la señal en la región de interés, es dependiente de parámetros intrínsecos como la densidad de espines, tiempos de relajación longitudinal T_1 (espín-red) y de relajación transversal T_2 (espín-espín), movimientos moleculares, efectos de susceptibilidad y cambios químicos.

3.5.1. Contraste en IRM

El contraste está basado en la diferencia de la intensidad de la señal entre áreas de composición distinta en una imagen. De acuerdo a esto, una imagen se forma mediante la medición de energía disponible en cada uno de los tejidos en un instante determinado. Las imágenes en T_1 tienen un contraste muy distinto a las imágenes con contraste T_2 y de igual manera, tienen utilidad y contenido diagnóstico muy distinto. Una imagen de contraste T_1 da información anatómica, mientras que una imagen de contraste T_2 da información patológica[109].

Después de que un pulso de 90° es aplicado al tejido en equilibrio térmico en un campo magnético estático, una señal generada por la libre precesión del vector de magnetización alrededor de B_0 que decrece con el tiempo (FID) es registrada. En este proceso, la magnetización al equilibrio M_0 apunta a lo largo de la dirección del campo magnético estático, es rotada en el plano transversal con lo que la magnetización del plano transversal M_{XY} tiene la magnitud M_0 . A través del tiempo la componente de magnetización transversal se decrementa. Si otro pulso de 90° es aplicado al tejido antes que la magnetización longitudinal retorne al valor de equilibrio de M_0 , la magnetización en el plano transversal será menor que M_0 y la amplitud de la señal FID resultante se reducirá comparada con la señal inicial. La amplitud de las señales FID es afectada por la magnitud de la magnetización al equilibrio M_0 , el cual a su vez, es afectado por la densidad de protones en el tejido.

La FID también es afectada por las siguientes propiedades: el tiempo de relajación del tejido y el intervalo de tiempo entre los dos pulsos de 90° , a mayor tiempo de relajación o menor periodo de tiempo menor amplitud de FID[106] (Figura 3.26 y Figura 3.27).

Así, en un tejido con la misma densidad de protones la FID será derivada del tejido que tiene mayor tiempo de relajación y ése tejido aparecerá oscuro en la imagen.

Las áreas brillantes en la imagen corresponderán a tejido con mayor energía disponible en un tiempo T_R corto, mientras que tejidos con tiempos de relajación mayores aparecerán oscuros. El contraste máximo entre dos tejidos se obtiene con un tiempo de T_R igual al promedio del tiempo de relajación T_1 de los tejidos[106].

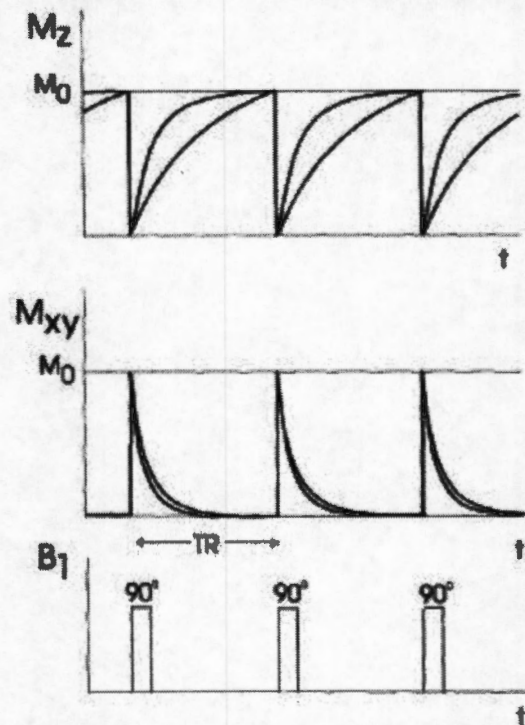


Figura 3.26 Una serie de pulsos de 90° : secuencia saturación-reestablecimiento.

Las curvas de relajación de 2 diferentes tejidos son mostradas, ambos tienen la misma densidad de protones, uno tiene un T_1 menor, T_R es 4 veces más grande que el T_1 de ambos tejidos. Ambos tejidos producen una señal de FID del mismo tamaño debido a que T_R permite la completa relajación T_1 entre cada pulso de 90° .

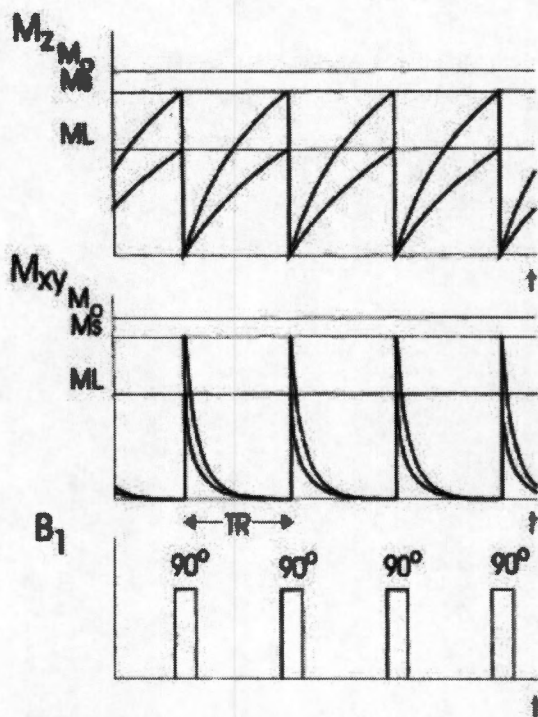


Figura 3.27 Secuencia saturación-reestablecimiento con T_R reducido.

La misma secuencia y el mismo tejido que en la Figura 3.26 pero con un T_R reducido hasta ser comparable a T_1 . El tejido con el T_1 más largo produce una FID pequeña, el tamaño de las FID puede ser afectado por la densidad de protones. Esta secuencia puede producir una imagen cuyo contraste dependa de T_1 y de la densidad de protones.

3.5.1.1. Contraste por relajación longitudinal (T_1).

La magnetización longitudinal esta asociada, en dos tejidos con diferentes tiempos de relajación, si se elige un T_R corto, en un instante dado, la diferencia de intensidad será máxima, lo que dará como resultado un mayor contraste en la imagen. Entre menor sea T_R mayor será el contraste. Para obtener contraste en T_1 , al transmitir pulsos de 90° . Si T_R es menor que 4 o 5 T_1 , los componentes del tejido recuperarán su magnetización a lo largo del eje Z (M_z) cuando el próximo pulso se aplique y las señales FID reflejarán diferencias en la densidad de protones. Si el T_R es corto, los vectores de magnetización no alcanzarán su máximo tamaño cuando llegue el próximo pulso de 90° y la FID tendrá menor amplitud.

3.5.1.2. Contraste por relajación transversa (T_2).

La atenuación de magnetización transversa debida al desfaseamiento de los protones por inhomogeneidades del campo se asocia con el contraste T_2 . Este tipo de contraste se obtiene al tener valores altos de T_R y de T_e . Un tejido con tiempo de relajación corto regresa rápidamente al estado de equilibrio, mientras que a un tejido que tiene un tiempo de relajación largo le toma mayor tiempo regresar al equilibrio (Figura 3.28). Si se elige un T_e largo, la diferencia de intensidad de la señal disponible es máxima, lo que dará como resultado mayor contraste en la imagen. Se puede observar que las imágenes con contraste T_2 tiene mayor

dependencia de T_e que de T_R , y cuanto mayor sea T_e , más influencia de contraste T_2 tendrá la imagen. En este tipo de contraste, los tejidos con tiempos de relajación cortos aparecerán oscuros, mientras que los tejidos con tiempos de relajación largos aparecerán brillantes.

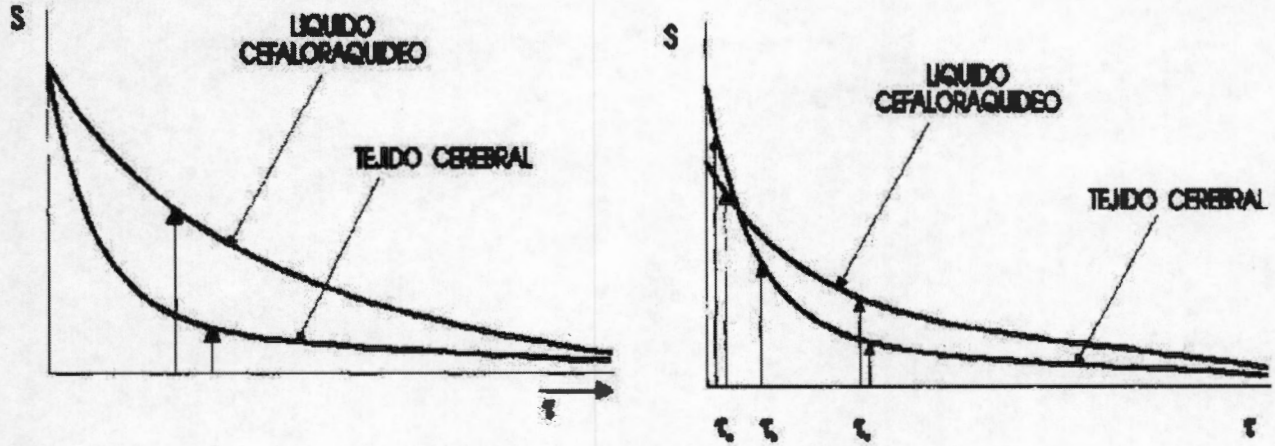


Figura 3.28 Efecto del contraste en T_2 .

4. Desarrollo experimental

4.1. Síntesis del material

La síntesis por plasma del polímero polipirrol-Iodo (PPy/I) se hizo en un reactor cilíndrico de vidrio pirex con un diámetro externo de 90mm y 200mm de longitud con un volumen aproximado de 1500cm^3 acoplado a un sistema de vacío, una bomba mecánica, a un generador de funciones senoidales a una frecuencia de 13.56MHz y a un amplificador de voltaje, Figura 4.1. En los extremos del tubo de vidrio se encuentran dos bridas fijas de acero inoxidable. Cada brida en el centro tiene un acceso para un electrodo metálico deslizante de placas paralelas. Estos electrodos deslizables también están contruidos de acero inoxidable y permiten situarlos a la distancia conveniente para la descarga de resplandor. Cada electrodo se conecta eléctricamente con su brida correspondiente de tal forma que el reactor tiene dos electrodos al mismo potencial, esto sirve para hacer que el campo eléctrico generado entre los electrodos sea más homogéneo. Cada brida tiene también dos puertos de acceso. En los puertos de acceso de una brida se conecta el sistema de vacío, consiste de una bomba mecánica y una trampa fría para partículas, y un medidor de presión tipo Pirani Marca Edwards. Por la otra brida se da acceso al monómero y al Iodo, los dos en fase vapor debido a la diferencia de presión entre el recipiente que los contenía y el reactor. Los productos de la reacción que no se depositaron como película fueron colectados por un condensador enfriado con nitrógeno líquido.

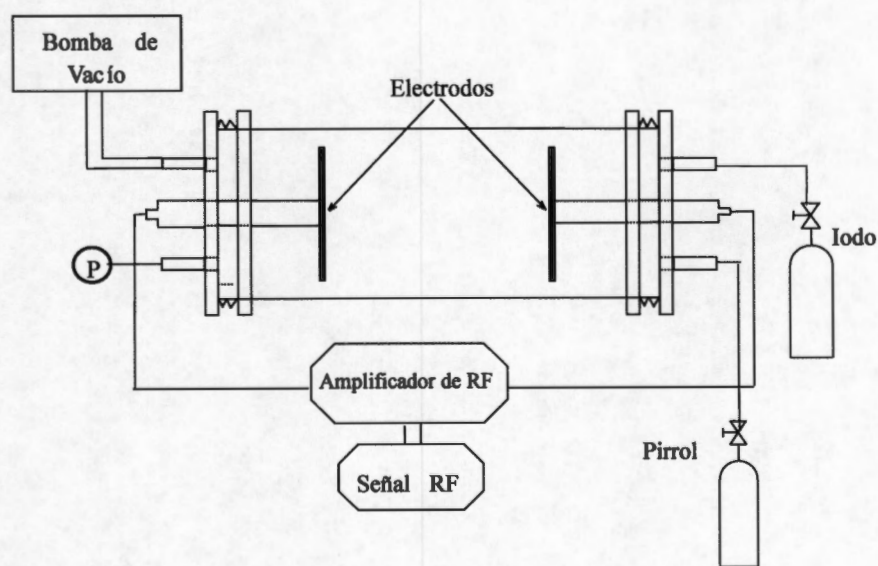


Figura 4.1 Diagrama del sistema para sintetizar PPy/I

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

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

En la Figura 4.2(a) se muestra una fotografía del reactor al inicio de la polimerización, se aprecia un resplandor violeta característico de los monómeros derivados del carbono. Cuando se introduce el yodo el resplandor es más intenso y de un color amarillo. En la Figura 4.2(b) se muestra una porción de la película de PPy/I ya separada del sustrato, está película tiene un color café oscuro y una apariencia rugosa, cuando la película estaba pegada al sustrato tenia una apariencia lisa, la rugosidad se le formo cuando el solvente interaccionó con ella hinchándola y separándola del sustrato.

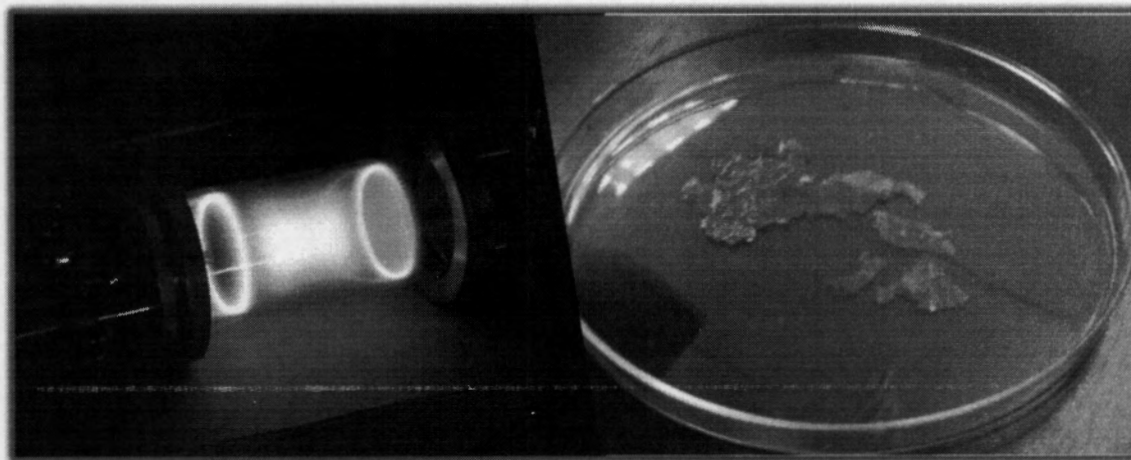


Figura 4.2 Cámara de reacción y PPy/I sintetizado

4.2. Fabricación de la pastilla para implante

Una vez obtenida la película de PPy/I está se molió en un mortero de ágata hasta volverla un polvo fino de color café. Entonces el polvo se deposito en un dado para hacer pastillas de KBr de acero inoxidable. El dado se puso en una prensa mecánica

a una presión de 9 Tn por 10 min. Durante estos 10 min. la presión se ajusto siempre a 9 Tn.

4.3. Modelo de lesión e implante

El presente trabajo siguió los lineamientos establecidos en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.

Se emplearon 16 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas entre 12-14 semanas de edad con peso corporal de entre 230-250g, divididas en 2 grupos:

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

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

Se extirparon 2 apofisis espinosas de T8 a T9 para observar los procesos laminares de esas vértebras. Finalmente se realizo una laminectomía de 2 niveles, extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía se realizo una incisión longitudinal en meninges de aproximadamente 5mm de largo, referenciando ambos lados de la incisión con un punto simple de sutura de 10-0 (Polipropileno deknatsi), posteriormente se hizo un corte transversal completo de la médula espinal, se corrobora mediante gancho de microcirugía y microscopio quirúrgico que ninguna vía nerviosa quedara conectada.

Inmediatamente después de terminar el proceso de lesión por sección completa de la médula espinal en las ratas, justo en el sitio de sección se introdujo en forma transversal un trozo de pastilla de polímero de aproximadamente 3mm de diámetro a los especímenes asignados al grupo PPy/I, posteriormente a ambos grupos se les paso una sutura de 10-0 a través de las meninges con puntos simples de sutura. Finalmente, la incisión quirúrgica se suturo en 2 planos. La fascia muscular y la piel con puntos simples y continuos respectivamente de 5-0 (polipropileno monofilamento).

Después de la cirugía todos los animales recibieron 200ml de penicilina benzatínica i.m. (1'200,000 u.i.) y anti-pirético (acetaminofen) disuelto en el agua de bebida

durante 3 días, posteriormente los animales fueron alimentados con una dieta a base de alimento comercial y agua *ad libitum*.

Los sujetos fueron trasladados para realizarles los estudios de Tomografía Axial Computarizada.

4.4. Tomografía axial computarizada

Para realizar el estudio de tomografía axial se utiliza el tomógrafo marca Elscint. Para realizar este estudio se emplean los parámetros de campo de visión (mm), densidad de corriente (mAs) y potencial usado en el tomógrafo (kV).

Con el fin de estudiar la evolución de los animales, control y con implante de PPy/I, y estudiar la integración del material en el tejido de la médula espinal se tomaron estudios tomográficos cada semana a partir del día de la lesión hasta completar 8 semanas de recuperación. En cada sesión de tomografía también se realizaron sacrificios (perfusión vía cardiaca) de un animal por grupo, para obtener una muestra de la médula espinal en diferentes tiempos de recuperación.

Para encontrar los parámetros óptimos de operación del tomógrafo se realizaron diferentes pruebas, en la Figura 4.3 se muestran tres diferentes corridas con diferentes parámetros de operación.

Los primeros parámetros empleados en el tomógrafo (Figura 4.3, A) fueron campo de visión de 180mm, densidad de corriente de 50mAs, potencial de 120kV. Se obtuvieron imágenes donde el contraste del material implantado era bueno pero no se distingue diferencia entre el tejido blando (como médula espinal) y los espacios vacíos pequeños.

Posteriormente se aplicaron los siguientes parámetros: campo de visión de 180mm, densidad de corriente 300mAs, potencial de 120kV y se obtuvo una pequeña diferencia en el contraste en tejido blando, (Figura 4.3, B).

Los parámetros finales (Figura 4.3, C) en los estudios fueron: campo de visión de 180mm, densidad de corriente 500mAs, potencial de 120kV con una distancia por corte de 0.2mm. Donde se alcanzó mayor resolución en tejidos blandos y en espacios vacíos, aunque el contraste material-médula se vio comprometido. En la Figura 4.3 se muestran cortes tomográficos los tres conjuntos de diferentes parámetros.

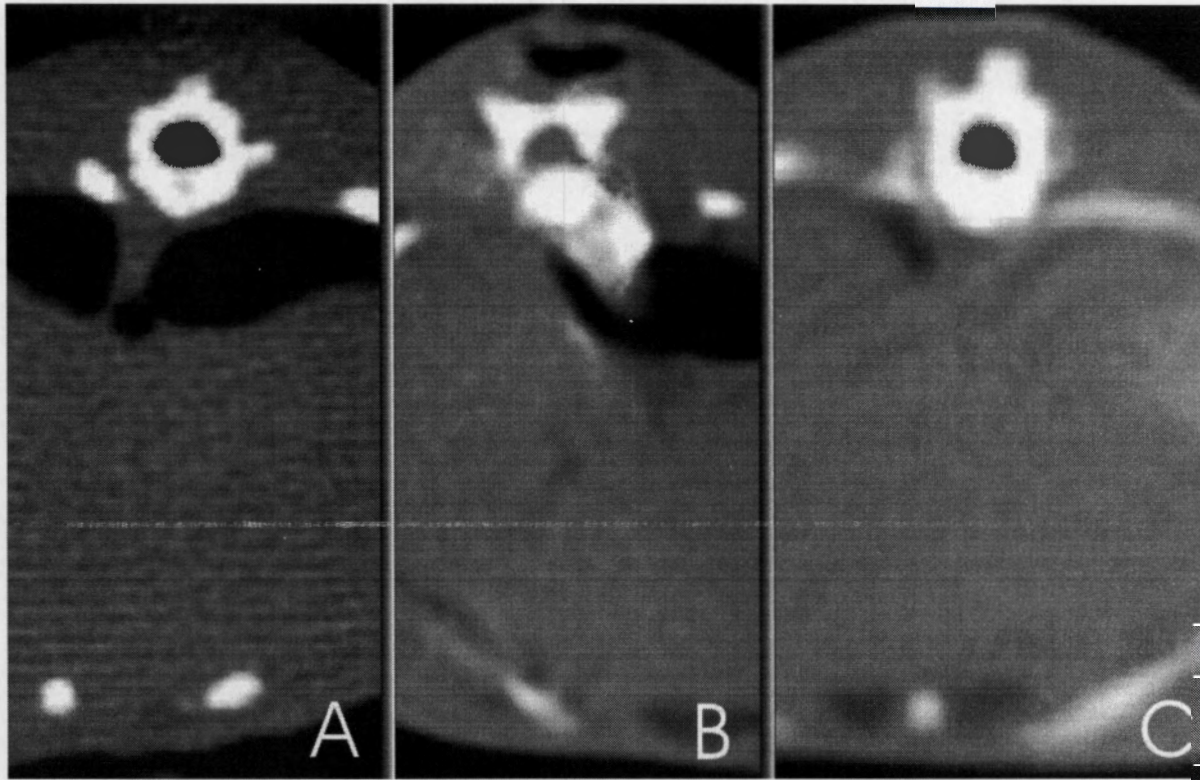


Figura 4.3 Cortes tomográficos con diferentes parámetros, región anterior a LME
 A)Corte tomado con 50mAs; B)Corte con 300mAs; C)Corte con 500mAs.

4.5. Sacrificio y estudio histológico

Una vez concluidos los estudios de Tomografía Axial Computarizada, con el fin de obtener muestras de los tejidos en la zona de interés y evitar que esté se colapse o se deteriore, los animales fueron anestesiados con una mezcla de 77.5mg de ketamina y 12.5mg de hidrocloreuro de xilacina por Kg de peso, y perfundidos por vía intracardiaca con 200ml de solución fisiológica más 1000u.i. de heparina a temperatura ambiente, seguida de 500ml de formaldehído al 10 %. Ambas soluciones se transfundieron a una razón de 30ml/min con una bomba peristáltica. Al termino de la perfusión se extrajo la médula espinal para obtener un segmento que abarco aproximadamente 2cm a partir de la región del epicentro de la lesión, hacia el segmento caudal y hacia el segmento cefálico de la médula.

Ya obtenido el tejido nervioso se colocó en el mismo fijador (formaldehído) durante 5 días, al cabo de los cuales se siguió el procedimiento para ser incluidos en parafina (Figura 4.4).

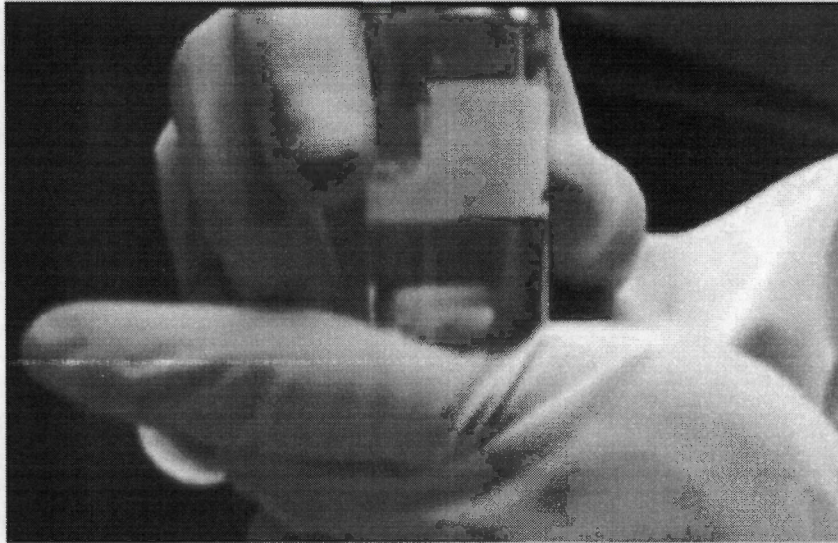


Figura 4.4 Muestra extraída de médula espinal

El tejido medular se deshidrató en alcoholes graduales alcohol etílico al 50 %, 80 %, 95 % y absoluto (30min en cada uno), posteriormente, se aclararon con 2 baños de xileno (30min en cada uno), se colocaron en parafina a 57°C durante 2hrs y posteriormente se incluyeron en moldes.

Se realizaron cortes longitudinales secuenciales de 10 μ m de espesor con un micrótomo, se obtuvieron 10 muestras. Los cortes obtenidos se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0,5g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron en laminillas de vidrio para ser teñidas con el procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris. (Apéndice B). Esta técnica tiñe de color violeta a los axones y células sanas, deja sin teñir quistes y células muertas ó dañadas. Con esta tinción se puede apreciar la conservación de la citoarquitectura de la médula espinal.

Una vez teñido y montado cada espécimen se procedió a fotografiar las zonas de lesión a una amplificación de 2X, 20X y 40X.

En la Figura 4.5 se muestran las fotografías de los cortes histológicos realizados a las muestras obtenidas de una rata con implante de PPy/I; en las cuales se puede observar la integración del implante con el tejido nervioso de la médula espinal. De manera global se conserva la citoarquitectura de la médula espinal.

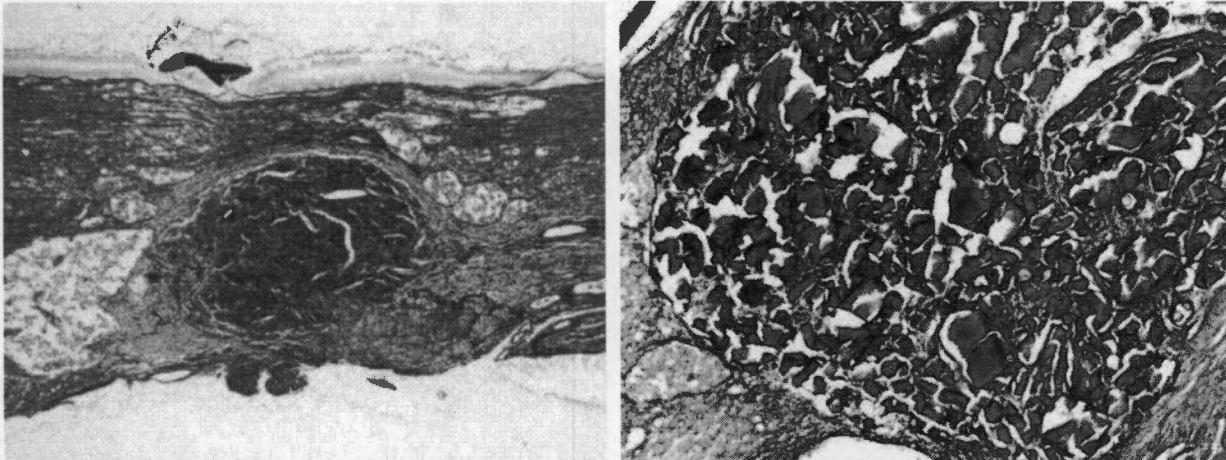


Figura 4.5 Cortes histológicos a médula espinal con implante de PPy/I. Muestran la integración del implante y el tejido nervioso.

Al término de los experimentos se contó con histologías correspondientes a cada semana de progresión (1 a 8 semanas) de sujetos independientes. Donde es posible distinguir, en los animales del grupo PPy/I, el grado de fragmentación del implante de polímero. Mientras que en los pertenecientes al grupo Control es clara la evolución de los quistes generados en el tejido nervioso.

4.6. Imagenología por resonancia magnética

A un animal perteneciente al grupo PPy/I con 4 semanas de recuperación se le realizó un proceso de perfusión cardiaca donde se extrajo una muestra de médula espinal de 2mm de diámetro y 2cm de longitud tomando como referencia la zona del implante (epicentro de lesión) y fue depositada en un contenedor con Formaldehído al 10 %.

A esta muestra se le realizó un estudio de Imagenología por resonancia magnética (Figura 4.6) con un sistema Bruker de 7T. Se emplearon secuencias estándar de gradientes de eco con los siguientes parámetros de adquisición: TE/TR=5/20ms, FOV=8x8cm, ángulo=20°, tamaño de matriz=128x128, NEX=2. Los estudios fueron obtenidos con formato JPG.

La Figura 4.6 muestra 2 IRM como las entrega el equipo, se puede distinguir (en A) la "H" característica de la médula espinal (materia gris) y la materia blanca. En B, se aprecia la zona de lesión, donde al no mantener la citoarquitectura de la médula se ve como están dispersas materia gris y materia blanca, demás tejido, así como la presencia del material implantado entre los tejidos.

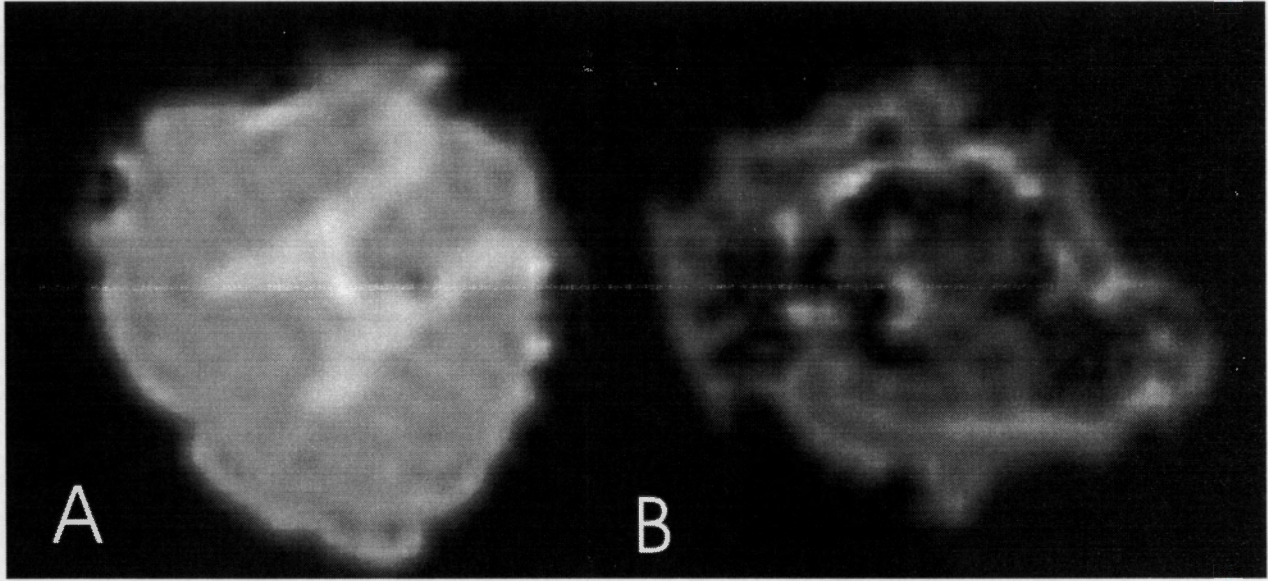


Figura 4.6 Imagen de resonancia magnética obtenida con los parámetros definidos.

5. Resultados

5.1. Caracterización del Material

Al análisis de FT-IR, TGA, Rayos-X y morfológico se realizó sobre las películas de PPy/I y la conductividad eléctrica se calculo de la medida de resistencia eléctrica que se le hizo directamente a la pastilla usada para el implante de ratas.

5.1.1. Espectroscopia de infrarrojo, FT-IR

El espectro de infrarrojo que se muestra en la Figura 5.1 se tomó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR muestreando directamente sobre la película de PPy/I, con un intervalo de longitud de onda de 400-4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . El espectro se muestra en modo de absorción.

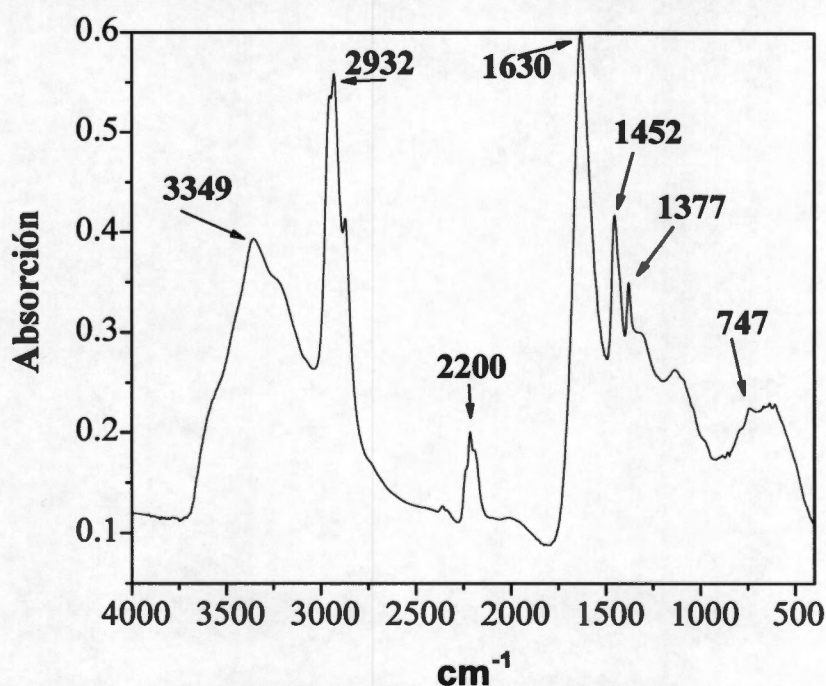


Figura 5.1 Espectro de infrarrojo de PPy/I

Como se puede apreciar en la Figura 5.1 el espectro esta formado de dos bandas amplias y complejas de absorción características de los polímeros sintetizados por plasma. La primer banda se encuentra entre 2400 y 3600 cm^{-1} , en ella se puede apreciar dos picos que sobresalen. El primero pico centrado en 3349 cm^{-1} corresponde a la vibración de las aminas primarias y secundarias (-NH₂, -NH) provenientes del anillo de pirrol.

Como no se usaron condiciones especiales de almacenamiento de la película, está absorbe una pequeña cantidad de agua (como se muestra en el análisis de TGA), por lo que en esta misma región es posible encontrar vibraciones que correspondan a grupos O-H. El segundo pico centrado en 2932cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica de los carbonos alifáticos CH_3 y CH_2 , indican la existencia de grupos alquilo que se pueden originar por el rompimiento de algunos anillos de pirrol durante la descarga de plasma.

La segunda banda compleja de absorción se encuentra en la región de 500 a 1600cm^{-1} . En esta banda sobresalen 4 picos. El primero está centrado en 1642cm^{-1} y corresponde a las aminas primarias, secundarias y terciarias provenientes de la estructura del pirrol, esta vibración junto con 3349cm^{-1} es una confirmación de la existencia de estos grupos amina. Además este pico es ancho porque incluye las contribuciones de los grupos amina ($\text{C}=\text{N}$) y de los alquenos ($\text{C}=\text{C}$) provenientes de anillos rotos de pirrol. En 1452cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los grupos metilo ($\text{C}-\text{H}$). El pico centrado en 1377cm^{-1} corresponde a la vibración de los grupos metilos ($-\text{CH}_3$). El cuarto pico centrado en 747cm^{-1} se encuentra la vibración que corresponde a los enlaces del tipo C-C.

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

5.1.2. Propiedades eléctricas

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

$$R = \rho \frac{L}{A} \Rightarrow \rho = R \frac{A}{L}$$
$$\sigma = \frac{1}{\rho} = \frac{L}{RA}$$

donde R , ρ , σ son la resistencia, la resistividad y la conductividad eléctrica respectivamente. L es el espesor de la pastilla y A es el área de la pastilla.

El material PPy/I presentó una resistencia de $1.3\text{M}\Omega$ a una humedad relativa de 25%, una resistividad de $45.94\text{M}\Omega\text{cm}$, y una conductividad de 21nS/cm .

5.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

La descomposición térmica del PPy/I se hizo con un analizador *Perkin-Elmer thermogravimetric Analyzer Pyris 1 TGA* en una atmósfera de nitrógeno con rampa de calentamiento de 10 °C/min. entre 25 y 700°C. La Figura 5.2 muestra la descomposición térmica de la película de PPy/I. En la gráfica se observa que el polímero pierde aproximadamente el 5% de agua y disolventes entre 25 y 150°C. Entre 200 y 400 °C el polímero pierde el yodo y parte de su estructura compleja, con alrededor del 40% de pérdida en peso. A partir de 400°C, los polímeros tienen una caída de masa moderada que termina en aproximadamente 650°C. En este punto sólo quedan algunos fragmentos de cadenas con algunos átomos de yodo enlazados fuertemente y que necesitan mayor energía térmica para liberarlos. La descomposición del material finaliza en los 700°C.

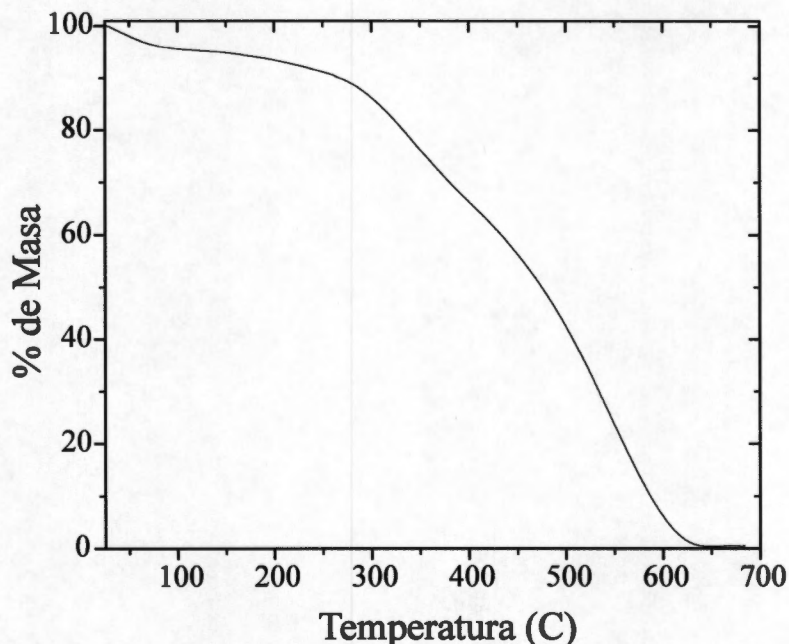


Figura 5.2 Descomposición térmica del PPy/I

5.1.4. Análisis de Rayos-X

En la Figura 5.3 se presenta el espectro de difracción de rayos-X de PPy/I. El espectro corresponde a un material amorfo con un pequeño pico cristalino centrado en la posición $2\theta=22.5^\circ$. Este pico cristalino indica que el material presenta regiones ordenadas que pueden influir en la conductividad eléctrica del material. El espectro de rayos-X y el análisis termogravimétrico sugieren que el contenido de humedad tienen efecto sobre la conductividad eléctrica. Cruz, et al, [92] estudiaron el PPy/I a diferentes tiempos de reacción y mostraron que al aumentar la humedad relativa del material aumentaba la conductividad eléctrica. Hay que recordar que este material va a estar en un ambiente biológico y en contacto con fluidos corporales por lo que

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

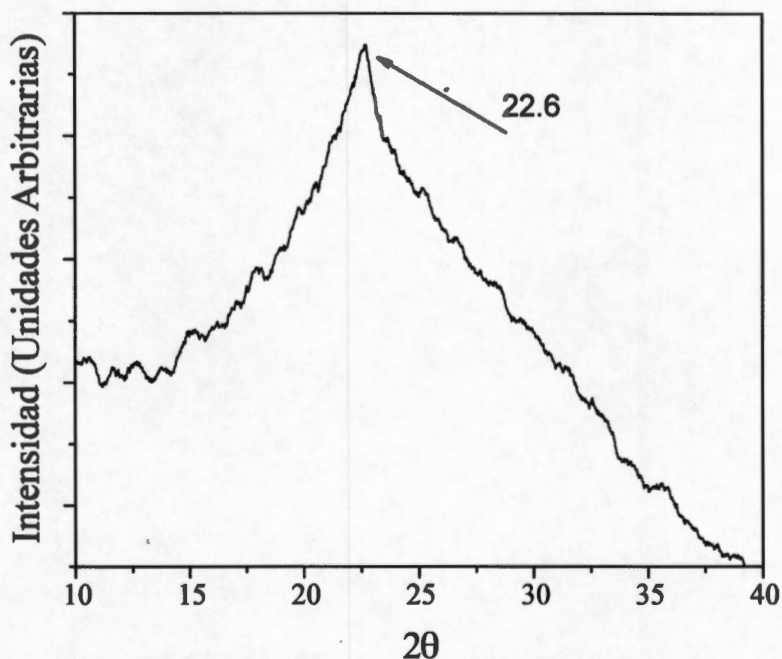


Figura 5.3 Difractograma de rayos-X de PPy/I

5.1.5. Análisis Morfológico

La morfología del PPy/I sintetizado por plasma se estudio en un microscopio electrónico de barrido Philips XL 30. En la Figura 5.4 se puede apreciar una serie de fotografías de la película de PPy/I. La Figura 5.4 (A) tiene una amplificación de 500x, muestra una superficie compuesta de pequeños aglomerados de material con un tamaño aproximado de 5-10µm. También se puede apreciar que los aglomerados están distribuidos de manera uniforme sobre toda la superficie. En la Figura 5.4(B) se muestra la película de PPy/I con una amplificación de 10, 000x. La morfología tiene la apariencia de hojuelas de maíz empalmadas entre ellas dando la apariencia de una estructura esponjosa. La Figura 5.4(C) fue tomada a una amplificación de 20,000x, muestra que el material a escala micrométrica esta compuesto de pequeñas esferas distribuidas uniformemente sobre las hojuelas que se aprecian.

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

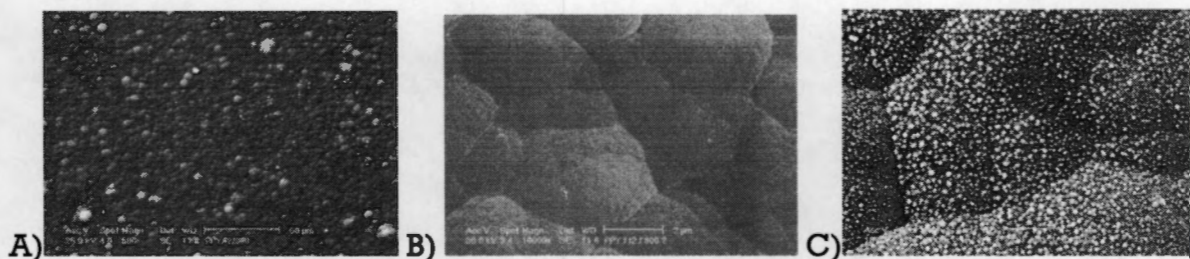


Figura 5.4 Microfotografía SEM de PPY/I 500x (A), 10,000x (B) y 20,000x (C)

Con las microfotografías laterales (Figura 5.5) podemos apreciar que el espesor de la película es de aproximadamente $2.5\mu\text{m}$ y que el material no es poroso con los parámetros de reacción empleados.

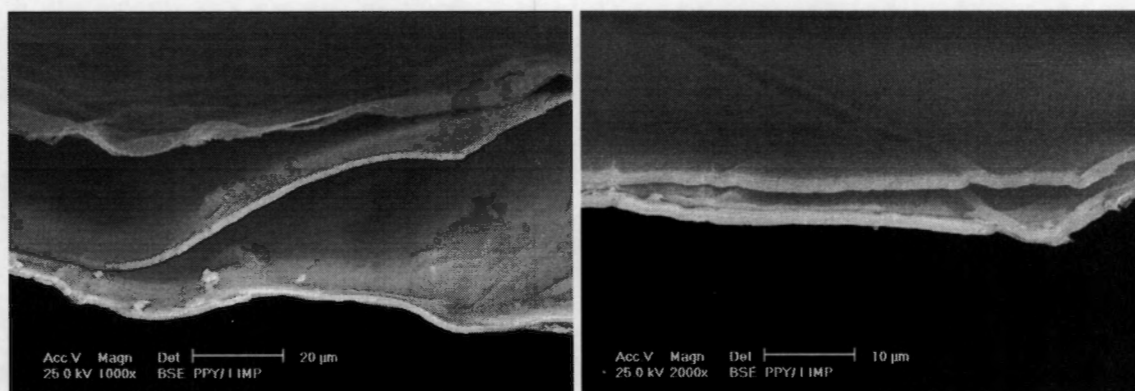


Figura 5.5 Microfotografías laterales SEM a) 1;000x y b) 2;000x

5.2. Tomografía axial computarizada

Los estudios son obtenidos con un formato electrónico propio del tomógrafo y se extraen de éste por una conexión de protocolo FTP (*File Transfer Protocol*). Posteriormente son transformados a formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*), para poder analizarse con herramientas especializadas, para este trabajo se empleó el programa libre OSIRIX.

Para realizar el análisis de los estudios tomográficos sin algún tipo de procesamiento digital de imágenes (Figura 5.6) es necesario tener un ojo bien entrenado debido a la similitud en los tonos de grises asignados a los coeficientes de absorción, aun reduciendo la ventana de visión buscando un mayor contraste entre los tejidos de interés.

Como se puede apreciar en la Figura 5.6 se alcanza a distinguir las costillas y el disco vertebral en color blanco, no se puede identificar a simple ojo los tejidos y mucho menos se pueden apreciar detalles en la zona interna del disco vertebral, médula espinal.

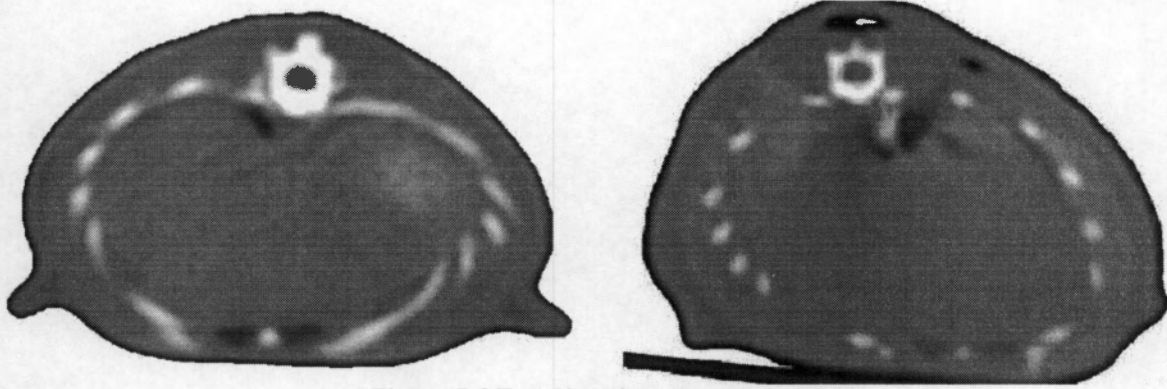


Figura 5.6 Estudios sin procesamiento

5.2.1. Coeficiente de absorción de PPy/I y médula espinal.

Como primer tarea se debe determinar el coeficiente de absorción de Hounsfield del PPy/I, el intervalo de la escala de Hounsfield va de +1000 para el hueso, pasando por 0 para el agua y hasta -1000 para el aire.

Se determino empíricamente el coeficiente de absorción (mediante toma de muestras y obtención del promedio) para el PPy/I en la escala de Hounsfield con un valor de 80 ± 20 , siendo este un valor próximo al del tejido nervioso de 22-46 (materia gris 36-46 y materia blanca 22-32).

Así mismo se empleo la herramienta Osirix para determinar los coeficientes de absorción basado en los datos almacenados en formato DICOM.

En la Figura 5.7 se muestra un estudio de TAC enfocado en la columna vertebral (disco vertebral) y dentro del canal vertebral se puede apreciar la médula espinal (ovalo) segmentada con Osirix, también se presentan la media muestral de **26.833**, la desviación estándar muestral de **13.678** con coeficiente de absorción mínimo **5** y máximo **58**, estos datos son obtenidos de acuerdo a los coeficientes de absorción que se encuentran en al archivo DICOM. El valor de la media concuerda con el coeficiente de absorción teórico definido para el tejido nervioso.

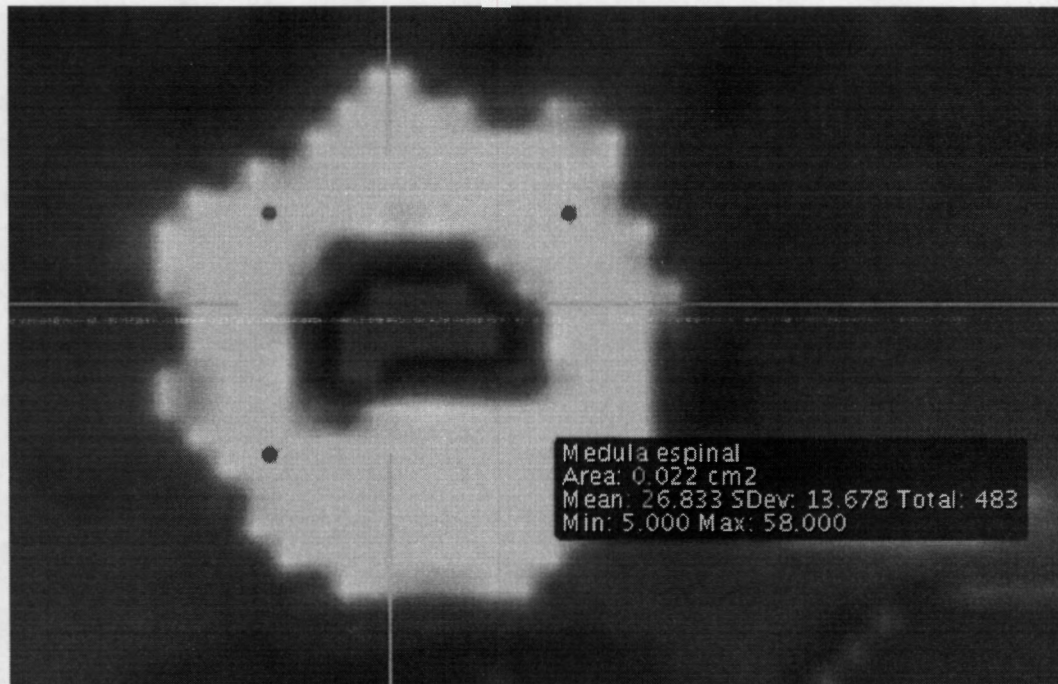


Figura 5.7 Estudio TAC de columna vertebral muestra los coeficientes de absorción de la médula espinal.

La segmentación de la médula espinal en zona de laminectomía es mostrada en la Figura 5.8, se aprecia la laminectomía (disco quebrado por la lesión, en forma de media luna) y a través del espacio vertebral la médula espinal, se obtiene la medición de los coeficientes de absorción en este caso, registrando la media muestral de **37.7**, la desviación estándar muestral de **15.536** con coeficiente de absorción mínimo **12** y máximo **60**.

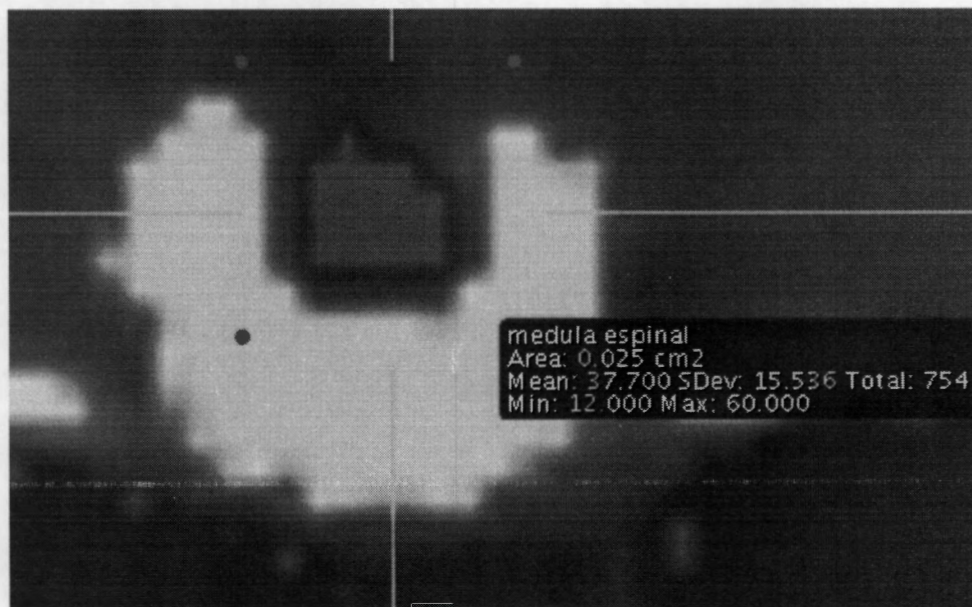


Figura 5.8 Estudio TAC de laminectomía muestra los coeficientes de absorción de la médula espinal en zona de lesión segmentados con Osirix.

La Figura 5.9 muestra un estudio TAC de médula espinal con LPSCME e implante de PPY/I, se puede apreciar el disco vertebral roto debido al procedimiento de laminectomía (en forma de media luna) y en espacio intervertebral se encuentra el implante (ovalado). En la Figura 5.10 se muestra la misma imagen segmentada con OSIRIX en la zona del implante, dentro del área seleccionada la media muestral de **80.875**, la desviación estándar muestral de **26.371** con coeficiente de absorción mínimo **52** y máximo **139**. Así también calculamos el intervalo de confianza (**75.70637898, 86.04362102**) con un error admisible de **5.168621024**.

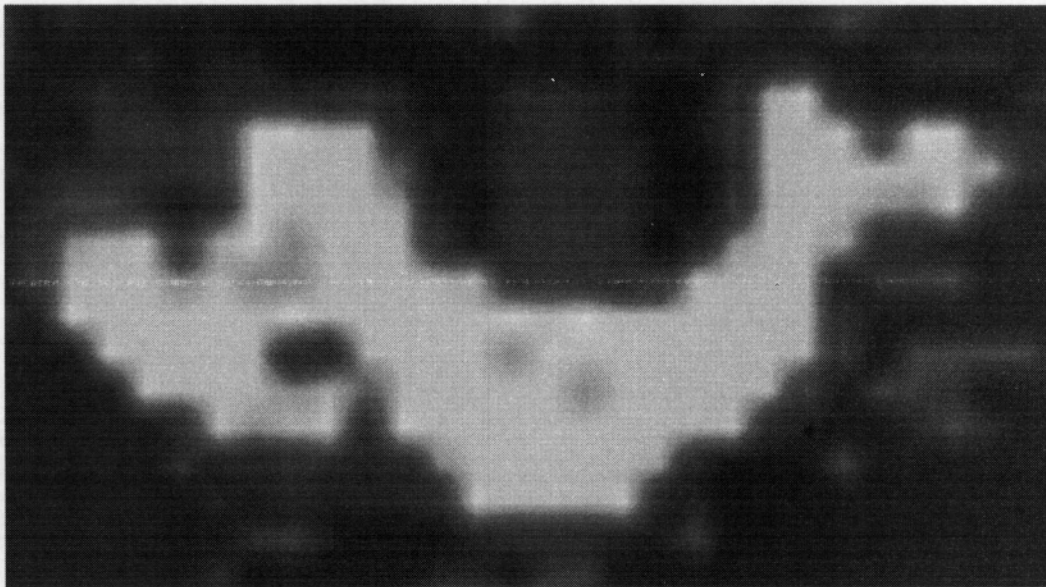


Figura 5.9 Estudio TAC de médula espinal de rata con LPSCME e implante de PPY/I.

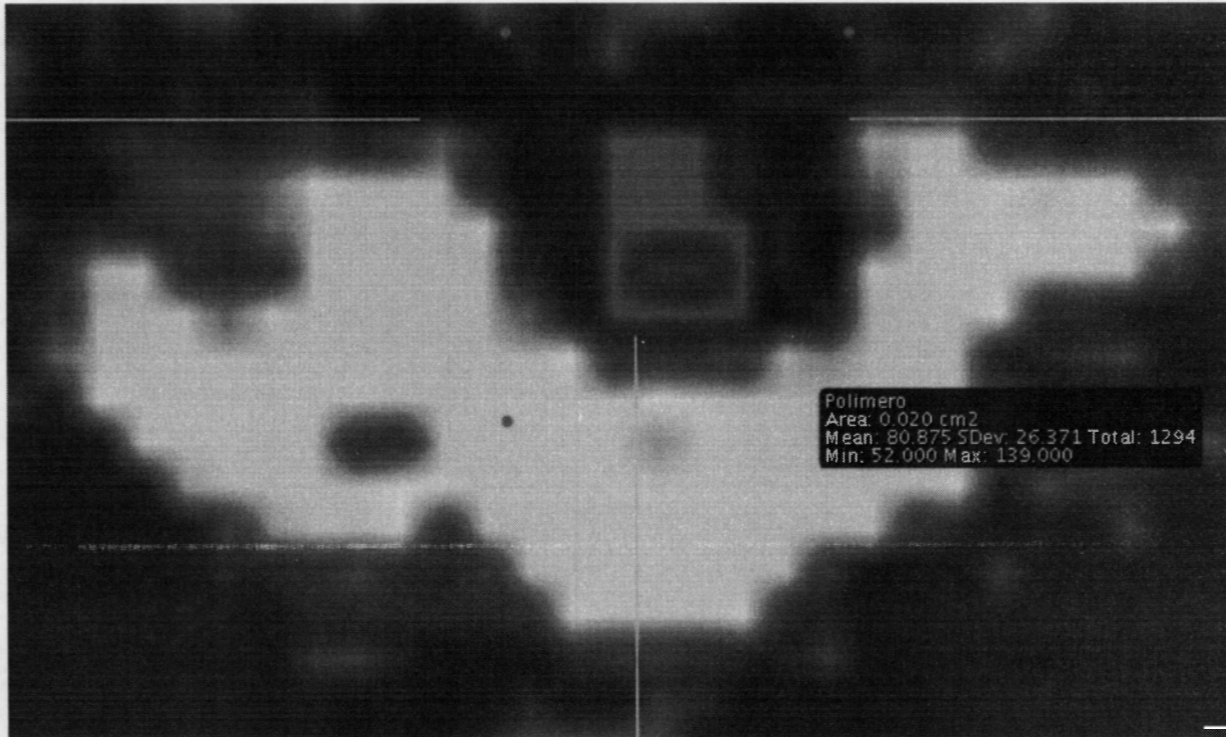


Figura 5.10 Segmentación del implante por la herramienta OSIRIX, para obtener los coeficientes de absorción del polímero.

5.2.2. Análisis de imágenes.

Con el programa OSIRIX, se busca destacar los rasgos de interés del estudio aplicando una tinción (color falso) en el rango de la escala de Hounsfield. De esta manera se destaca el tejido nervioso logrando un gran contraste entre el tejido nervioso y el hueso, Figura 5.11 y Figura 5.13. En la Figura 5.11 se puede distinguir las costillas y el disco vertebral en color blanco, además en la zona de la médula espinal se pueden distinguir dos colores más, azul y verde. Estos colores se pueden asociar con el tejido de la médula espinal y el material de implante. Se pueden distinguir otros tejidos, pero no se discuten aquí. Y es considerable la diferencia entre estudios que no tienen procesamiento alguno.

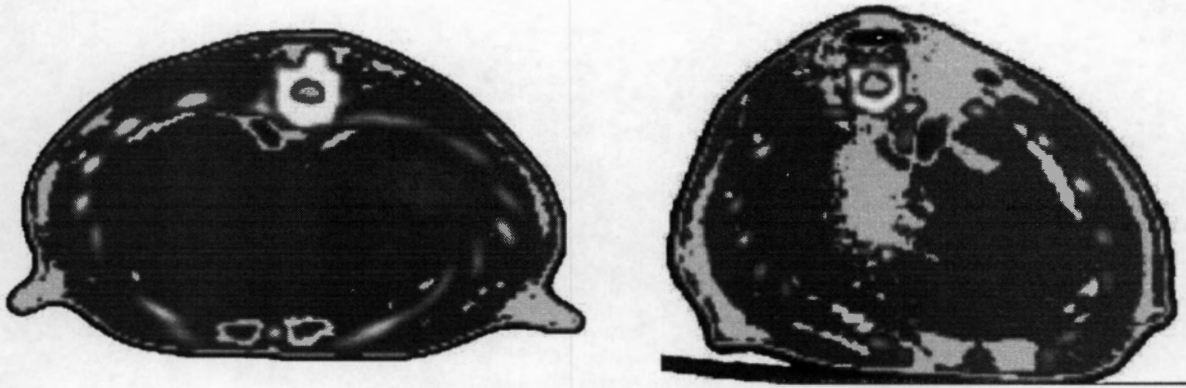


Figura 5.11 Estudios con color falso en tejido nervioso

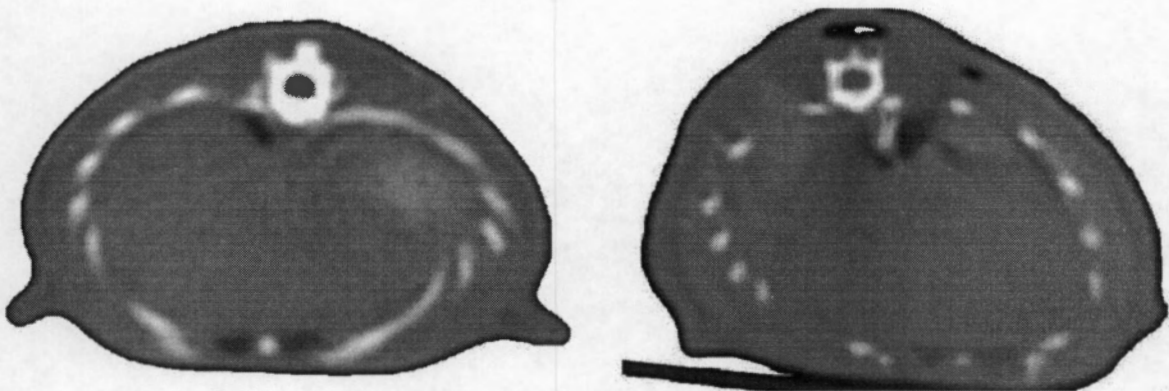


Figura 5.12 Estudios sin procesamiento

En la Figura 5.13 se muestra una ampliación de la zona del disco vertebral. Se puede apreciar que existe una clara definición en la ubicación del tejido nervioso, en medio de la zona del disco vertebral (circulo blanco), y se distinguen dos colores que en principio pueden asociarse a dos materiales diferentes (tejido nervioso, PPy/I).

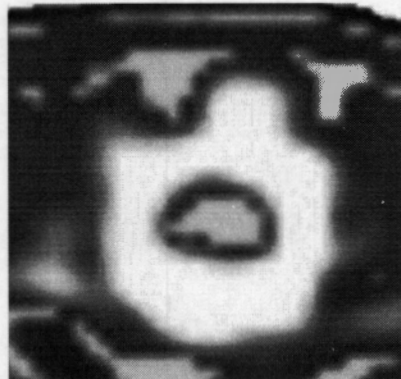


Figura 5.13 Ampliación: disco vertebral y tejido nervioso.

La cantidad de colores falsos aplicados depende de los tejidos que se interesan destacar como: tejido nerviosos y material implantado (Figura 5.14); hasta una cantidad de "n" diferentes tinciones posibles mostrado en la Figura 5.15. En la Figura 5.14 se muestra la zona de lesión, recordemos que el modelo de lesión por sección completa incluye el corte de las apófisis espinosas de T8 y T9. Como se aprecia en la Figura 5.14 falta la parte superior del disco vertebral, por eso estamos viendo la zona lesionada y podemos distinguir el tejido de la médula espinal y parte del material implantado.

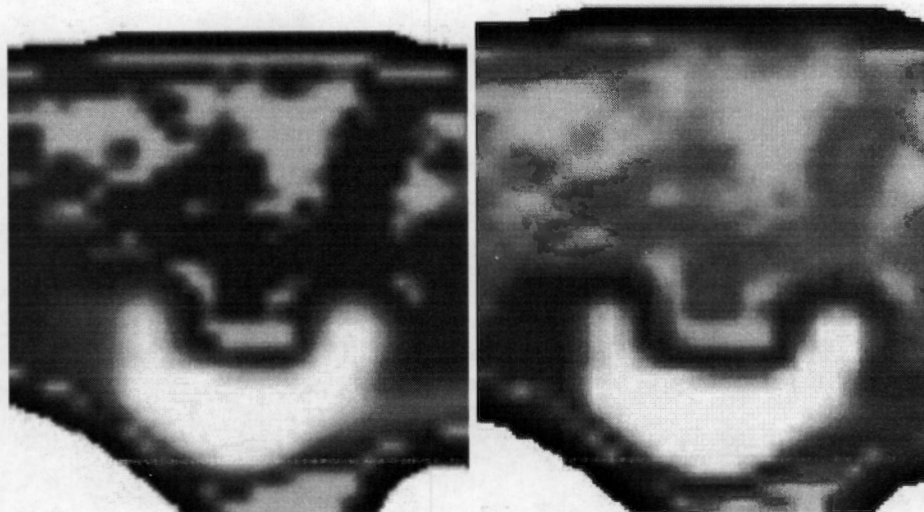


Figura 5.14 Tinción en zona de lesión.

La Figura 5.15 muestra un corte tomográfico con "n" tinciones. En la imagen se puede apreciar diversos colores y tonos. Se puede distinguir hueso, material implantado (PPy/I), capa de piel, grasa, etc.

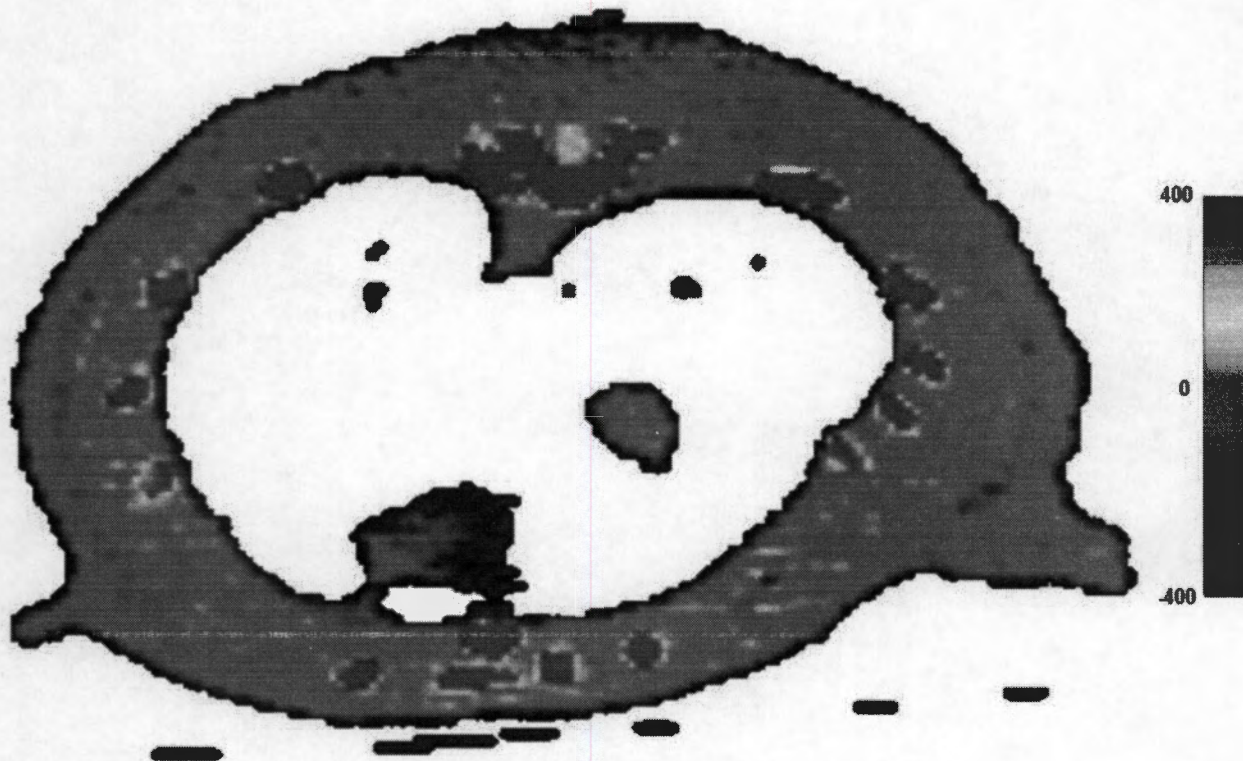


Figura 5.15 "n" colores falsos aplicados

El estudio de tomografía consiste en la secuencia de diferentes cortes tomográficos que avanzan en una dirección determinada, hay una separación de 0.2mm entre cada corte. Con las secuencias de los cortes tomográficos se obtiene información de diferentes zonas de la lesión, por ejemplo, en la Figura 5.16 se muestran cortes obtenidos de un animal del grupo Control a 5 semanas de la intervención quirúrgica: antes del epicentro de la zona de lesión (3.6mm antes), al inicio de la laminectomía (3.2mm del epicentro de lesión), se determina la extensión de la laminectomía para este espécimen, que fue de 6.6mm. En la fotografía central se muestra el epicentro de la lesión, se puede apreciar que no hay apófisis espinosa y una mancha disgregada del tejido medular. Se muestran cortes obtenidos al final de está (3.4mm después del epicentro) y a 4mm del epicentro de la lesión se observa la presencia normal de tejido nervioso y el disco vertebral completo.

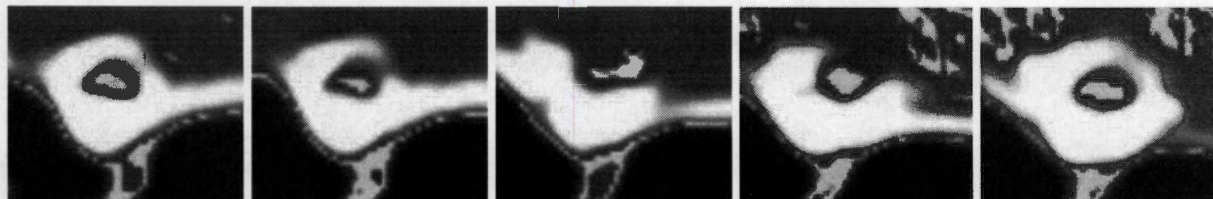


Figura 5.16 Imágenes a diferente distancia del epicentro de lesión -3.6mm, -3.2mm, 0, 3.4mm y 4mm respectivamente

5.3. Estudio histológico

Al término de los experimentos se contó con histologías correspondientes a cada semana de progresión (1 a 8 semanas) de sujetos independientes. Donde es posible distinguir, en los animales del grupo PPy/I, el grado de fragmentación del implante de polímero. Mientras que en los pertenecientes al grupo Control es clara la evolución de los quistes generados en el tejido nervioso.

La Figura 5.17 muestra la pastilla a la primera semana de haber sido implantada y es posible distinguir la pastilla casi en su totalidad, se aprecian pequeños espacios vacíos y tejido medular que se va extendiendo a través del implante.

La Figura 5.18 nos muestra la evolución de la fragmentación de la pastilla implantada a cuatro semanas después de la lesión, se aprecian mayor cantidad de huecos, que al incrementarse en tamaño provocan que el material no se mantenga en su lugar a la hora de realizar el corte con el microtomo, dando lugar al espacio vacío en el centro del implante. Por último, en la Figura 5.19, correspondiente a ocho semanas después de la lesión, se observa un gran espacio vacío en el centro del implante, atribuido a la incapacidad de mantenerse unido al momento de realizar el corte debido a la fragmentación del material. Inclusive es posible ver material esparcido sobre la muestra en la zona inferior de la fotografía que es material desplazado por la técnica. En las tres figuras anteriormente descritas, se puede apreciar la conservación de la citoarquitectura de la médula espinal. Se observa que no hay mucha destrucción de tejido y la formación de quistes es pequeña. El implante de PPy/I esta impidiendo que los mecanismos de daño secundario sean devastadores en esta zona, actuando como neuroprotector.

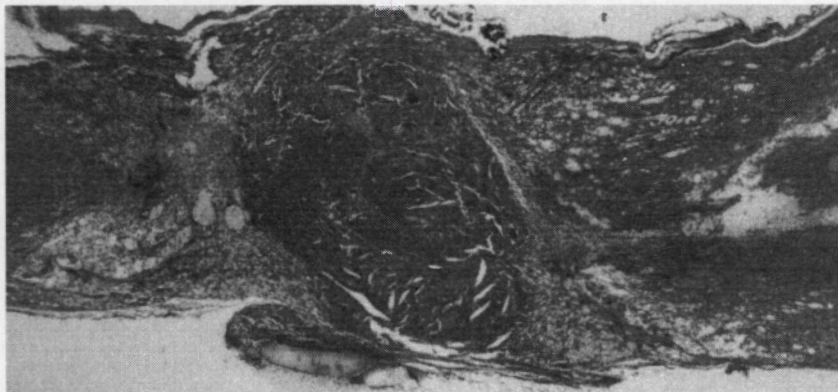


Figura 5.17 Corte histológico a la médula espinal con implante a una semana de evolución.

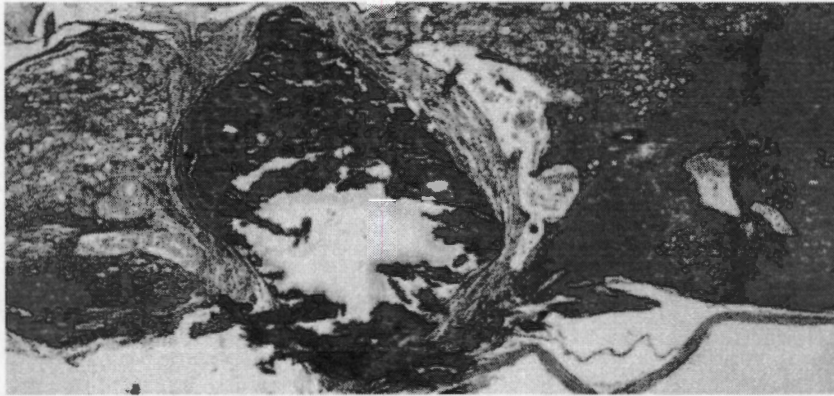


Figura 5.18 Corte histológico a la médula espinal con implante a cuatro semanas de la lesión.

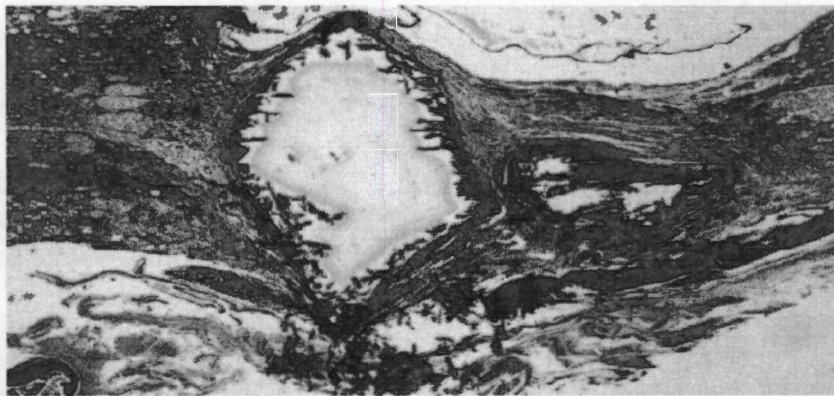


Figura 5.19 Corte histológico a la médula espinal con implante a ocho semanas de evolución.

Para los animales del grupo control, la Figura 5.20 muestra la fotografía de la histología perteneciente al sujeto con 1 semana post trauma, la citoarquitectura de la médula espinal fue destruida, característica debido a la lesión, se aprecia la generación de espacios vacíos alrededor del epicentro de lesión, lugar donde la citoarquitectura se encuentra más dañada, la existencia de estos pequeños espacios vacíos se extiende en dirección caudal y cefálica.

Posteriormente en la fotografía de un espécimen con 4 semanas de evolución (Figura 5.21), se observa la existencia de quistes bien definidos y de mayor dimensión así como la destrucción completa de la citoarquitectura de la médula espinal en el epicentro de lesión. Por último en la histología a 8 semanas del trauma, se observa la presencia de un quiste de gran tamaño extendido bilateralmente respecto al epicentro de la lesión, Figura 5.22.

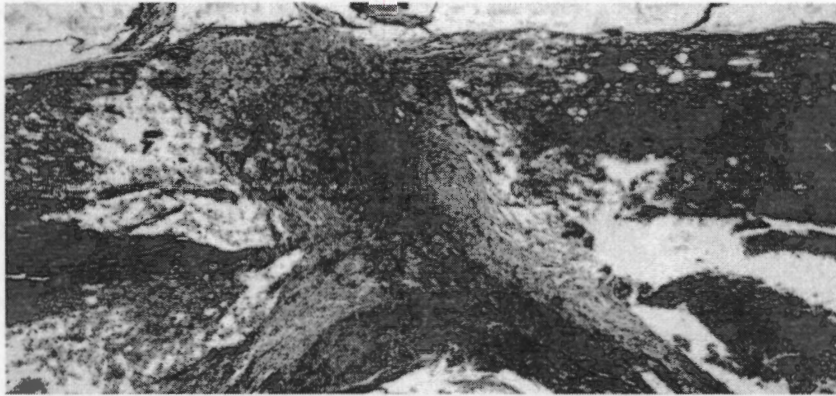


Figura 5.20 Corte histológico a la médula espinal grupo control a una semana de evolución.

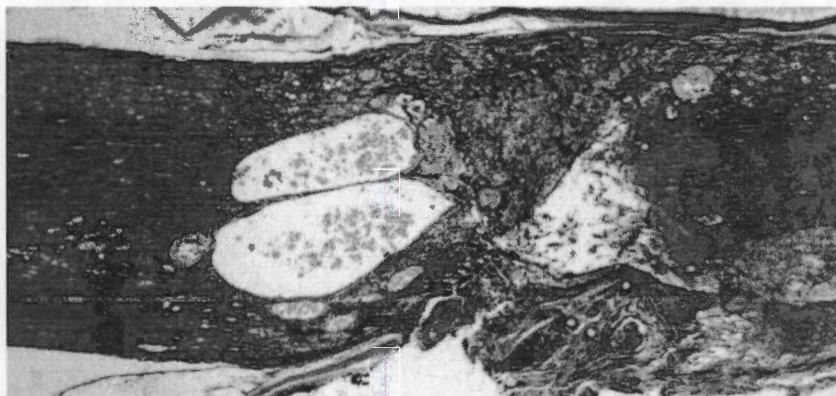


Figura 5.21 Corte histológico a la médula espinal grupo control, cuatro semanas post lesión.

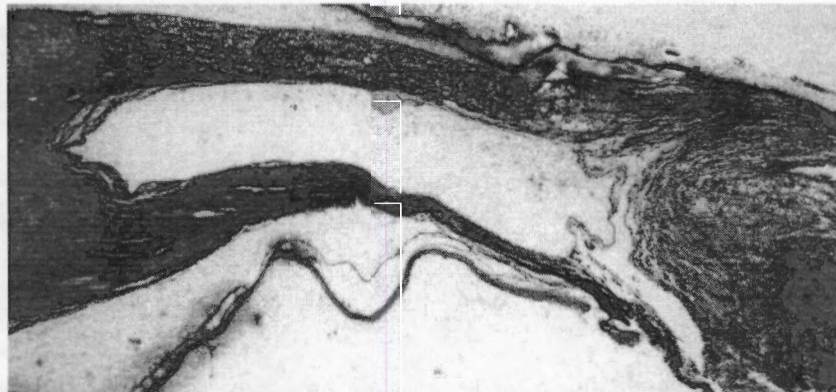


Figura 5.22 Corte histológico a la médula espinal grupo control con ocho semanas de evolución.

Cabe mencionar que la respuesta del organismo aquí mostrado para ambos grupos (Control y PPy/I) no es la única, esto debido a la gran cantidad de factores que intervienen en la respuesta al trauma, en este caso se sigue esa tendencia enfocada a la integridad del tejido y el implante que son los rasgos de interés en este trabajo.

A continuación se presenta una muestra de las fotografías histológicas (Figura 5.23 hasta la Figura 5.29) tomadas a cada rata, correspondientes a partir de la primer semana para los dos grupos de estudio (PPy/I y Control).

De forma general, la comparación de las histologías entre ambos grupos se observan diferencias trascendentales. El grupo con PPy/I muestra el implante integrado en la médula espinal. Se muestra mayor conservación de la citoarquitectura de la médula espinal y se observa que hay células nerviosas alrededor y entre los fragmentos de PPy/I. Inclusive es posible seguir caminos de células que sugieren la conexión de la médula espinal a través del implante. En el grupo control se observa una gran barrera física generada por los quistes, la cual impide la comunicación de los extremos de la lesión medular. Se aprecia también una destrucción significativa de la citoarquitectura medular.

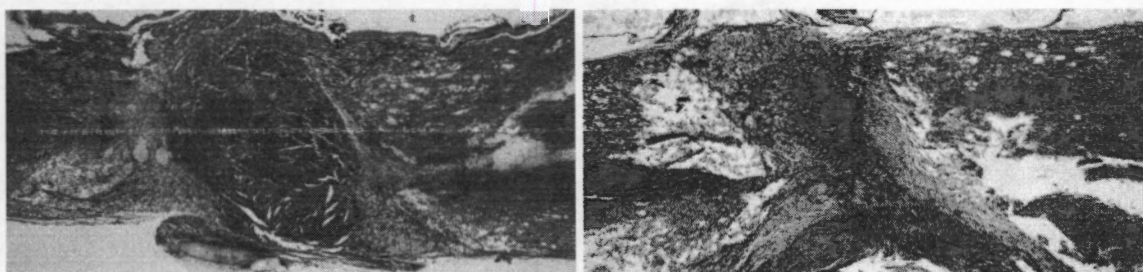


Figura 5.23 Histologías, primer semana

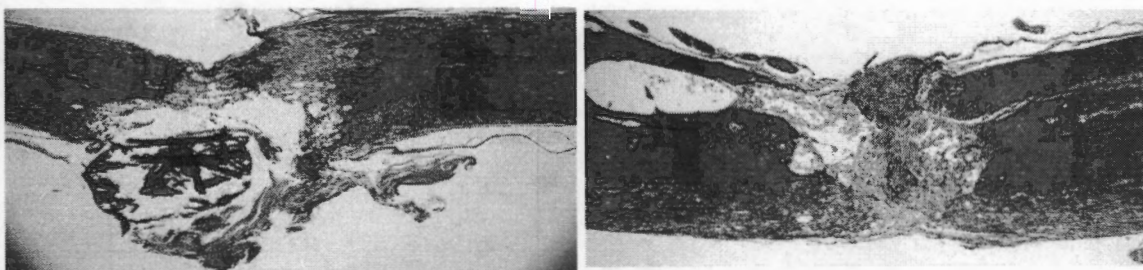


Figura 5.24 Histologías, segunda semana

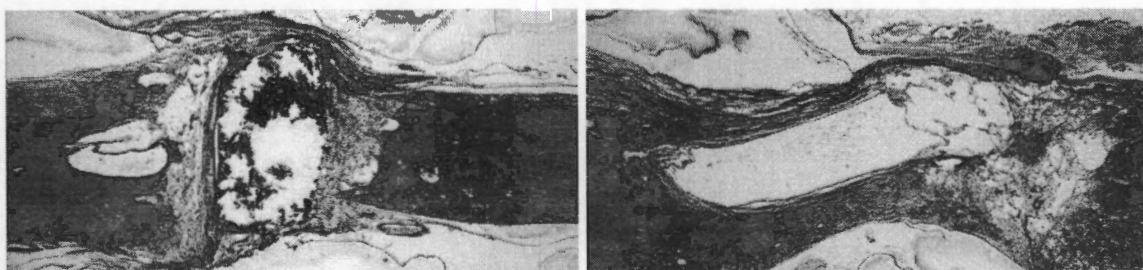


Figura 5.25 Histologías, tercer semana

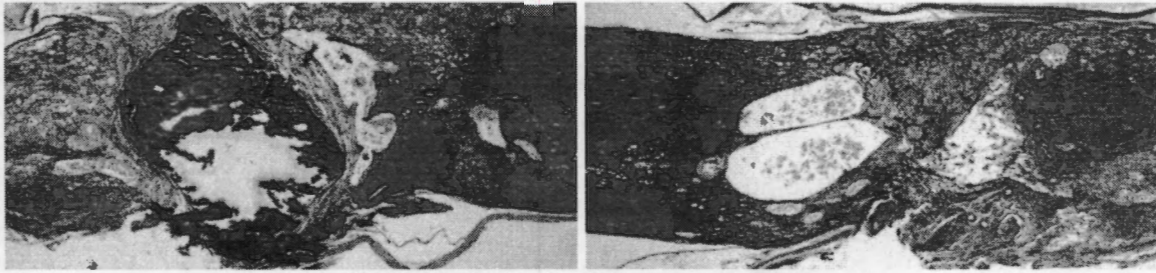


Figura 5.26 Histologías, cuarta semana

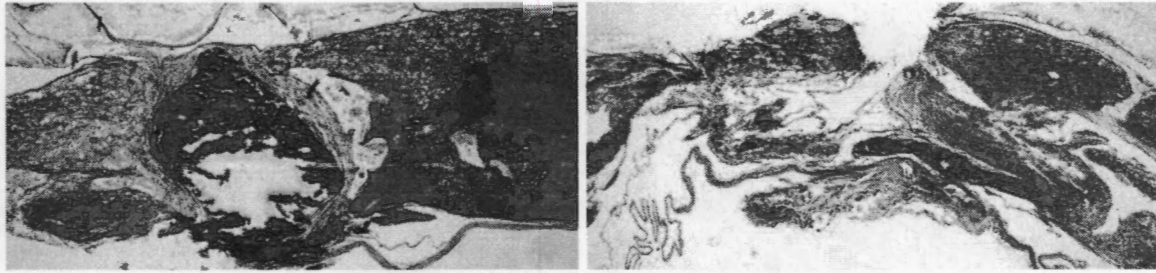


Figura 5.27 Histologías, quinta semana

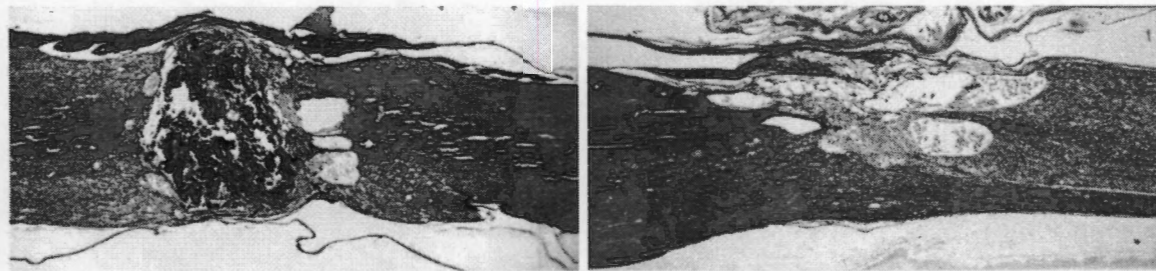


Figura 5.28 Histologías, sexta semana

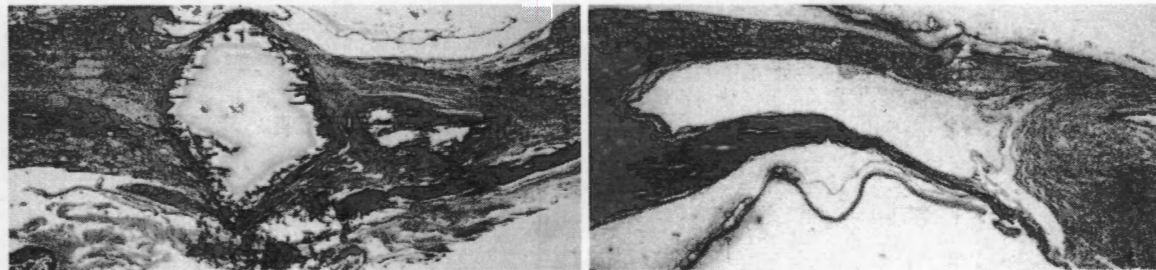


Figura 5.29 Histologías, octava semana

5.3.1. Morfometría

Para la medición de rasgos de las histologías, se incluyen solo algunas que se determinaron significativas. Con estas mediciones se determina una aproximación de datos interesantes como la preservación de material, la existencia de quistes, la cantidad de material presente en el corte histológico así como la cantidad de tejido fibroso, resultado de la lesión.

En la Figura 5.30 se muestra la imagen de la histología de un espécimen con una semana post lesión y los rasgos calculados para esta histología son: tejido preservado 0.038cm^2 (24%), tejido fibroso 0.082cm^2 (52%), quistes existentes 0.036cm^2 (23%).

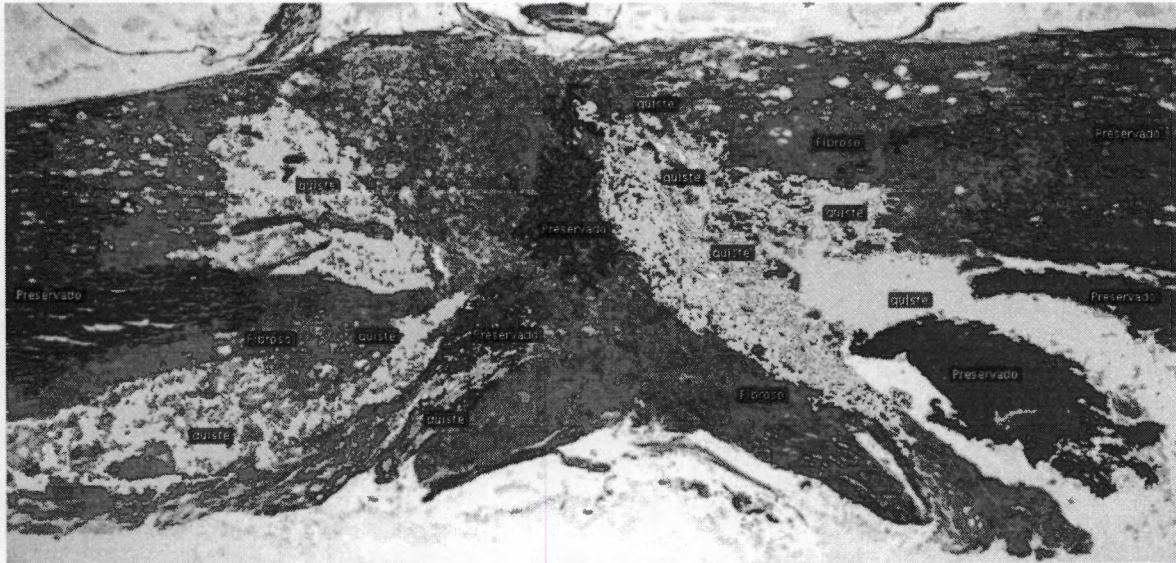


Figura 5.30 Histología control con a una semana post lesión, segmentada para morfometría.

La histología segmentada para un sujeto del grupo PPy/I con una semana de rehabilitación es mostrada en la Figura 5.30, donde podemos apreciar la presencia de la pastilla del polímero semiconductor, para esta segmentación los rasgos morfométricos son: PPy/I 0.020cm^2 (15.6%), tejido preservado 0.045cm^2 (34.2%), tejido fibroso 0.063cm^2 (47.6%) y quistes existentes 0.003cm^2 (2.5%).

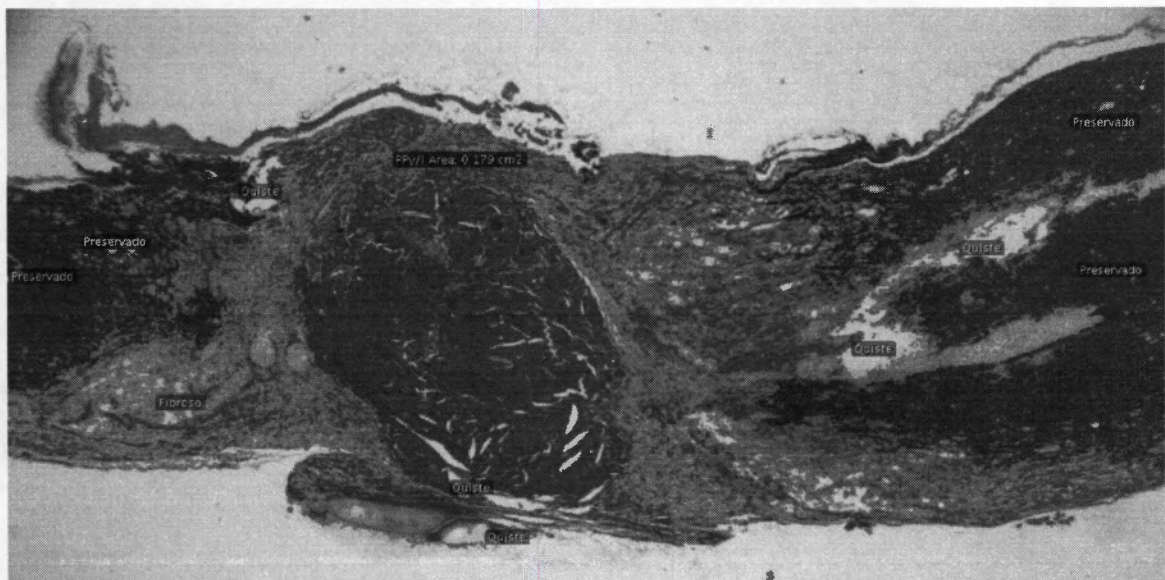


Figura 5.31 Histología grupo PPy/I con una semana de rehabilitación, segmentada para determinar rasgos característicos.

La Figura 5.32 presenta la segmentación para una histología de un animal del grupo control con ocho semanas de recuperación, determinando los siguientes valores: tejido preservado 0.026cm^2 (18.62%), tejido fibroso 0.074cm^2 (51.43%) y quistes existentes 0.043cm^2 (29.94%).

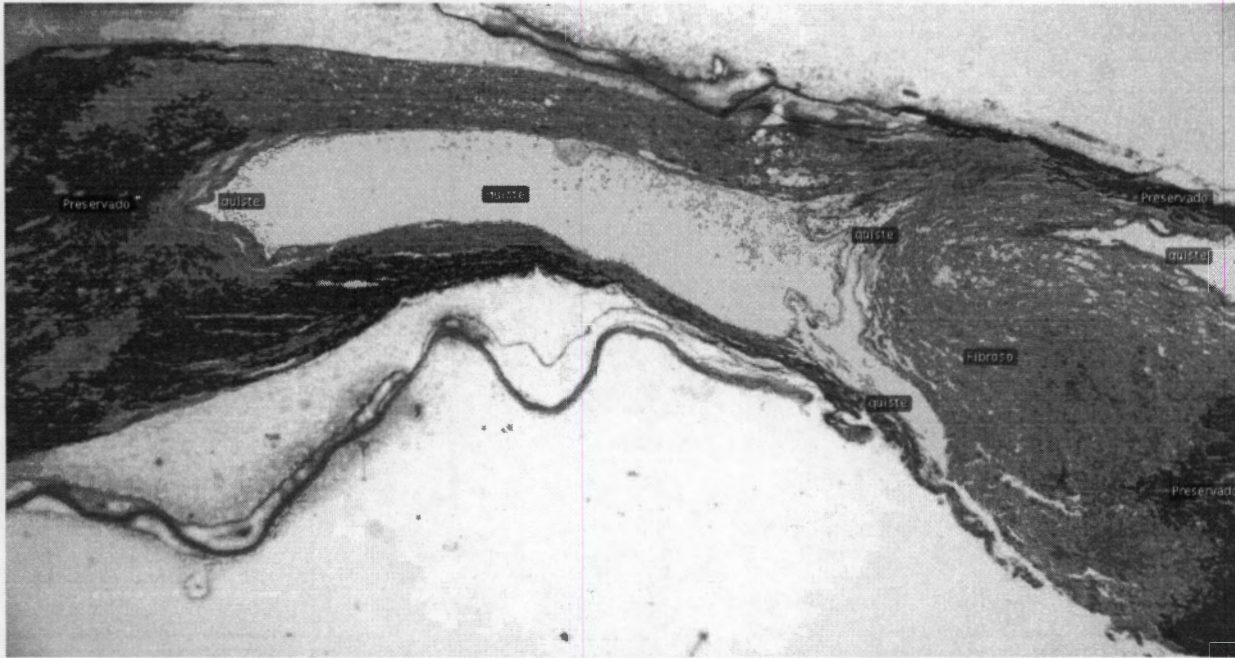


Figura 5.32 Histología control octava semana post lesión, segmentada para morfometría.

Los rasgos segmentados para un espécimen del grupo PPy/I a ocho semanas después de la lesión se muestran en la Figura 5.33 y los valores obtenidos son: PPy/I 0.024cm^2 (18.01%), tejido preservado 0.024cm^2 (18.15%), tejido fibroso 0.074cm^2 (54.47%) y quistes existentes 0.012cm^2 (9.34%).

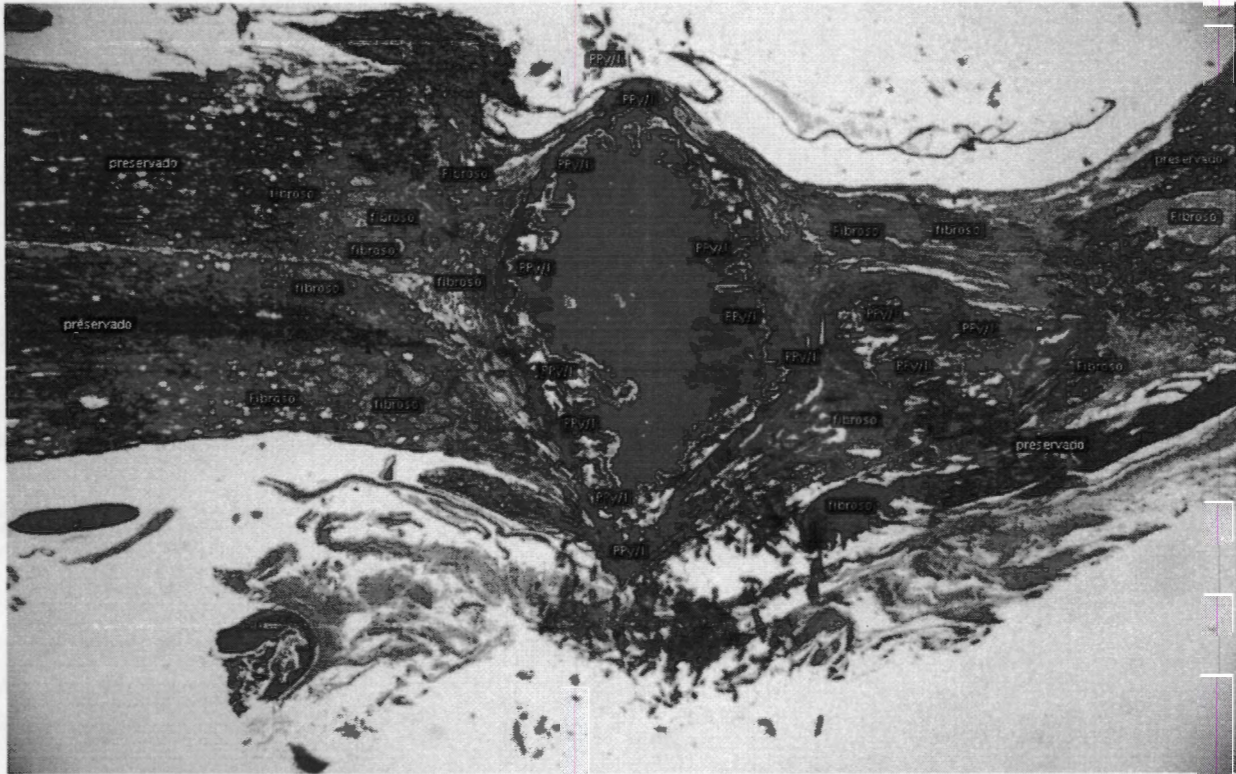


Figura 5.33 Histología grupo PPy/I con ocho semanas de rehabilitación, segmentada para determinar rasgos característicos, centro relleno como polímero, se asume que se pierde ese polímero durante la técnica histológica.

5.4. Reconstrucciones tridimensionales

Nota: Las reconstrucciones tridimensionales que en el presente trabajo se muestran, se pueden visualizar con el programa "QuickTime", dichas reconstrucciones se encuentran en la carpeta "3D" con el nombre de archivo correspondiente al número de la figura (Figura3-31.mov por ejemplo) anexo a esta tesis.

La secuencia de imágenes del estudio tomográfico permite su manipulación con el programa OSIRIX y crear reconstrucciones tridimensionales de la zona lesionada en las ratas estudiadas. En las reconstrucciones 3D se busca facilitar la observación de características como la posición del material (Figura 5.34), nivel del procedimiento de laminectomía (Figura 5.35), existencia de quistes y preservación de tejido nervioso (Figura 5.36).

La reconstrucción 3D que se muestra en la Figura 5.34 se realizó con 10 rebanadas tomadas con un campo de visión de 180mm, una densidad de corriente de 300mAs y un potencial de 120kV. La distancia de cada rebanada es de 1mm y con OSIRIX se realiza la interpolación de las imágenes para generar la reconstrucción 3D. En esta posición la Figura 5.34 muestra el espacio existente entre los discos vertebrales

donde se encuentra alojada la médula espinal. Al interior de este espacio, en color azul, se encuentra el polímero implantado.



Figura 5.34 Reconstrucción 3D con implante

La Figura 5.35 muestra en detalle la columna vertebral a la altura de las vértebras T7, T8, T9 y T10. Se observa como faltan las apófisis espinosas extirpadas durante la laminectomía de los discos vertebrales T8 y T9, punto donde se realizó la sección por sección completa de la médula espinal y la inserción del implante PPy/I.

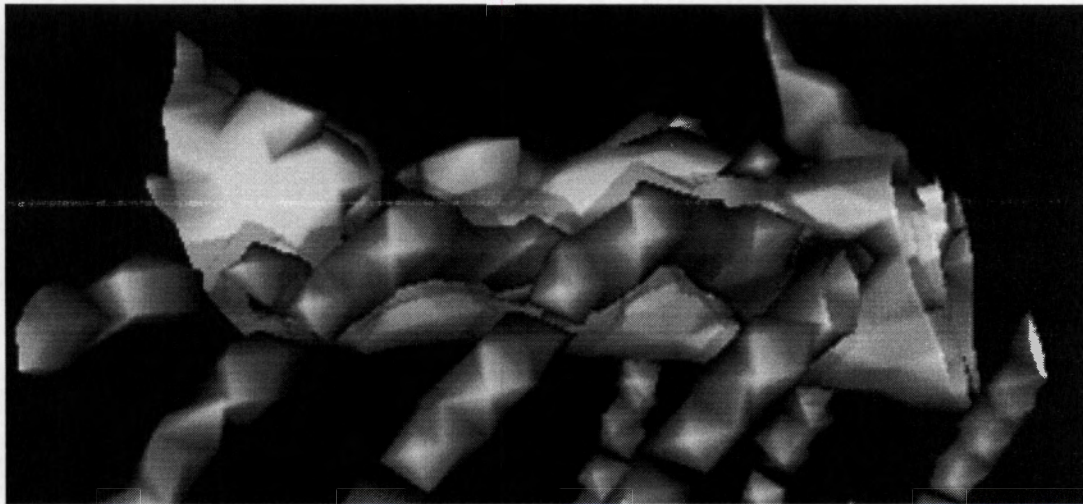


Figura 5.35 Imagen 3D extensión de la laminectomía

En la siguiente figura (Figura 5.36) se muestra el acercamiento a la zona donde se encuentra alojada la médula espinal, en color rojo se distingue el disco vertebral y en el centro la médula espinal, color azul. No se aprecia deterioro medular, ya que es una zona en la que no sufrió daño con el modelo se lesión.

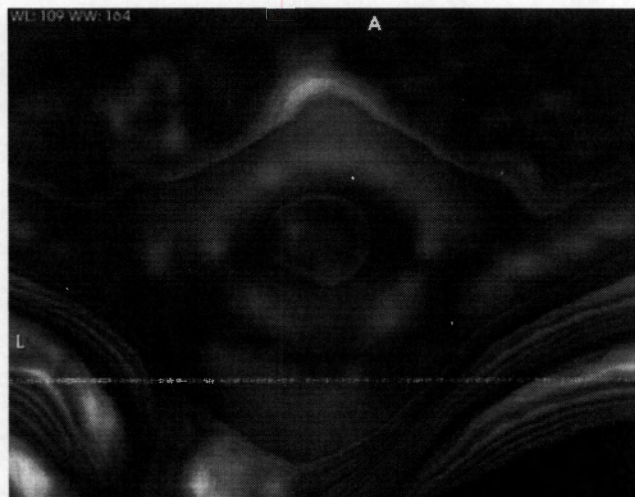


Figura 5.36 Imagen 3D anterior a la laminectomía con tejido preservado

5.5. Tomografía e histología

Con ayuda de los estudios tomográficos procesados y las reconstrucciones tridimensionales es posible determinar una relación entre los estudios obtenidos con la Tomografía Axial Computarizada y las fotografías de las histologías obtenidas.

5.5.1. Grupo PPy/I

La Figura 5.37 muestra un acercamiento a la zona lesionada. Se puede apreciar la ausencia de la apófisis espinosas correspondiente, La imagen de la izquierda corresponde a una rata con implante PPy/I a 4hrs después del procedimiento quirúrgico, se aprecia la pastilla de polímero completa y compactada en la parte central del canal vertebral donde debería estar la médula espinal. La figura del lado derecho presenta los estudios correspondientes a 4 semanas de recuperación, donde es posible apreciar una disgregación del material, de acuerdo a la diferencia de superficie determinada por los estudios tomográficos entre diferentes etapas post lesión.

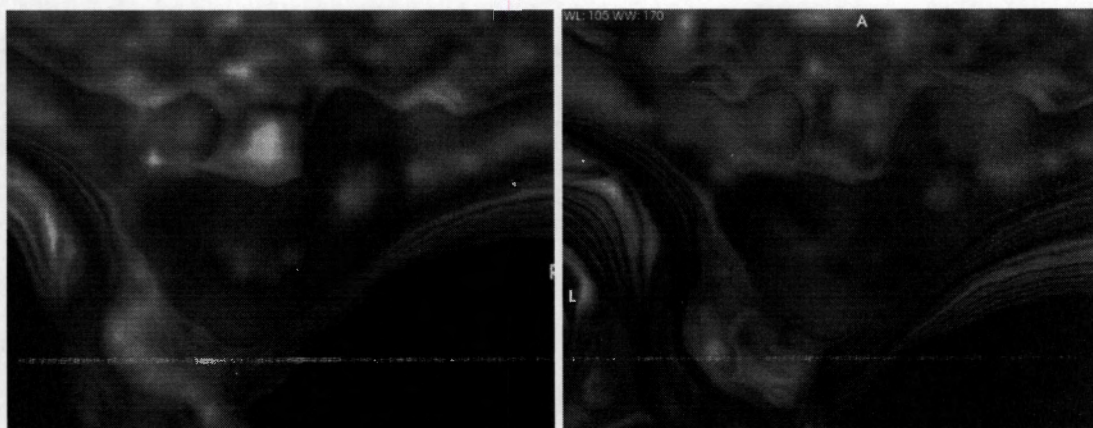


Figura 5.37 Imagen 3D del implante PPy/I a 4hrs post-lesión y 4 semanas post-lesión

En la Figura 5.38 (izquierda) se muestra una fotografía de un corte histológico perteneciente a una rata del grupo PPy/I con cinco semanas de lesión. En la imagen de la derecha se muestra la reconstrucción longitudinal del canal vertebral. El canal vertebral se encuentra teñido en diversos colores mientras que el hueso, esta teñido en rojo. En la parte superior izquierda de la imagen, hay un espacio sin hueso (sin apófisis espinosa) y se encuentra coloreado en azul, debajo de este punto se aprecia una forma pintada de color verde, la cual corresponde al material, que no ha sido disgregado en el organismo, ya que se observo en los especímenes implantados que al fragmentarse el implante el estudio no obtiene información del polímero.

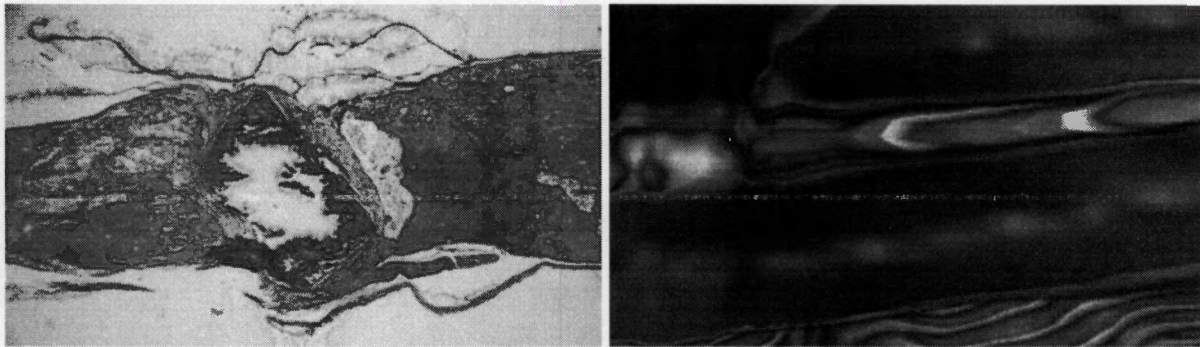


Figura 5.38 Prueba histológica y reconstrucción de la zona de lesión grupo PPy/I

5.5.2. Grupo control

En los especímenes del grupo control se analiza la existencia de quistes, recordando que es de fundamental importancia para la recuperación funcional su formación o no. En la Figura 5.39 es posible ver la ubicación de un quiste en la zona de lesión (zona negra en la región central, adjunta a una zona de espacio vacío sobre la lesión), se muestra la prueba histológica (Figura 5.39) correspondiente al mismo espécimen, también se agregan la reconstrucción 3D (Figura 5.40, izquierda) para su mejor percepción y se aprecia la expansión del quiste bilateralmente del epicentro de lesión inclusive donde ya hay discos vertebrales(Figura 5.40, derecha).

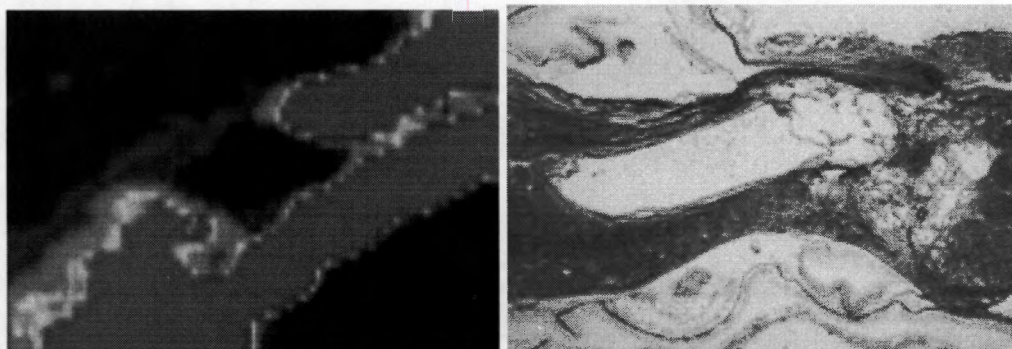


Figura 5.39 Reconstrucción ortogonal e histología en zona de lesión, grupo control

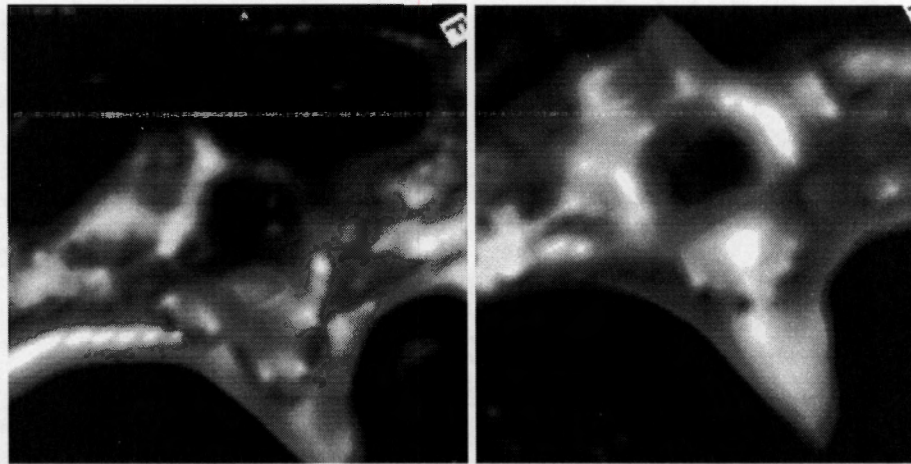


Figura 5.40 Reconstrucción 3D en zona de lesión y extensión del quiste del epicentro de lesión, grupo control

5.6. Capacidad de análisis con IRM en LPSCME e implante PPY/I.

A un animal perteneciente al grupo PPY/I con 4 semanas de recuperación se le realizó un proceso de perfusión cardiaca donde se extrajo una muestra de médula espinal de 2mm de diámetro y 2cm de longitud tomando como referencia la zona del implante (epicentro de lesión) y fue depositada en un contenedor con Formaldehído al 10 %.

A esta muestra se le realizó un estudio de Imagenología por resonancia magnética (Figura 5.41) con un sistema Bruker de 7T. Se emplearon secuencias estándar de gradientes de eco con los siguientes parámetros de adquisición: TE/TR=5/20ms, FOV=8x8cm, ángulo=20°, tamaño de matriz=128x128, NEX=2. Los estudios fueron obtenidos con formato JPG.

La Figura 5.41 muestra 2 IRM como las entrega el equipo, se puede distinguir (en A) la "H" característica de la médula espinal (materia gris) y la materia blanca. En B, se aprecia la zona de lesión, donde al no mantener la citoarquitectura de la médula se ve como están dispersas materia gris y materia blanca, así como la presencia del material implantado entre los tejidos nerviosos.

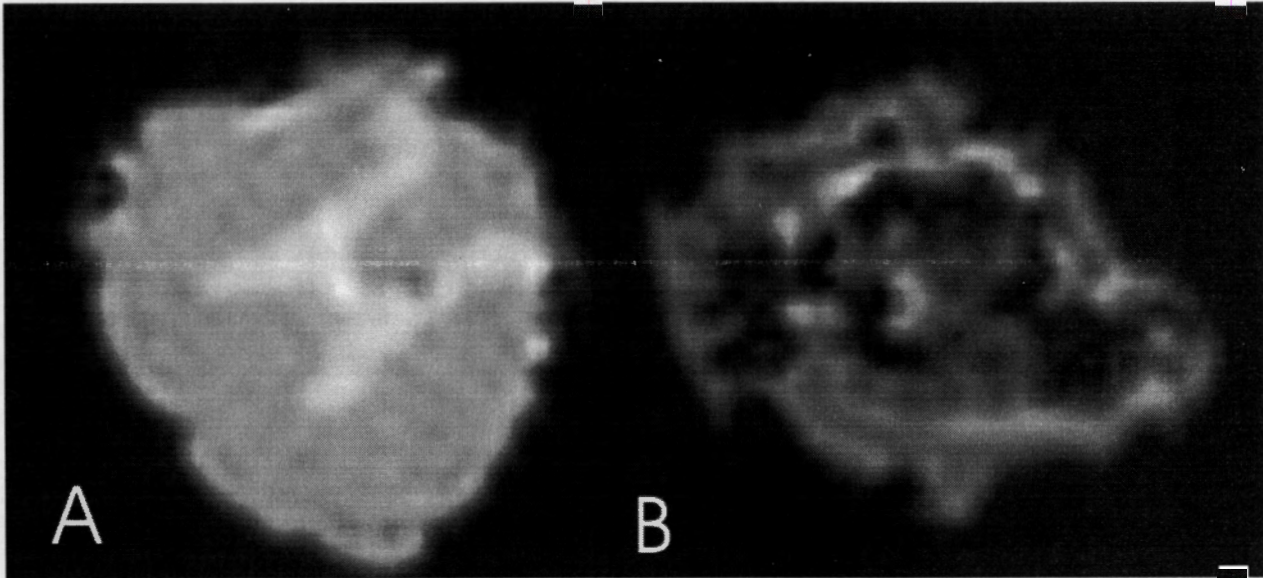


Figura 5.41 Imagen de resonancia magnética obtenida con los parámetros definidos.

El estudio de IRM se procesó con OSIRIX para su interpretación.

Con esta técnica se puede apreciar perfectamente la materia blanca y la materia gris, así como el material, espacios vacíos y quistes que son resultado de los efectos secundarios de lesión de la médula espinal.

En la Figura 5.42 podemos apreciar perfectamente la materia blanca y la materia gris, formando la "H" característica, muestra el estado de la médula espinal anterior y distante al epicentro de lesión, como se puede apreciar en la reconstrucción longitudinal (Figura 5.42, derecha). Que nos da una referencia espacial de la ubicación del corte que estamos observando (esquina superior izquierda).

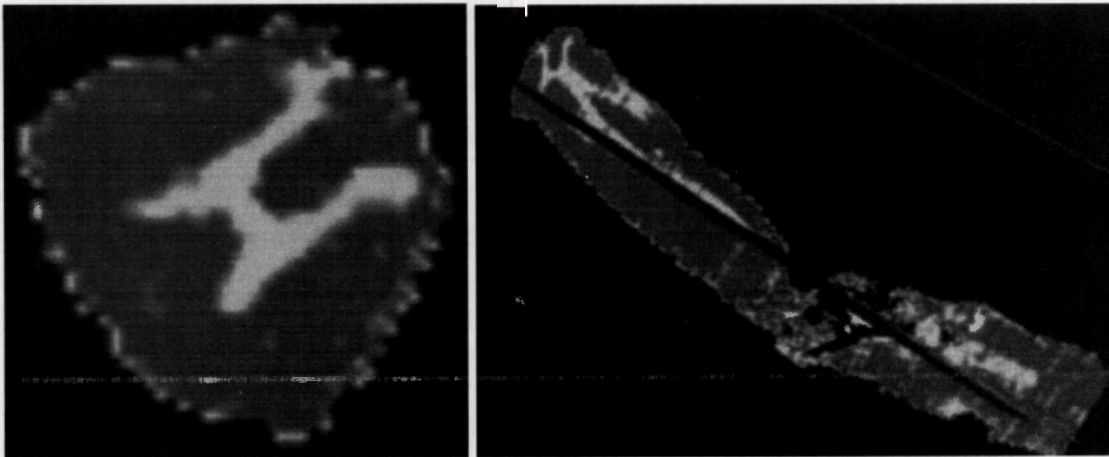


Figura 5.42 IRM de médula espinal tratada y ubicación del corte anterior a la zona de lesión.

A continuación se presenta una imagen de la reconstrucción 3D obtenida con 61 cortes de IRM. Donde se observa la citoarquitectura perfectamente conservada de la médula espinal, inclusive se puede apreciar las meninges cubriendo la médula espinal en color rojo.

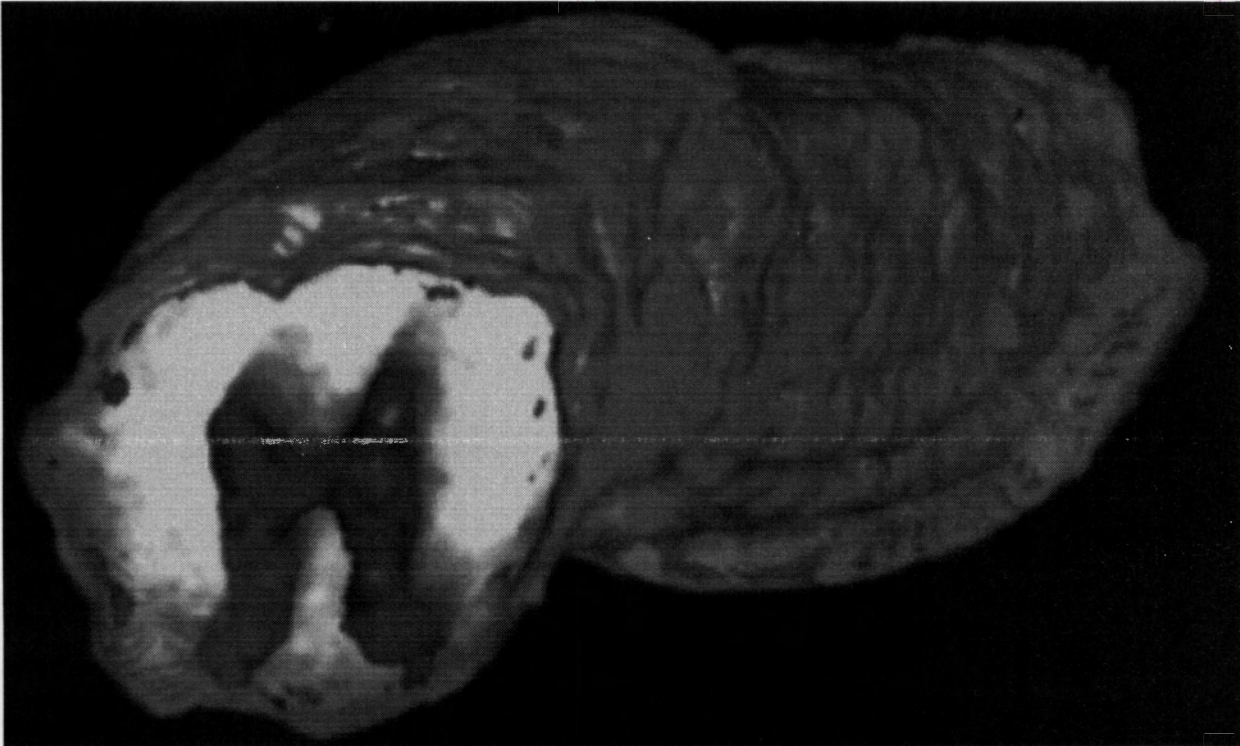


Figura 5.43 Reconstrucción 3D en la zona del corte de la Figura 3.36

Podemos observar en la Figura 5.44 antes de la zona de lesión donde se aprecia aun la citoarquitectura de la médula espinal bien definida y también la posibilidad de apreciar el canal endodistal, el cual permanece hueco en su interior y se encuentra en la parte central de la médula espinal. También se presenta la correspondiente reconstrucción longitudinal.

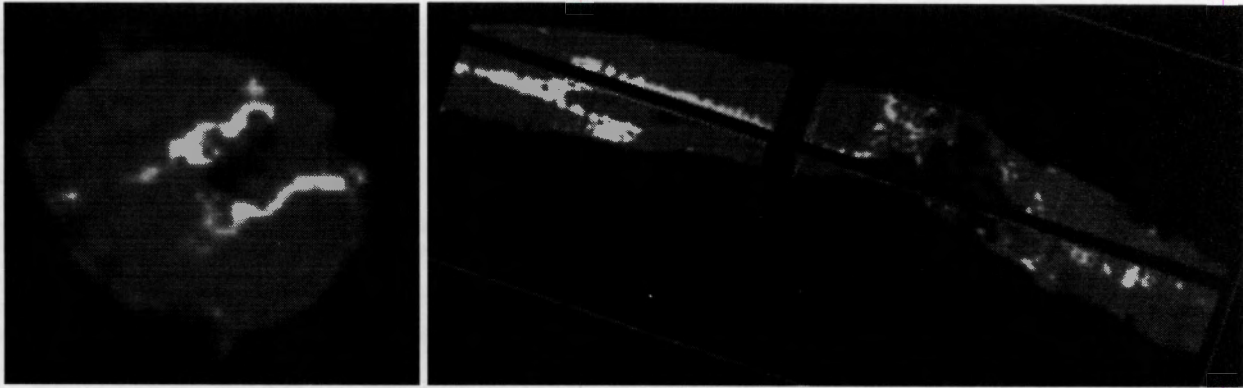


Figura 5.44 IRM al inicio de la zona de lesión, ubicación ortogonal.

En la reconstrucción 3D de esta zona, mostrada en la Figura 5.45 es sumamente claro la capacidad de poder visualizar la preservación de la médula espinal. Así como el canal endoneural teñido en rojo, al centro de la médula espinal.

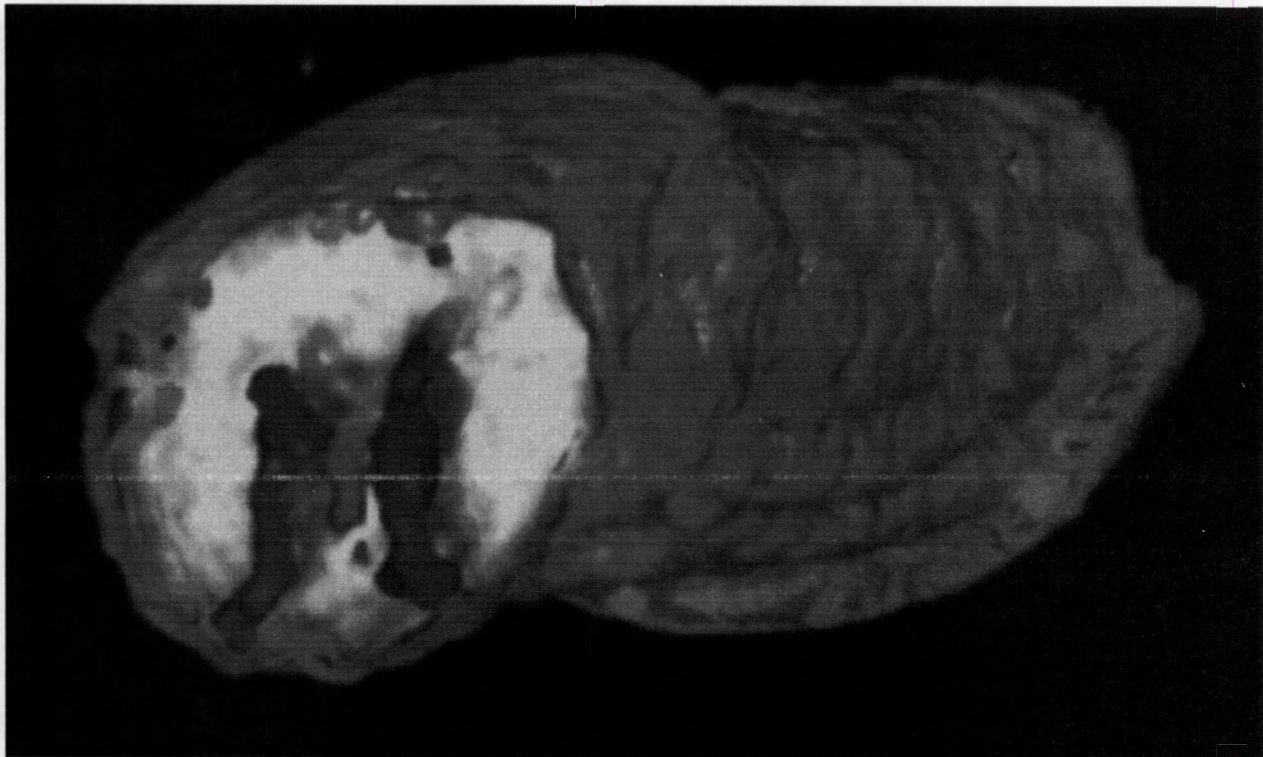


Figura 5.45 Reconstrucción 3D en la zona anterior a la lesión

El corte seleccionado correspondiente a la zona de lesión nos permite observar como la materia gris y la materia blanca se encuentran dispersas (Figura 5.46). Aquí podemos ver que la morfología medular se ha destruido y es complicada, se puede distinguir el material implantado y zonas de tejido que de acuerdo al contraste domina la materia blanca, se aprecia la posibilidad de desplazamiento y

supervivencia de materia gris. En la reconstrucción (Figura 5.46, derecha) podemos ubicar la zona elegida y como hacia la izquierda de esta es posible ver como se le forma una especie de cintura a la médula espinal, característica de la lesión.

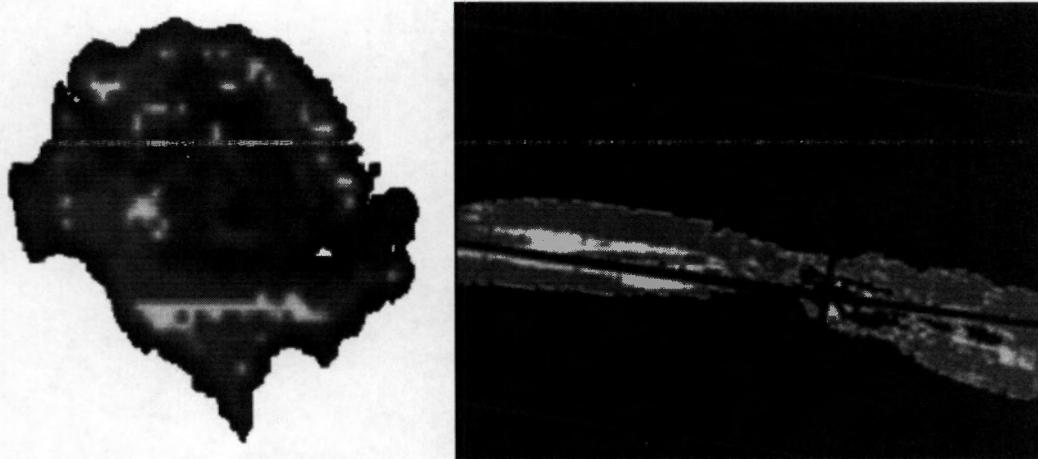


Figura 5.46 IRM en zona de implante, ubicación ortogonal.

En este caso la reconstrucción 3D (Figura 5.47) nos permite observar con mayor detalle la destrucción de la citoarquitectura medular y la presencia del material implantado completamente fusionado con los diferentes tipos de tejidos presentes.

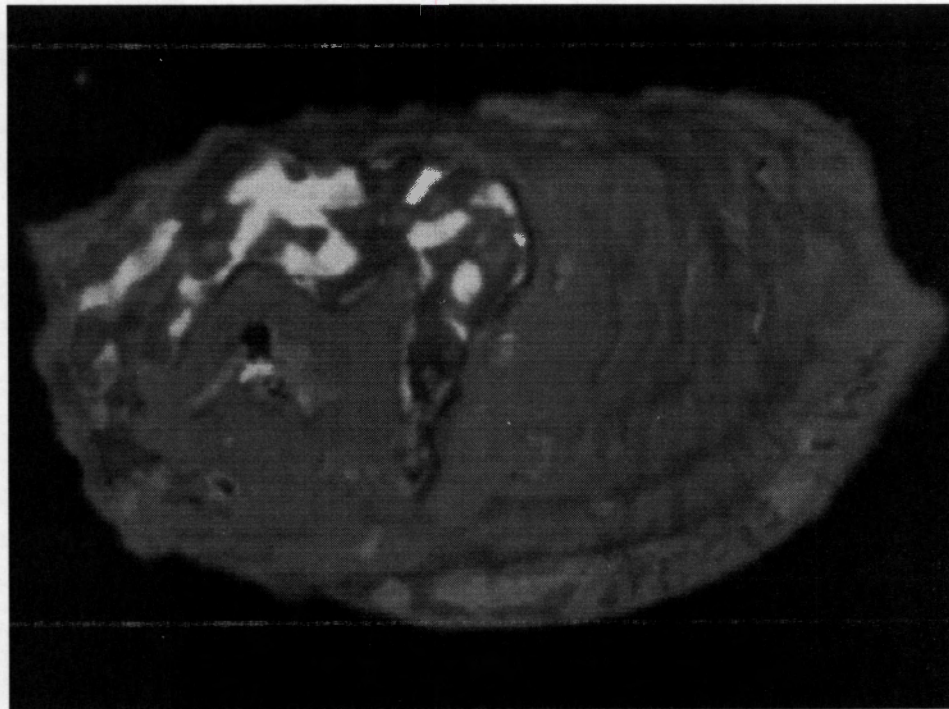


Figura 5.47 Reconstrucción en zona de lesión

En la Figura 5.48 observamos reconstrucciones 3D de los estudios obtenidos por IRM, se puede ilustrar la reconstrucción superficial de la materia gris y meninges, estando en la izquierda (A) perfectamente definida y su evolución a lo largo de la médula atravesando por la zona de lesión (B) donde es claro la discontinuidad de los cuerpos neuronales, principalmente en el epicentro de la lesión.

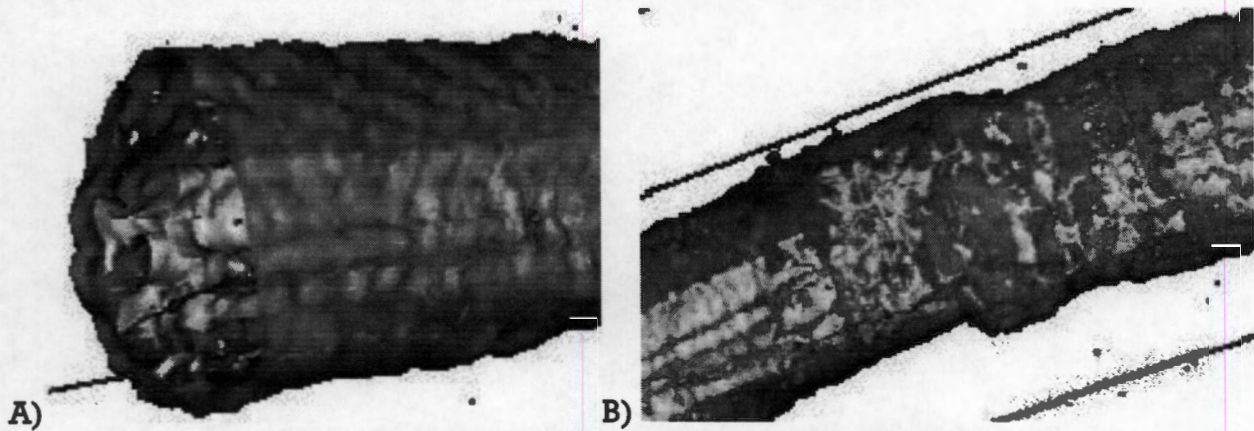


Figura 5.48 Reconstrucción 3D IRM. A) Materia gris y meninges, B) zona de lesión

La Figura 5.49 se centra en la reconstrucción de la zona de lesión, el implante (al centro) y la expansión hacia la derecha de un quiste generado por la lesión por sección completa de la médula espinal. También es posible apreciar del lado izquierdo la generación de otro quiste.

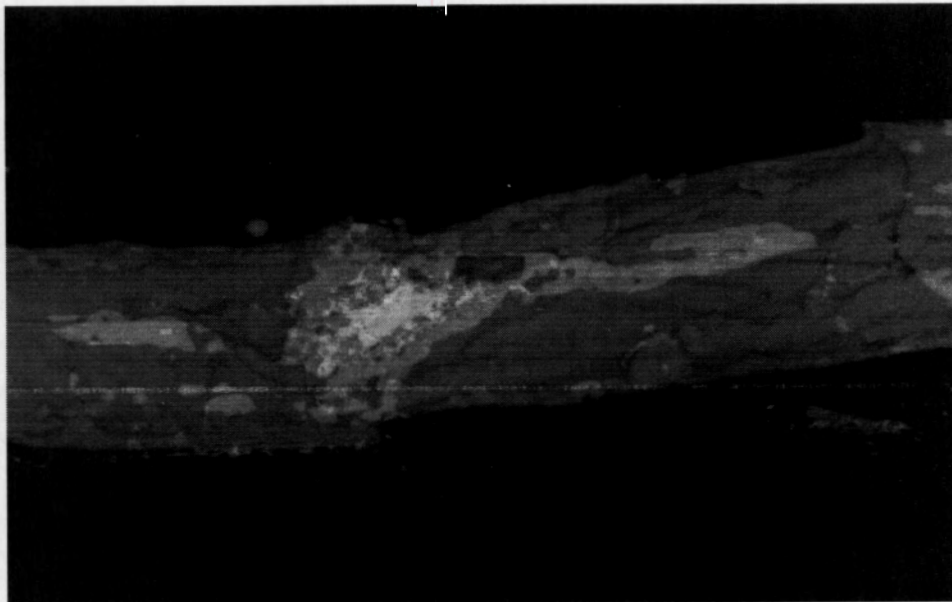


Figura 5.49 Reconstrucción 3D expansión de la lesión.

En la Figura 5.50 se muestra una comparación entre la fotografía de una histología y un corte obtenido por IRM (de diferentes especímenes) en la zona de lesión, mostrando un comportamiento similar en la presencia del tejido nervioso y rasgos como los quistes generados alrededor de la zona del implante.

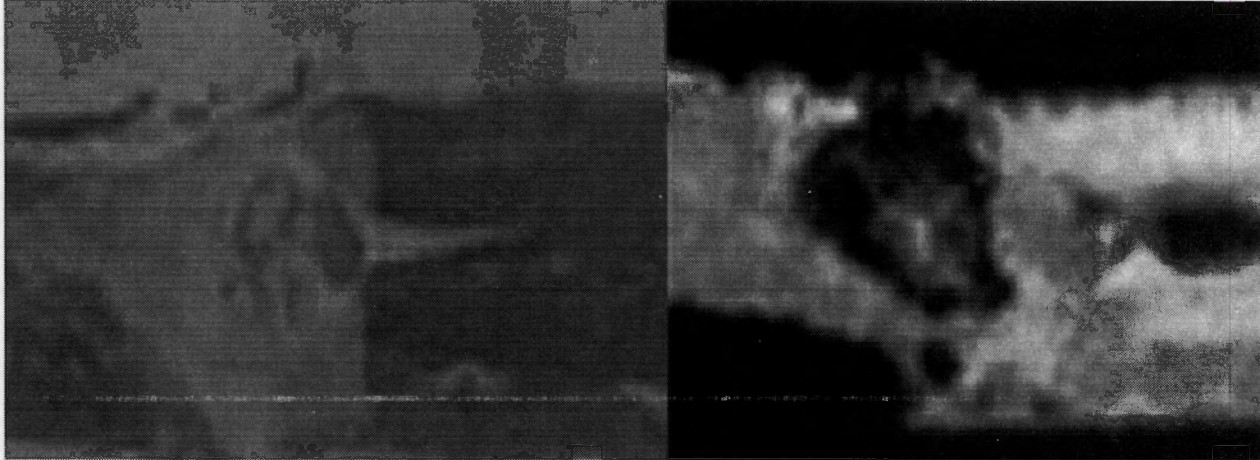


Figura 5.50 Comparación entre una fotografía histológica e IRM(sin procesamiento), ambas en zona de lesión.

6. Conclusiones

6.1. Conclusiones

La lesión de médula espinal es una condición devastadora para la cual no hay hasta ahora cura. Se están desarrollando terapias celulares, moleculares, etc. y algunas ahora están, o se encaminan, a ensayos clínicos. Sin embargo, sigue habiendo trabajo para comprobar si cualquiera de estas terapias podrían mejorar con seguridad la rehabilitación después de una lesión de médula espinal. Así, específicamente, el poder determinar la evolución e integración del implante y de la médula espinal *in vivo* es una herramienta útil para la caracterización de esta terapia o de alguna otra.

En general con el uso del PPy/I se puede apreciar la conservación de la citoarquitectura de la médula espinal. Se observa que no hay mucha destrucción de tejido y la formación de quistes es pequeña. El implante de PPy/I esta impidiendo que los mecanismos de daño secundario sean devastadores en esta zona, actuando como neuroprotector.

El uso de la tomografía axial computarizada e imagenología por resonancia magnética nos permite sondear el progreso de la zona de lesión en el modelo de lesión empleada *in vivo*.

La tomografía axial computarizada nos permite estudiar características espaciales del orden de décimas de milímetro, como la fragmentación del implante, la expulsión de éste por la médula espinal o la existencia de quistes lo cual afecta directamente en la recuperación del espécimen. Esta técnica está limitada por la resolución espacial, sin embargo, el contraste entre el tejido y el hueso facilita la localización del polímero.

El uso de imagenología por resonancia magnética aporta una resolución mayor a la tomografía axial computarizada y con esta técnica podemos ver a mayor detalle la disociación del implante, la formación de quistes alrededor de la zona de lesión y la proliferación de tejido a través del implante. Además de que el contraste señal a ruido mejora la visualización de la lesión a niveles cercanos a los histológicos.

Con la ayuda de algunas técnicas de procesamiento digital de imágenes es posible mejorar la visualización de la lesión y el implante polimérico en la médula espinal.

6.2. Perspectivas

La imagenología por resonancia magnética sólo se empleó para obtener imágenes de una médula espinal aislada.

Se planea hacer estudios in vivo de la lesión empleando secuencias estándar de imagenología, imágenes de difusión y perfusión; así como realizar estudios con aparatos de resonancia magnética con mayor resolución.

Se pretenden realizar estudios en mamíferos mayores, y con esto aumentar la capacidad de visualización de detalles y del comportamiento del implante.

Bibliografía

- [1] Alcaraz R. V.; "Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo"; 2ª edición, Editorial el manual moderno; México 2001.
- [2] Carpenter R. H. S.; :Neurofisiología; 2ª edición; Editorial el manual moderno, México 1996.
- [3] Díaz R. A.; :Efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la cintaza del oxido nítrico en tejido medular de rata; tesis para obtener el título de doctor en ciencias, UNAM 2003.
- [4] Paulsen D. F.; "Histología básica"; Editorial el manual moderno, México 1991.
- [5] Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Katz L. C., LaMantia A., McNamara J. O.; "Invitación a la neurociencia"; Editorial medica panamericana; Argentina 2001.
- [6] Guyton A. C.; "Anatomía y fisiología del sistema nervioso"; 2ª edición; Editorial médica panamericana; 1994.
- [7] Elizabeth J. Bradbury and Stephen B. McMahon; Spinal cord repair strategies: why do they work; Nature Publishing Group; 7, 644 - 653 (2006)
- [8] Peters A., Palay S., Webster, H.; :Microglia in the fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells; Editorial Philadelphia W. B. Saunders; 1976.
- [9] Krstic R.; :Los tejidos del hombre y los mamíferos; Editorial Interamericana McGraw-Hill; México 1989.
- [10] Ross, Romrell, Kaye; :Histología: texto y atlas color; 3ª edición, Editorial medica panamericana; 1997.
- [11] Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T.M.; :Neurociencia y conducta; Editorial Prentice Hall; Madrid 1997.
- [12] Ropper, A.H., 2001. Traumatic injuries of the head and spine. In: Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. (Eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine, fifteenth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2441: 2442
- [13] Maynard Jr., F.M., Bracken, M.B., Creasey, G., Ditunno Jr., J.F., Donovan, W.H., Ducker, T.B., Garber, S.L., Marino, R.J., Stover, S.L., Tator, C.H., Waters, R.L., Wilberger, J.E., Young, W., 1997. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. American spinal injury association. Spinal Cord 35, 266:274
- [14] Dimitrijevic MR, Faganel J, Lehmkuhl D, and Sherwood A. Motor control in man after partial or complete spinal cord injury. Adv Neurol 39: 915:926, 1983
- [15] Sandrine Thuret, Lawrence D.F Moon, Fred H. Gage; Therapeutic interventions after spinal cord injur; Nature Publishing Group; 7, 628-643 (2006)
- [16] International Campaign for Cure of Spinal Cord Injury Paralysis; <http://www.campaignforcure.org/>
- [17] Spinal Cord Injury Information Network; <http://www.spinalcord.uab.edu/>
- [18] Tator C.H. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. Neurosurgery 42: 696: 708, 1998
- [19] 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
- [20] Tator, C.H., 1995. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. Brain Pathol. 5, 407: 413
- [21] Blight, A., 1988. Mechanical factors in experimental spinal cord injury. J. Am. Parapleg. Soc. 11, 26:34
- [22] Maxwell, W.L., 1996. Histopathological changes at central nodes of Ranvier after stretch-injury. Microsc. Res. Tech. 34, 522:535
- [23] Gruner, J.A., Yee, A., Blight, A.R; Histological and functional eval- 432 C. Profyris et al. / uation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. Neurobiology of Disease 15 (2004) 415:436
- [24] David, S., 2002. Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. Prog. Brain Res. 137, 407: 414
- [25] Sanes, J.R., Jessell, T.M., 2000b. The formation and regeneration of synapses. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.), Principles of neural science, fourth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1087: 1114
- [26] Quencer, R.M., 2002. Advances in imaging of spinal cord injury: implications for treatment and patient evaluation. Prog. Brain Res. 137, 3 : 8
- [27] Fawcett, J.W., Asher, R.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. Brain Res. Bull. 49, 377: 391
- [28] McTigue, D.M., Wei, P., Stokes, B.T., 2001. Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. J. Neurosci. 21, 3392: 3400
- [29] Miller, R.H., 1999. Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. Dev. Biol. 216, 359:368
- [30] Takahashi, M., Arai, Y., Kurosawa, H., Sueyoshi, N., Shirai, S., 2003. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 185: 194
- [31] Bignami, A., Dahl, D., 1994. General Pathology. Medical Intelligence Unit: Glial Cells In The Central Nervous System And Their Reaction To Injury, first ed. R.G. Landes Company, Austin, pp. 77: 92
- [32] Rabchevsky, A.C., Smith, G.M., 2001. Therapeutic interventions following mammalian spinal cord injury. Arch. Neurol. 58, 721: 726
- [33] Grimpe, B., Silver, J., 2002. The extracellular matrix in axon regeneration. Prog. Brain Res. 137, 333:349
- [34] Li, Y., Field, P.M., Raisman, G., 1999b. Death of oligodendrocytes and microglial phagocytosis of myelin precede immigration of Schwann cells into the spinal cord. J. Neurocytol. 28, 417:427
- [35] Glenn Yiu and Zhigang H; Glial inhibition of SNC axon regeneration; Nature Publishing Group; 7, 617-627 (2006)
- [36] Beattie, M. S. et al. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. Exp. Neurol. 148, 453:463 (1997).
- [37] Yang, H. et al. Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury. J. Neurosci. 26, 2157:2166 (2006).
- [38] Raineteau, O. & Schwab, M. E. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. Nature Rev. Neurosci. 2, 263:273 (2001).

- [39] Richardson, P. M., McGuinness, U. M. & Aguayo, A. J. Axons from SNC grafts regenerate into PNS grafts. *Nature* 284, 264:268 (1980).
- [40] Cheng, H., Cao, Y. & Olson, L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hindlimb function. *Science* 273, 510:513 (1996).
- [41] Cheng, H. et al. Gait analysis of adult paraplegic rats after spinal cord repair. *Exp. Neurol.* 148, 544:557 (1997).
- [42] Lee, Y. S., Hsiao, I. & Lin, V. W. Peripheral nerve grafts and aFGF restore partial hindlimb function in adult paraplegic rats. *J. Neurotrauma* 19, 1203:1216 (2002).
- [43] Cheng, H., Liao, K. K., Liao, S. F., Chuang, T. Y. & Shih, Y. H. Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia. *Spine* 29, E284:E288 (2004).
- [44] Takami, T. et al. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurosci.* 22, 6670:6681 (2002). An important study that compares two competing cell types in a single experiment.
- [45] Bamber, N. I. et al. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded minichannels. *Eur. J. Neurosci.* 13, 257:268 (2001).
- [46] Guest, J. D. et al. The ability of cultured human Schwann cells within PAN/PVC guidance channels to support regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Can. J. Neurol. Sci.* 23, S1:S2 (1996).
- [47] Bianco, J. L., Perry, C., Harkin, D. G., Mackay-Sim, A. & Feron, F. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia* 45, 111:123 (2004).
- [48] Kato, T., Hornou, O., Uede, T., Hashi, K. & Kocsis, J. D. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia* 30, 209:218 (2000).
- [49] Lu, J., Feron, F., Mackay-Sim, A. & Waite, P. M. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 125, 14:21 (2002).
- [50] Huang, H. et al. Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. *Chin. Med. J. (Engl.)* 116, 1488:1491 (2003).
- [51] Bregman, B. S., McAtee, M., Dai, H. N. & Kuhn, P. L. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.* 148, 475:494 (1997).
- [52] Jakeman, L. B. & Reier, P. J. Axonal projections between fetal spinal cord transplants and the adult rat spinal cord: a neuroanatomical tracing study of local interactions. *J. Comp. Neurol.* 307, 311:334 (1991).
- [53] Reier, P. J., Anderson, D. K., Young, W., Michel, M. E. & Fessler, R. Workshop on intraspinal transplantation and clinical application. *J. Neurotrauma* 11, 369:377 (1994).
- [54] Thompson, F. J. et al. Neurophysiological assessment of the feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. *J. Neurotrauma* 18, 931:945 (2001).
- [55] Herrera, J. et al. Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo. *Exp. Neurol.* 171, 117:121 (2001).
- [56] Cao, Q., Benton, R. L. & Whittemore, S. R. Stem cell repair of central nervous system injury. *J. Neurosci. Res.* 68, 50:510 (2002).
- [57] Keirstead, H. S. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 4694:4705 (2005).
- [58] Faulkner, J. & Keirstead, H. S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. *Transpl. Immunol.* 15, 131:142 (2005).
- [59] Schultz, S. S. Adult stem cell application in spinal cord injury. *Curr. Drug Targets* 6, 63:73 (2005).
- [60] Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707:1710 (1992).
- [61] Shihabuddin, L. S., Horner, P. J., Ray, J. & Gage, F. H. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 20, 8727:8735 (2000).
- [62] Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Morshead, C. M. & Fehlings, M. G. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26, 3377:3389 (2006).
- [63] Hirschberg, D. L. & Schwartz, M. Macrophage recruitment to acutely injured central nervous system is inhibited by a resident factor: a basis for an immune brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 61, 89:96 (1995).
- [64] Popovich, P. G. et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 158, 351:365 (1999).
- [65] Baptiste, D. C. & Fehlings, M. G. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J. Neurotrauma* 23, 31:34 (2006).
- [66] Hall, E. D. & Springer, J. E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 1, 80:100 (2004).
- [67] Coleman, W. P. et al. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (I and II) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *J. Spinal Disord.* 13, 185:199 (2000).
- [68] Fehlings, M. G. & Baptiste, D. C. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury* 36 (Suppl. 2), B113:B122 (2005).
- [69] McTigue, D. M., Horner, P. J., Stokes, B. T. & Gage, F. H. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 18, 5354:5365 (1998).
- [70] Tuszynski, M. H., Grill, R., Jones, L. L., McKay, H. M. & Blesich, A. Spontaneous and augmented growth of axons in the primate spinal cord: effects of local injury and nerve growth factor-secreting cell grafts. *J. Comp. Neurol.* 449, 88:101 (2002).

- [71] Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y. A. & Schwab, M. E. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesions. *Nature* 367, 170?172 (1994).
- [72] Grill, R., Murai, K., Blesch, A., Gage, F. H. & Tuszynski, M. H. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axon growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5560?5572 (1997).
- [73] Lu, P., Blesch, A. & Tuszynski, M. H. Neurotrophism without neurotropism: BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons. *J. Comp. Neurol.* 436, 456?470 (2001).
- [74] Kwon, B. K. et al. Rubrospinal neurons fail to respond to brain-derived neurotrophic factor applied to the spinal cord injury site 2 months after cervical axotomy. *Exp. Neurol.* 189, 45?57 (2004).
- [75] Engesser-Cesar, C., Anderson, A. J., Basso, D. M., Edgerton, V. R. & Cotman, C. W. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 22, 157?171 (2005).
- [76] Lankhorst, A. J. et al. Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. *J. Neurotrauma* 18, 203?215 (2001).
- [77] Hutchinson, K. J., Gomez-Pinilla, F., Crowe, M. J., Ying, Z. & Basso, D. M. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 127, 1403?1414 (2004).
- [78] Wernig, A. Long-term body-weight supported treadmill training and subsequent follow-up in persons with chronic SCI: effects on functional walking ability and measures of subjective well-being. *Spinal Cord* 43, 291?298 (2005).
- [79] Siskin BF, Walker J, Orgel M. Prospects on clinical applications of electrical stimulation for nerve regeneration. *J Cell Biochem* 1993;51:404}9.
- [80] Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8948}53.
- [81] Patel N, Poo MM. Orientation of neurite growth by extracellular electric "elds. *J Neurosci* 1982;2:483}96.
- [82] Valentini RF, Vargo TG, Gardella Jr JA, Aebischer P. Electrically charged polymeric substrates enhance nerve "bre outgrowth in vitro. *Biomaterials*;1992;13:183}90.
- [83] Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, Galletti PM. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Res* 1987;436:165}8.
- [84] Valentini RF, Sabatini AM, Dario P, Aebischer P. Polymer electret guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice. *Brain Res* 1989;480:300}4.
- [85] A. Kotwal, C. E. Schmidt, *Biomaterials* 2001, 22, 1055.
- [86] X. Cui, V. A. Lee, Y. Raphael, J. A. Wiler, J. F. Hetke, D. J. Anderson, D. C. Martin, *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 56, 261
- [87] Noticiero Plástico; N° 431 junio de 1998; Buenos Aires? Argentina.
- [88] R. J. Young and P. A. Lovell; *Introduction to polymers*; Chapman & Hall
- [89] Nagarajan, R.; Tripathy, S.; Kumar, J.; Bruno, F. F.; Samuelson, L. *Macromolecules* 2000, 33, 9542. (b) Liu, W.; Kumar, J.; Tripathy, S.; Senecal, K. J.; Samuelson, L. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 7
- [90] Malinauskas A.; *Chemical deposition of conductin polymers*; 2000
- [91] Morales J., Olayo M., Cruz J., Olayo R.; *Synthesis by plasma and characterization of bilayer Aniline-Pirrole thin films doped with Iodine*; UAM unidad Iztapalapa, Departamento de Física de síntesis y caracterización de polímeros.
- [92] Olayo R., Cruz G., Morales J.; *Films obtained by plasma polymerization of pyrrole*; *Thin solid films*.
- [93] Kathryn M. Koeller & Chi-Huey Won; *Enzymes for chemical synthesis*; *Nature* vol 409, 232:240 (2001)
- [94] D. M. Ciombor, R. K. Aaron, *J. Cell. Biochem.* 1993, 52, 37.
- [95] R. K. Aaron, D. M. Ciombor, *J. Cell. Biochem.* 1993, 52, 42.
- [96] R. Goldman, S. Pollack, *Bioelectromagnetics* 1996, 17, 450.
- [97] M. J. Politis, M. F. Zanakis, *Neurosurgery* 1989, 25, 71.
- [98] B. Pomeranz, J. J. Campbell, *Brain Res.* 1993, 603, 271.
- [99] R. F. Valentini, A. M. Sabatini, P. Dario, P. Aebischer, *Brain Res.* 1989, 480, 300.
- [100] Berlanga, E., et. al., *Rev. San. Mil. Ma.*, 42, 3, 1988
- [101] <http://www.sefm.es/revista/boletin8/Articulo8.html>
- [102] <http://www.sefm.es/revista/boletin8/Articulo8.html>
- [103] F. Bloch, *Nuclear Induction*, *Physical Review*, Vol. 70, p. 460, 1946
- [104] E. M. Purcell, H. C. Torrey & R. V. Pound. *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid*, *Physical Review.*, Vol. 69, p. 37, 1946.
- [105] P. C. Lauterbur, *Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance*, *Nature*, Vol. 242, p. 190, 1973.
- [106] P. Mansfield y P. K. Grannel. *Diffraction in solids*. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, Vol. 6, p. L-422, 1973.
- [107] A Non-Mathematical Approach to Basic MRI Patrick Turski, M.D. Associate Professor of Radiology and Chief of Magnetic Resonance Imaging. Section, Department of Radiology, University of Wisconsin 1994.
- [108] Richard Amador Baheza; *Desarrollo de antenas superficiales de radiofrecuencia para imagenología por resonancia magnética*; Tesis para obtener grado de M en C; Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, 2001
- [109] Oscar René Marrufo Meléndez, *ANTENA AMPERE PARA EXTREMIDADES PARA IMAGENOLOGIA POR RESONANCIA MAGNETICA*; Tesis para obtener grado de M en C; Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, 2004
- [110] *Entendiendo la Resonancia Magnetica*; GE Medical Systems; 1989

Apéndice A. Procedimiento de hematoxilina y eosina de

Harris.

FIJACIÓN: Formalina neutra al 10 %, estabilizada, fijadores de Bouin.

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

SOLUCIONES: Alcohol ácido al 1 %, agua amoniacal, solución saturada de carbonato de litio, 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 y óxido 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 con la ayuda de calor y de un agitador magnético. Agita vigorosamente para mezclar la hematoxilina en el alcohol, a temperatura ambiente. Remueva el alumbre en el agua destilada de la fuente de calor. Lentamente combine las dos soluciones. Disuelva las soluciones ya combinadas a la fuente de calor. Haga hervirla tan rápido como sea posible, aproximadamente 1min o menos. Remueva con calor y lentamente añada el óxido de mercurio. Si el óxido de mercurio se añade 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, luego remuévela del calor, y póngala en un recipiente con agua fría. La solución entonces está lista. Añada 20ml de ácido acético para intensificar la tinción nuclear. Filtre la solución cada vez antes de usarla.

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinice las laminas e hidrate hasta llegar al agua destilada. Utilice "dezenkerice", si es necesario antes de teñir.
2. Tiña en hematoxilina de Harris filtrada recientemente de 6-15min.
3. Lave en agua corriente de 2-5min.
4. Diferencie en alcohol ácido al 1 %, de 1-2 remojones.
5. Lave levemente en agua corriente.
6. Coloque las laminas 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 2min.
9. Contraste en la solución de eosina-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

Núcleos: azul.

Citoplasma: rosado a rojo.

La mayoría de otros tejidos: rosado a rojo.