



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Efecto del implante de polipirrol/iodo sintetizado por plasma, combinado con rehabilitación física, sobre la recuperación de la función motora y la regeneración y plasticidad nerviosa en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en ratas.”

TESIS QUE PRESENTA

M en C. Stephanie Maricela Sánchez Torres

MATRÍCULA 2143800473

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

JURADO:

Directores de Tesis

Dr. Pablo G. Damián Matsumura

PRESIDENTE

Depto. Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad
Iztapalapa.

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

SECRETARIA

Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Neurológicas. Centro Médico
Nacional Siglo XXI.

Asesora

Dra. Sandra Orozco Suárez

VOCAL

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos

VOCAL

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad
Lerma.

Dr. Antonio Bueno Nava

VOCAL

Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA.

Ciudad de México, noviembre 2021

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en las instalaciones de Proyecto Camina, bajo la dirección de la Dra. Hermelinda Salgado Ceballos y el Dr. Pablo G. Damián Matsumura.

El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Sandra Orozco Suárez de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI

El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Nombre del alumno: M en C. Stephanie Maricela Sánchez Torres

Fecha de aprobación: 07 de septiembre del 2021

Miembros del jurado:

Dr. Pablo G. Damián Matsumura

PRESIDENTE

Depto. Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa.

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

SECRETARIA

Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Neurológicas. Centro
Médico Nacional Siglo XXI.

Dra. Sandra Orozco Suárez

VOCAL

Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Neurológicas. Centro
Médico Nacional Siglo XXI.

Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos

VOCAL

Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Lerma.

Dr. Antonio Bueno Nava

VOCAL

Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA.

AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo y colaboración:

**Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional
Siglo XXI
Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda”, Unidad de
Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas**



Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Dra. Sandra Orozco Suárez

Programa de becas para estudios de posgrado

FIS/IMSS/PROTG16/1603, 2016

029-2012

Apoyo Financiero para el Desarrollo de Protocolos de Investigación
FIS/IMSS/PROT/G16/1603



Proyecto Camina A.C.

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa**



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biología de la Reproducción**

Dr. Pablo G. Damián Matsumura

**División de Ciencias Biomédicas e Ingenierías Departamento de
Física**

Dr. Roberto Olayo González

Dr. Juan Morales Corona



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al programa de becas para estudios de posgrado

422267



Programa de Cátedras CONACyT

Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado

Dr. Rodrigo Mondragón Lozano

Dr. Calos Orozco Barrios



Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ)

Dra. Guadalupe Olayo González

Dr. Guillermo Cruz Cruz



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)

Dra. Araceli Díaz Ruíz

Dr. Camilo Ríos Castañeda

RESUMEN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) puede causar parálisis y discapacidad permanente. Aunque su efecto benéfico es limitado, a la fecha la rehabilitación (RB) es el único tratamiento aceptado en la clínica. Nuestro grupo de investigación demostró previamente que el polipirrol/yodo (PPy/I) sintetizado por plasma promueve la recuperación de la función motora después de una LTME, por lo que en el presente proyecto se evaluó el efecto del PPy/I sintetizado por plasma aplicado en combinación con un esquema mixto de RB sobre la recuperación funcional y los mecanismos involucrados en ello. Se utilizaron ratas Long-Evans adultas a las que se les produjo una LTME por contusión moderada utilizando el impactador NYU y se dividieron en 4 grupos: sin tratamiento (control); con biopolímero (PPy/I); con esquema mixto de RB mediante natación y ambiente enriquecido (SW/EE); y con el tratamiento combinado (PPy/I+SW/EE). Ocho semanas después de la LTME, la salud general de los animales que recibieron cualquiera de los tratamientos fue mejor comparada con los animales del grupo control. La recuperación motora evaluada con la escala de nado Louisville (LSS) y la de campo abierto de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB), fue mejor y se logró en menos tiempo con el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE. El tejido medular se preservó mejor en los animales a los que se les administró PPy/I y PPy/I+SW/EE, redujeron la pérdida neuronal y de oligodendrocitos en el tejido circundante al epicentro de la lesión. En los tres grupos que recibieron alguno de los tratamientos, también se observó la presencia de vasos sanguíneos de nueva formación, lo cual no ocurrió en el grupo control. El análisis de la expresión génica en los grupos tratados con PPy/I y PPy/I+SW/EE mostró que estos tratamientos pueden modificar genes que participan en procesos biológicos relacionados con el ciclo celular, proliferación, crecimiento axonal, regeneración y plasticidad. Estos dos últimos procesos se correlacionaron con la identificación inmunohistoquímica de proteínas como β III-tubulina (relacionada con la plasticidad nerviosa) y GAP-43 (involucrada en la regeneración nerviosa), que fueron expresadas de forma significativa en la médula espinal de los tres grupos con tratamiento. Más aún, los animales tratados con SW/EE y PPy/I+SW/EE exhibieron fibras positivas a β III-tubulina que cruzaron el sitio de lesión y colocalizaron con GAP-43. En contraste, la MBP (asociada con el proceso de mielinización), mostró una discreta expresión en el epicentro de la lesión pero sin colocalizar con la β III-tubulina, mientras que la expresión de GFAP (proteína expresada por los astrocitos reactivos que forman la cicatriz glial),

disminuyó en los 3 grupos tratados. El uso de un esquema de rehabilitación mixta (SW/EE) en combinación con la aplicación del biopolímero PPy/I sintetizado por plasma, disminuye la formación de la cicatriz glial, favorece los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa y la recuperación funcional, por lo que podría representar una alternativa terapéutica para la LTME.

ABSTRACT

Traumatic spinal cord injury (TSCI) can cause paralysis and permanent disability. Although its beneficial effect is limited, to date rehabilitation (RB) is the only accepted treatment in the clinic. Our research group previously demonstrated that plasma-synthesized polypyrrole/iodine (PPy/I) promotes recovery of motor function after TSCI, so in the present project we evaluated the effect of plasma-synthesized PPy/I applied in combination with a mixed RB scheme on functional recovery and the mechanisms involved in it. Adult Long-Evans rats that underwent moderate contusion TSCI using the NYU impactor were divided into 4 groups: no treatment (control); with biopolymer (PPy/I); with mixed RB scheme using swimming and enriched environment (SW/EE); and with the combined treatment (PPy/I+SW/EE). Eight weeks after TSCI, the general health of animals receiving any of the treatments was better compared to animals in the control group. Motor recovery assessed with the Louisville swimming scale (LSS) and the Basso-Beattie-Bresnahan open field scale (BBB), was better and achieved in less time with the combined PPy/I+SW/EE treatment. Spinal cord tissue was better preserved in animals given PPy/I and PPy/I+SW/EE, reduced neuronal and oligodendrocyte loss in the tissue surrounding the epicenter of injury. In the three groups that received any of the treatments, the presence of newly formed blood vessels was also observed, which did not occur in the control group. Gene expression analysis in the PPy/I and PPy/I+SW/EE treated groups showed that these treatments can modify genes involved in biological processes related to cell cycle, proliferation, axonal growth, regeneration and plasticity. The latter two processes correlated with the immunohistochemical identification of proteins such as β III-tubulin (related to nerve plasticity) and GAP-43 (involved in nerve regeneration), which were significantly expressed in the spinal cord of all three treatment groups. Moreover, SW/EE- and PPy/I+SW/EE-treated animals exhibited β III-tubulin-positive fibers that crossed the injury site and colocalized with GAP-43. In contrast, MBP (associated with the myelination process), showed discrete expression at the lesion epicenter but without colocalizing with β III-tubulin, while GFAP expression (protein expressed by reactive astrocytes that form the glial scar), decreased in all 3 treated groups. The use of a mixed rehabilitation scheme (SW/EE) in combination with the application of plasma-synthesized PPy/I biopolymer decreases glial scar formation, favors nerve regeneration and plasticity processes and functional recovery, so it could represent a therapeutic alternative for TSCI.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1. MÉDULA ESPINAL	12
I.2. LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (LTME)	14
I.3. EPIDEMIOLOGÍA	16
I. 4. FISIOPATOLOGÍA DE LA LTME	18
I. 5. REGENERACIÓN Y PLASTICIDAD DE LA MÉDULA ESPINAL	21
I.6. TRATAMIENTO DE LA LTME	26
II. ANTECEDENTES	34
II. 1. POLIPIRROL/YODO COMO TRATAMIENTO DE LA LTME	34
II.2. REHABILITACIÓN POR NADO	35
II.3. REHABILITACIÓN EN MEDIO ENRIQUECIDO	36
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	38
V. HIPÓTESIS	38
VI. OBJETIVOS	38
VI.1. OBJETIVO GENERAL	38
VI. 2. OBJETIVOS PARTICULARES	39
VII. METODOLOGÍA	39
VII.1, TIPO DE ESTUDIO:	39
VII.2. UNIVERSO DE ESTUDIO	39
VII.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA	39
<i>Criterios de inclusión</i>	39
<i>Criterios de exclusión</i>	40
<i>Criterios de eliminación</i>	40
VII.4. VARIABLES	40
<i>Independientes:</i>	40
<i>Dependientes:</i>	40
VII.5. SÍNTESIS DEL POLÍMERO DE PPy/I	40
VII.6. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	41
VII.7. CUIDADOS POST-OPERATORIOS	42
VII. 8. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
VII.9. TRATAMIENTOS	44
<i>Aplicación del PPy/I</i>	44
<i>Terapias de Rehabilitación</i>	44
<i>Rehabilitación por nado</i>	44
<i>Rehabilitación en medio enriquecido</i>	45

RECUPERACIÓN FUNCIONAL	45
<i>Escala Basso, Beattie and Bresnahan (BBB)</i>	45
<i>Escala Louisville (LSS)</i>	46
VII.10. EUTANASIA DE LOS ANIMALES	47
VII.11. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	48
VII.12. INMUNOFUORESCENCIA.....	48
VII. 13. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	49
VII.14. EXPRESIÓN GÉNICA.....	50
<i>Aislamiento del ácido ribonucleico (ARN)</i>	50
<i>Preparación del RNA para el microarreglo</i>	51
<i>Microarreglo</i>	51
VII.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
VIII. RESULTADOS	53
VIII.1. CARACTERIZACIÓN DEL PPy/I SINTETIZADO POR PLASMA	53
VIII.2. CONDICIÓN CLÍNICA.....	54
VIII.3. RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA. EVALUADA CON LAS ESCALAS LSS Y BBB.	55
VIII.4. CUANTIFICACIÓN DEL TEJIDO PRESERVADO Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	57
VIII.5. EVALUACIÓN POR INMUNOFUORESCENCIA DE LA EXPRESIÓN DE GAP-43, MBP Y BIII-TUBULINA.	60
VIII.6. ASTROCITOS INMUNOREACTIVOS A GFAP.	63
VIII.7. EXPRESIÓN GÉNICA	65
IX. DISCUSIÓN	69
X. CONCLUSIÓN	80
XI. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Anatomía externa de la médula espinal</i>	12
<i>Figura 2. Anatomía interna de la médula espinal</i>	13
<i>Figura 3. Fascículos, tractos y vías nerviosas de la sustancia blanca de la médula espinal</i>	14
<i>Figura 4. Costo total de la atención médica y quirúrgica en los pacientes con lesión traumática de médula espinal (LTME) y distribución porcentual de los costos por servicios hospitalarios en la Unidad Médica de alta especialidad, Centro Nacional de Occidente, IMSS de Jalisco</i>	15
<i>Figura 5. Etiología de la LTME. A. Etiología global</i>	17
<i>Figura 6. Nivel Neurológico y magnitud de la lesión traumática de médula espinal (LTME)</i>	17
<i>Figura 7. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal</i>	21
<i>Figura 8. Elementos para la regeneración axonal</i>	24
<i>Figura 9. Rehabilitación por Medio Enriquecido (EE)</i>	37
<i>Figura 10. Impactador New York (NYI) para producir la lesión traumática de la médula espinal</i>	42
<i>Figura 11. Diseño experimental</i>	43
<i>Figura 12. Parámetros de evaluación de la escala BBB</i>	46
<i>Figura 13. Parámetros de evaluación de la escala Louisville (LSS)</i>	47
<i>Figura 14. Caracterización del implante de polipirrol/ yodo (PPy/I)</i>	54

Figura 15. Resultados de la recuperación de la función locomotora.....	56
Figura 16. Análisis histológico.....	59
Figura 17. Expresión de moléculas relacionadas con los procesos de regeneración y plasticidad neuronal después de una lesión traumática de médula espinal (LTME).....	61
Figura 18. Expresión de la proteína básica de la mielina (MBP) después de una lesión traumática de médula espinal.....	62
Figura 19. Cuantificación del área de fluorescencia resultante del análisis de inmunofluorescencia de βIII-tubulina, GAP-43 y MBP 8 semanas después de la lesión traumática de la médula espinal.....	63
Figura 20. Expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) después de una lesión traumática de médula espinal (LTME).....	64
Figura 21. Análisis de la calidad del RNA.....	65
Figura 22. Expresión génica diferencial.....	67
Figura 23. Análisis de genes con la administración de polipirrol/yodo (PPy/I) según el proceso biológico en el que participan.....	68
Figura 24. Análisis de genes con la administración de polipirrol/yodo (PPy/I) sintetizado por plasma y aplicado en combinación con la rehabilitación mixta por nado y medio enriquecido (SW/EE) según el proceso biológico en el que participan.....	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Promedio anual de gastos durante el primer año después de una LTME y cada año posterior, que depende de la severidad de la LTME en Estados Unidos de América.....	15
Tabla 2. Estrategias experimentales de neuroprotección para el tratamiento de la lesión traumática de médula espinal.....	27
Tabla 3. Estrategias experimentales neuroregeneradoras para el tratamiento de la lesión traumática de médula espinal.....	29
Tabla 4. Terapias de rehabilitación para pacientes con lesión traumática de médula espinal.....	32

Anexos

Anexo 1. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.....	106
Anexo 2. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.....	107
Anexo 3. Carta de aprobación del Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.....	110
Anexo 4. Carta de Re-aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.....	111
Anexo 5. Escala de evaluación locomotora de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).....	112
Anexo 6. Escala de evaluación Louisville (LSS):.....	113
Anexo 7. Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.....	114
Anexo 8. Artículo.....	117
Anexo 9. Constancia.....	118

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. MÉDULA ESPINAL.

La médula espinal forma parte del Sistema Nervioso Central junto con el cerebro, es un cilindro continuo de tejido nervioso que se encuentra cubierto por tres meninges denominadas: duramadre, aracnoides y piamadre, que le brindan soporte, nutrición y protección. Conjuntamente, la médula espinal está suspendida en líquido cefalorraquídeo dentro del conducto raquídeo, formado por las vértebras de la columna vertebral (**Fig. 1A**) y está definida por 31 segmentos, 12 segmentos torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo, determinados por los nervios espinales y la emergencia de las raíces nerviosas (Snell 2007, Watson, Paxinos y cols. 2009). Además, tiene dos ensanchamientos, el ensanchamiento cervical o braquial (C5-T1) y el ensanchamiento lumbosacro (L2-S2) (**Fig. 1B**) (Watson, Paxinos y cols., 2009, Martini, Ober y cols., 2017).

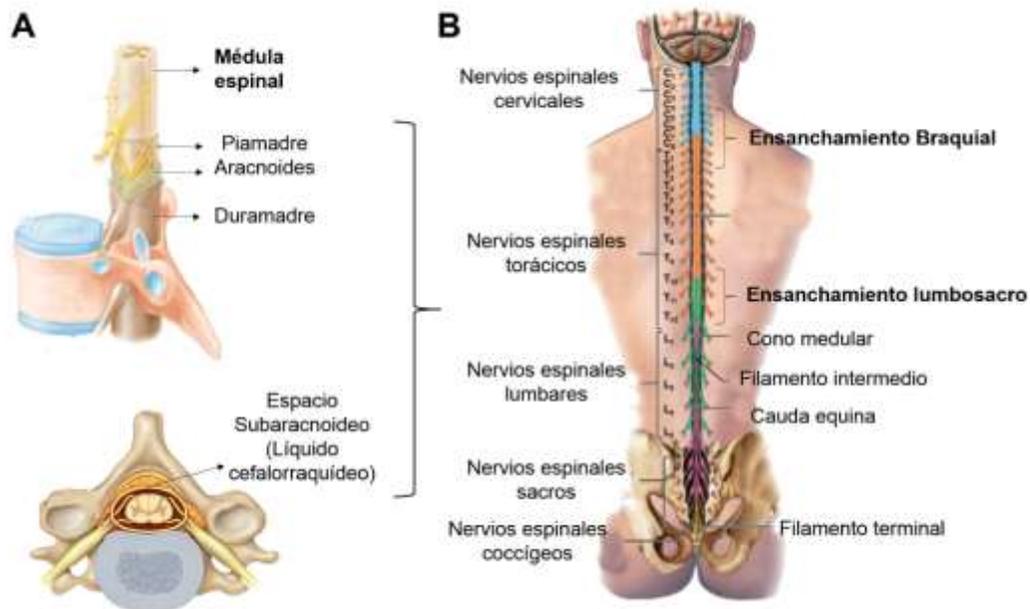


Figura 1. Anatomía externa de la médula espinal. A. Médula espinal suspendida en el líquido cefalorraquídeo y protegida por las tres meninges, duramadre, aracnoides y piamadre. Modificada de EHS Anatomy and Physiology de Zimmer Biomet (Cummings, 2001, Spine, 2018). B. Segmentos de la médula espinal determinados por los nervios espinales y la emergencia de las raíces nerviosas y los ensanchamientos cervical y lumbosacro. Modificado de Visual Anatomy and Physiology (Martini, Ober y cols., 2017).

De manera interna, la médula espinal está conformada por la sustancia gris y la sustancia blanca. La sustancia gris está organizada en forma de una mariposa o una letra H que depende del nivel en el que se observe y, al centro se encuentra el canal endimario (Watson, Paxinos y cols., 2009). La sustancia blanca rodea la sustancia gris (Purves, Fitzpatrick y cols., 2000, Watson, Paxinos y cols., 2009), que consiste principalmente de axones que se extienden longitudinalmente y células gliales (**Fig. 2**).

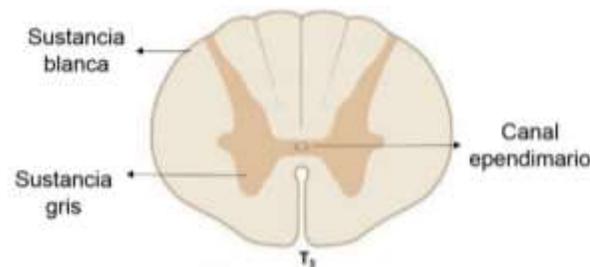


Figura 2. Anatomía interna de la médula espinal. Localización de la sustancia gris, la sustancia blanca y el canal endimario. Modificado de Human Anatomy (Martini, Timmons y cols., 2012).

Cuando se encuentra a un grupo de axones en un área determinada se llaman funículos y los paquetes más pequeños de axones que comparten características comunes con los funículos son llamados fascículos. Asimismo, los grupos de fibras nerviosas que comparten el mismo origen, curso, terminación y función, se llaman tractos; mientras que un grupo de tractos con una función relacionada se conoce como vías (**Fig. 3**) (Purves, Fitzpatrick y cols., 2000, Watson, Paxinos y cols., 2009).

Los tractos, pueden ser ascendentes o descendientes. Los tractos ascendentes, están compuestos por los tractos espinotalámicos, espinocerebral y espinotectal y los tractos descendentes están formados por los tractos corticoespinal, vestibuloespinal, tectoespinal y reticuloespinal (Watson, Paxinos y cols., 2009, Longo, Fauci y cols., 2011). Estos tractos de axones favorecen la conducción y comunicación de los estímulos a través de la médula espinal al cerebro, también existen fibras en la sustancia blanca que conectan un segmento de la médula espinal con otro, llamadas propioespinales porque se encuentran muy cerca de la sustancia gris y transportan las sensaciones de la piel, así como el sentido de posición (propiocepción) de las extremidades y del tronco. Además, estas vías propioespinales

conectan los ensanchamientos braquial y lumbosacro para coordinar el movimiento de las extremidades (**Fig.3**) (Longo, Fauci y cols., 2011).

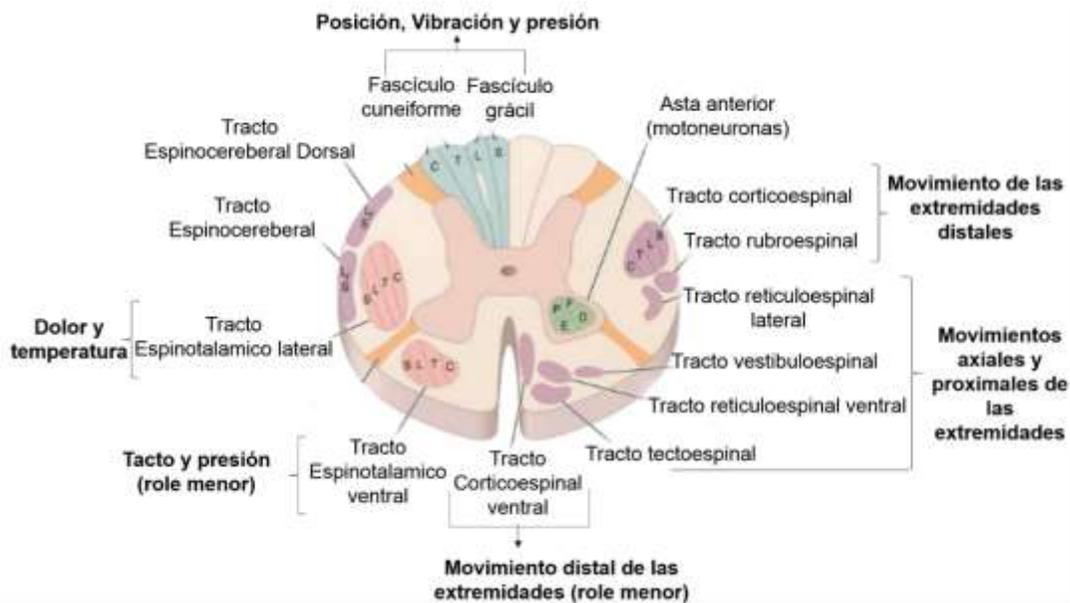


Figura 3. Fascículos, tractos y vías nerviosas de la sustancia blanca de la médula espinal. Modificado de Harrison's Principles of Internal Medicine (Longo, Fauci y cols., 2011).

Debido a la información sensitiva que recibe de estas regiones, la médula espinal controla el movimiento voluntario y los reflejos de los músculos de las extremidades del cuerpo y el tronco. También controla los órganos internos del cuerpo, los vasos sanguíneos del tórax, abdomen y pelvis. Por lo anterior, un daño a la médula espinal o a las raíces nerviosas espinales puede afectar la conducción de estas señales y resultar en la pérdida parcial o total de la función motora, sensitiva y/o autonómica por debajo del sitio de lesión (Dumont, Okonkwo y cols., 2001)

I.2. LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (LTME).

Una lesión traumática de médula espinal (LTME) es un evento inesperado y catastrófico que modifica dramáticamente la calidad de vida de las personas que sufren el daño, ocasiona graves afectaciones físicas y emocionales con consecuencias tanto para las personas que sufren la LTME como para su círculo más cercano y la sociedad (**Tabla 1, Fig. 4**) (Rathore, 2010, Post y Van Leeuwen 2012).

Tabla 1. Promedio anual de gastos durante el primer año después de una LTME y cada año posterior, que depende de la severidad de la LTME en Estados Unidos de América.

Severidad de la lesión	Promedio anual de gastos (al valor del dólar en 2014)		Costo estimado por edad post-lesión	
	Primer año	Cada año	25 años de edad	50 años de edad
Tetraplejía alta (C1-C4)	\$1, 129, 302	\$196, 107	\$5, 010, 748	\$2, 753, 822
Tetraplejía baja (C5-C8)	\$816, 019	\$120,303	\$3, 661, 165	\$2, 251, 944
Paraplejía	\$550, 381	\$72, 909	\$2, 450 234	\$1, 608, 015
Funcionalidad motora a cualquier nivel	\$368, 562	\$44, 766	\$1, 674, 072	\$1, 181, 564

Modificado del Centro Nacional de Estadística de la Lesión Medular, Datos y Cifras de un vistazo. Birmingham, AL: Univesidad de Alabama en Birmingham, 2019 (Centro Nacional de Estadística de la Lesión Medular, J Birmingham 2019). LTME = lesión traumática de médula espinal; C1-C4= cervicales 1-4; C5-C8 = cervicales 5-8.

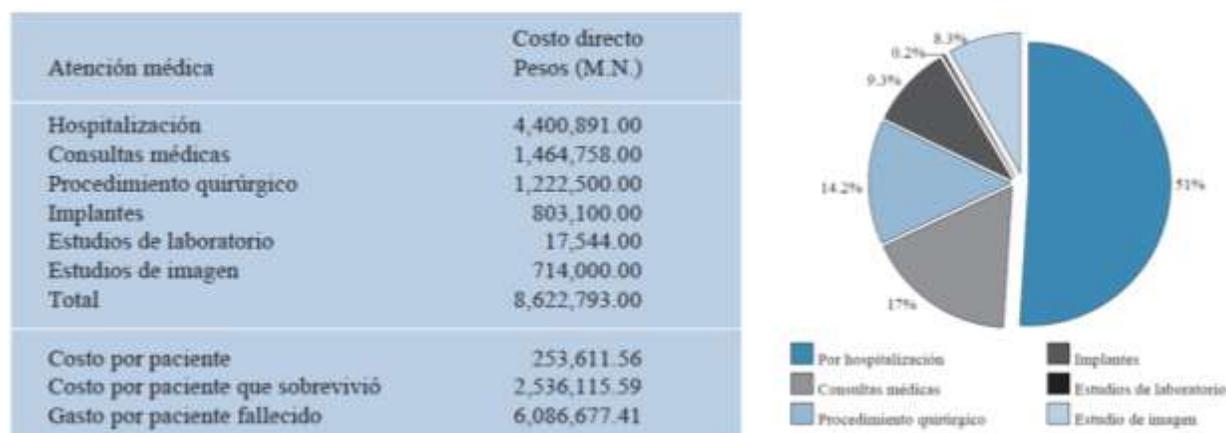


Figura 4. Costo total de la atención médica y quirúrgica en los pacientes con lesión traumática de médula espinal (LTME) y distribución porcentual de los costos por servicios hospitalarios en la Unidad Médica de alta especialidad, Centro Nacional de Occidente, IMSS de Jalisco. Modificado de Jiménez-Ávila y cols., 2012.

La LTME conlleva no solo a un déficit neurológico, sino también a otros problemas de salud, como úlceras por presión, trombosis, espasticidad, contracturas musculares, infecciones frecuentes en las vías urinarias, infecciones intestinales, problemas cardiacos, problemas en las vías respiratorias y dolor (Tator y Fehlings 1991, Dumont, Okonkwo y cols., 2001, Silva, Sousa y cols., 2014). Además, tiene un impacto psicológico y social sobre el comportamiento de los pacientes pues con frecuencia requieren asistencia para moverse, comunicarse y realizar actividades de autocuidado, domésticas y laborales (Officer, Shakespeare y cols., 2014).

Se estima que del 20 al 30% de las personas con LTME muestran signos clínicamente significativos de depresión, ya que la LTME está asociada a la desintegración familiar, la deserción escolar y exclusión laboral, lo que a su vez tiene un impacto negativo en la recuperación funcional y la salud del afectado en general (Officer, Shakespeare y cols., 2014). La mortalidad es particularmente alta durante el primer año posterior a la LTME y el riesgo aumenta con el nivel y la severidad de la lesión (Jiménez-Ávila, Álvarez-Garnier y cols., 2012, Officer, Shakespeare y cols., 2014).

I.3. EPIDEMIOLOGÍA.

En el 2014, la Organización Mundial de la Salud señaló que la incidencia de la LTME oscilaba entre 13 y 53 casos por millón de habitantes, principalmente en personas entre los 20 y los 29 años de edad, dentro de los cuales el sexo masculino era el más afectado y, reportó como principal causa de una LTME a los accidentes vehiculares, seguido de las caídas y los eventos violentos (**Fig. 5A**) (Chen, Tang y cols., 2013, Organización Mundial de la Salud 2014, White y Black 2016). En México, el último dato registrado para la Ciudad de México sobre la incidencia de LTME es de 18.1 casos por millón de habitantes (Pérez, 1998).

En años recientes, algunos hospitales como la Unidad Médica de Alta Especialidad “Hospital de Traumatología y Ortopedia Lomas Verdes”, el Centro Nacional de Rehabilitación y la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, refieren que el sexo masculino aun tiende a dominar las estadísticas, aunque el perfil empieza a cambiar al incluir cada vez más a mujeres (Pérez, Martín del Campo y cols., 2008). En cuanto a la edad de incidencia que se reporta se encuentra entre los 30 a los 40 años y las caídas se encuentran como el principal causante de una LTME, seguido de los accidentes vehiculares y los eventos violentos con armas de fuego (**Fig. 5B**) (Cisneros-Dreinhofer y Hurtado-Padilla 2003, Pérez, Martín del Campo y cols., 2008, Rodríguez-Meza, Paredes-Cruz y cols., 2016, Luna, Mendoza y cols., 2017).

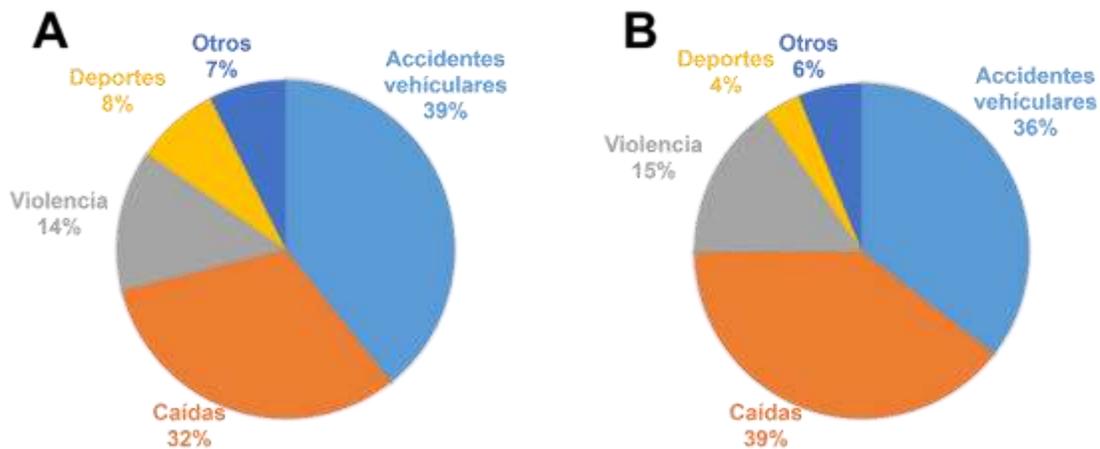


Figura 5. Etiología de la LTME. A. Etiología global. Gráfico modificado de National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2019 (National Spinal Cord Injury Statistical Center J Birmingham 2019). **B. Etiología en México.** Gráfico modificado de Rodríguez Meza MV, y cols., 2016 (Rodríguez-Meza, Paredes-Cruz y cols., 2016).

Pérez y colaboradores en el 2008, reportaron que el riesgo de presentar una LTME completa a partir de la región torácica y la región lumbar o sacra, responsable de la parálisis de las extremidades inferiores (paraplejía), es más alto que el de una LTME incompleta de la misma zona, o una lesión a partir del segmento cervical que incluya la pérdida de la función de las cuatro extremidades (tetraplejía) (**Fig. 6**) (Pérez, Martín del Campo y cols., 2008).

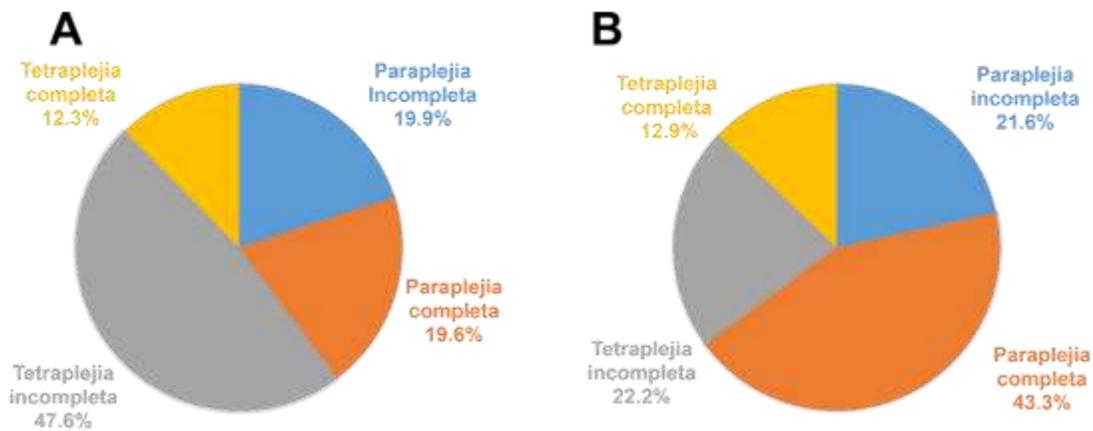


Figura 6. Nivel Neurológico y magnitud de la lesión traumática de médula espinal (LTME). A. Gráfico modificado de National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham (National Spinal Cord Injury Statistical Center J Birmingham 2019). **B. Etiología en México.** Gráfico modificado de Rodríguez Meza MV (Rodríguez-Meza, Paredes-Cruz y cols., 2016).

I. 4. FISIOPATOLOGÍA DE LA LTME.

El daño ocasionado por una LTME se origina a partir de una compresión, contusión, laceración o sección completa de la médula espinal, que es resultado de un evento físico que provoca cambios en la integridad de la columna vertebral, así como en la citoarquitectura de la médula espinal (Quadri, Farooqui y cols., 2020), conocido como lesión primaria.

Durante la lesión primaria, las vértebras de la columna pueden fracturarse o dislocarse y originar fragmentos óseos, materiales de los discos intervertebrales, y/o ligamentos que presionen o desgarren el tejido medular (Dumont, Okonkwo y cols., 2001, Plaza, Pacheco y cols., 2012). En este contexto, la contusión es el mecanismo de LTME más común (Dumont, Verma y cols., 2001, Alizadeh, Dyck y cols., 2019). Sin embargo, independientemente del mecanismo de lesión que ocurra, el flujo sanguíneo se interrumpe y aumenta la permeabilidad neuronal que provoca muerte celular inmediata (necrosis) de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y células precursoras, lo que ocasiona la interrupción de las conexiones neuronales de los tractos ascendentes y descendentes debido a la formación de cavidades quísticas (Horky, Galimi y cols., 2006, Thuret, Moon y cols., 2006)

La respuesta biológica al daño continua segundos después de la lesión primaria y puede durar varias semanas a través de un conjunto de procesos vasculares, bioquímicos y celulares conocidos como lesión secundaria (**Fig. 7**) (Quadri, Farooqui y cols., 2020), a la cual puede dividirse temporalmente en fase aguda, sub-aguda y crónica (Alizadeh, Dyck y cols., 2019).

La fase aguda dura 48 horas e inicia inmediatamente después del evento traumático, a consecuencia del daño vascular generado por la ruptura de los vasos intramedulares y capilares que ocasionan la extravasación de los glóbulos rojos y leucocitos, lo que genera edema y vasoespasmo en los vasos sanguíneos intactos para aumentar la presión tisular como respuesta a la hemorragia (Kim, Ha y cols., 2017). Después de la LTME, el flujo sanguíneo de la sustancia blanca generalmente regresa a los niveles normales, aunque prevalecen múltiples hemorragias en la sustancia gris (Balentine y cols., 1978, Ahuja, Martin y cols., 2016). Durante la etapa de re-perfusión, el pH perivascular disminuye por la acumulación de metabolitos ácidos como el lactato, lo que exacerba la lesión y la muerte celular a través de la generación de radicales libres y productos de la lipoperoxidación (Sandler y Tator 1976).

Entre los radicales libres que se generan por la LTME se encuentran las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente) producidas por la actividad de la enzima NADPH oxidasa (NOX), que en condiciones normales produce superóxido (O_2^-), que también regula funciones vasculares clave como el tono vascular, así como el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación celular mediante la activación de vías de señalización sensibles a redox (Fainstein, Aguilar-Maldonado y cols., 2008). Sin embargo, en presencia de factores de riesgo como lo es la LTME, aumenta su actividad y la producción de ERO, que contribuye a crear una situación de estrés oxidante, lo que altera la función normal del endotelio y disminuye la producción de óxido nítrico (NO), un vasodilatador y protector vascular (Prados, 2016). Así mismo, las ERO y las ERN producidas por la actividad de la NOX y la cadena transportadora de electrones mitocondrial, activan la polimerasa citosólica de poli (ADP ribosa) (PARP) que consume y agota el NAD^+ , lo que provoca el agotamiento del ATP y la muerte celular (Forman y Cadenas 2012).

Del mismo modo, los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, lo que conduce a la peroxidación y alteración de la arquitectura normal de los fosfolípidos de las membranas de orgánulos celulares y subcelulares (Fainstein, Aguilar-Maldonado y cols., 2008, Forman y Cadenas, 2012). La peroxidación lipídica, conduce a la formación de productos aldehídos como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 2-propenal, los cuales son altamente tóxicos para las células, además de deteriorar la función de enzimas metabólicas clave como la bomba sodio (Na^+) potasio (K^+) ATPasa, la cual es crítica para mantener la excitabilidad neuronal (Jamme, Petit y cols., 1995, Cuzzocrea, Riley y cols., 2001). Además de la peroxidación lipídica asociada a las ERO, los aminoácidos están sujetos a un daño oxidante significativo asociado a ERN después de la LTME (Couillard-Despres, Bieler y cols., 2017). Las ERN que contienen peroxinitrito ($ONOO^-$) pueden nitrar los residuos de tirosina de los aminoácidos para formar 3-nitrotirosina (3-NT), un marcador de daño de proteínas mediado por $ONOO^-$ (Hall, 2015).

Debido a la ruptura y/o alteración de las membranas celulares también se libera al espacio extracelular glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del SNC (Poli, 2000). Este neurotransmisor se une a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) y a receptores metabotrópicos, lo que permite el flujo de calcio (Ca^+) para despolarizar la célula y conduce a la generación de un potencial de acción (Mortazavi, Verma y cols., 2015). Las neuronas

normalmente se recuperan rápidamente de la excitación inducida por glutamato, restauran sus gradientes de iones transmembranales, reponen los sustratos energéticos y eliminan las ERO formadas durante el proceso (Poli, 2000). Sin embargo, esta recuperación depende de la función adecuada de las mitocondrias para generar ATP y amortiguar el flujo de Ca^{2+} , lo que no ocurre durante la LTME, ya que los receptores NMDA son activados por las altas concentraciones de glutamato lo que a su vez provoca el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Forman y Cadenas 2012), con lo que se afecta la respiración mitocondrial y el consumo de ATP e inhabilita la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ que invierte el gradiente glutamato dependiente de Na^+ para transferir glutamato a las células (Poli, 2000). El exceso de Na^+ entonces, permite la entrada de más Ca^{2+} , las neuronas se despolarizan y resulta en la entrada de Cl^- y agua en las células junto con más Na^+ , lo que conduce a la formación de edema (Mortazavi, Verma y cols., 2015).

El período subagudo dura hasta dos semanas después de la LTME (Kim, Ha y cols., 2017), en el cual, además de incluir todos los procesos que se desarrollan durante la fase aguda, se agregan la pérdida del volumen parenquimatoso y la formación de cavitaciones microquísticas llenas de líquido, que se fusionan de forma gradual y crean cuerpos más grandes en las fases subaguda-crónica, con ello se forma una barrera física para la migración celular y los intentos de regeneración endógena (Donnelly y Popovich 2008, Hachem, Ahuja y cols., 2017, Alizadeh, Dyck y cols., 2019). Otra de las características, es la proliferación de astrocitos reactivos, los cuales incrementan la producción de citosinas, promueven el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y moléculas pro-inflamatorias al sitio de lesión de la médula espinal y favorecen la formación de un entretejido que puede actuar como barrera física que limita la regeneración en la médula espinal (Okada, Hara y cols., 2018, Wang, Song y cols., 2018).

El proceso apoptótico ocurre de manera tardía en áreas más distantes al sitio de la lesión, por lo general 4 h después de la LTME y alcanza un pico a los 7 días post-lesión. Sin embargo, puede observarse durante semanas después de la LTME y afectar principalmente a los oligodendrocitos, aunque también puede afectar a los astrocitos y a la microglia (Beattie, Farooqui y cols., 2000, Alizadeh, Dyck y cols., 2019).

A pesar de que existe un debate para definir cuándo empieza la fase crónica, se considera que es a partir de los 6 meses (Kim, Ha y cols., 2017). En esta fase se observan cambios

adicionales a los ya descritos como es la formación de cavidades quísticas, muerte axonal regresiva y maduración de la cicatriz glial (Tran, Warren y cols., 2018). Con la pérdida de mielina, los axones quedan expuestos al daño generado por radicales libres y citocinas, esta desmielinización retarda la conducción del impulso nervioso y por tanto, genera una comunicación ineficiente interneuronal (McTigue, 2008).

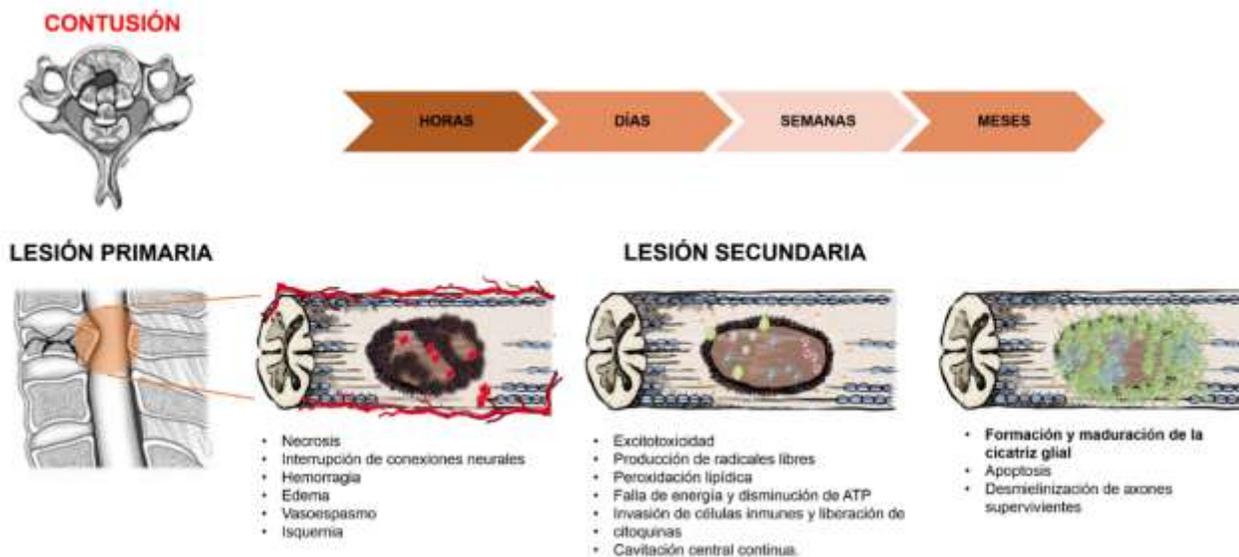


Figura 7. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal. Traumatismo de mayor frecuencia (contusión) y mecanismos fisiopatológicos de la lesión traumática de la médula espinal (LTME) con los diferentes procesos vasculares, celulares y bioquímicos que contribuyen al déficit funcional (Oyinbo, 2011). Imágenes modificadas de Basic biomechanics of spinal cord injury. How injuries happen in people and how animal models have informed our understanding (Mattucci, Speidel y cols., 2019).

I. 5. REGENERACIÓN Y PLASTICIDAD DE LA MÉDULA ESPINAL.

Durante el desarrollo, las neuronas expresan factores promotores de crecimiento, al mismo tiempo que se encuentran rodeadas por una matriz extracelular compuesta por glucoproteínas, proteoglicanos, tenascinas, semaforinas e integrinas, que ayudan a regular el crecimiento axonal (Wiese y Faissner 2015). Además, estas moléculas ayudan a la plasticidad sináptica a través del brote, crecimiento, guía y formación de nuevos contactos (Quraishe, Forbes y cols., 2018). A medida que madura el SNC, las sinapsis se reducen y solo aquellas sinapsis que tienen relevancia funcional se mantienen y fortalecen en la edad adulta. Así mismo, los componentes de la matriz extracelular se fusionan y forman redes perineuronales alrededor

del cuerpo celular y las dendritas proximales para estabilizar y evitar la formación de nuevas sinapsis (Bradke, Fawcett y cols., 2012, Wiese y Faissner 2015, Quraishe, Forbes y cols., 2018).

Cabe destacar que el crecimiento y posterior elongación axonal es debido a los conos de crecimiento que se encuentran en los extremos terminales de las neuronas y que es justo ahí donde convergen los factores intrínsecos y extrínsecos que promueven el crecimiento axonal (Blanquie y Bradke 2018). A diferencia de las neuronas que se originan durante el desarrollo, los axones dañados de las neuronas sobrevivientes a la LTME, se retraen del sitio de lesión y forman terminales axónicas con diferente morfología, la cual suele ser terminaciones grandes y edematizadas, cuyo citoesqueleto se encuentra colapsado y presenta acumulaciones membranales de organelos subcelulares (Bradke, Fawcett y cols., 2012, Hill, 2017). Estos bulbos de retracción como se les conoce, se forman desde la fase aguda y persisten hasta la fase crónica (Hill, 2017).

Por su parte, las mismas moléculas que promovieron el crecimiento durante el desarrollo ahora tienen efectos inhibidores y pueden evitar la formación de nuevos conos de crecimiento y restringir el crecimiento axonal y/o el contacto con las células blanco lo que limita la capacidad regenerativa de la médula espinal (Tom, Steinmetz y cols., 2004) ya que por ejemplo, los proteoglicanos secretados por los astrocitos, limitan la plasticidad estructural, mientras que las proteínas promotoras del crecimiento como las integrinas, tenascinas y las semaforinas, se encuentran reguladas de forma negativa y ausentes en el axón, lo que evita que los conos de crecimiento formen nuevos contactos sinápticos y en su lugar originen bulbos terminales distróficos (Wiese, Karus y cols., 2012, Wiese y Faissner 2015).

La complejidad del proceso fisiopatológico disminuye la capacidad de regeneración y/o plasticidad del tejido dañado, pues las neuronas que sobrevivieron a los procesos de lesión secundaria, deben estabilizar las terminaciones axónicas lesionadas como primer paso (Quraishe, Forbes y cols., 2018) y para hacerlo, estas terminales axónicas necesitan reorganizar su estructura, sellar sus membranas para evitar un daño mayor y luego, deben de modificar su función, es decir, en lugar de ser un axón que transmita información entre las células, ahora debe constituir un cono de crecimiento dinámico, necesario para que el axón crezca en respuesta a las señales extrínsecas (Spira, Benbassat y cols., 1993, Bradke,

Fawcett y cols., 2012). Estos cambios, requieren la síntesis y reciclaje de proteínas de citoesqueleto, como la actina y la tubulina, además de proteínas de unión reguladoras asociadas, como la proteína de crecimiento axonal 43 (GAP-43) (Storer y Houle 2003, Kusik, Hammond y cols., 2010) y que las proteínas innecesarias o dañadas se degraden. Una vez formado el cono axonal, debe crecer y hacer contacto con su neurona blanco y el axón tiene que ser funcional, es decir, necesita formar sinapsis en la superficie de las neuronas con las que se reconecta (Hill, 2017).

El crecimiento axonal y la fasciculación pueden ser inducidos por moléculas expresadas en otros axones en regeneración o por axones supervivientes y mediante moléculas de soporte expresadas por células reactivas como los astrocitos (Cafferty, McGee y cols., 2008). Muchos de estos efectores parecen expresarse en el cono de crecimiento a través de un mecanismo común que involucra la regulación de mensajeros intracelulares y la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} (Gomez y Spitzer 1999, Chierzi, Ratto y cols., 2005, Mahar y Cavalli 2018). Los cambios en los niveles de mensajeros intracelulares, como los nucleótidos cíclicos AMP y GMP y el trifosfato de inositol pueden modular la respuesta de un cono de crecimiento y modificar el estado de fosforilación de las proteínas asociadas al citoesqueleto, lo que puede conducir al crecimiento de axones o al colapso de los mismos (**Fig. 8**) (Horner y Gage 2000, Qiu, Cai y cols., 2000, Kusik, Hammond y cols., 2010, Tischfield, Baris y cols., 2010).

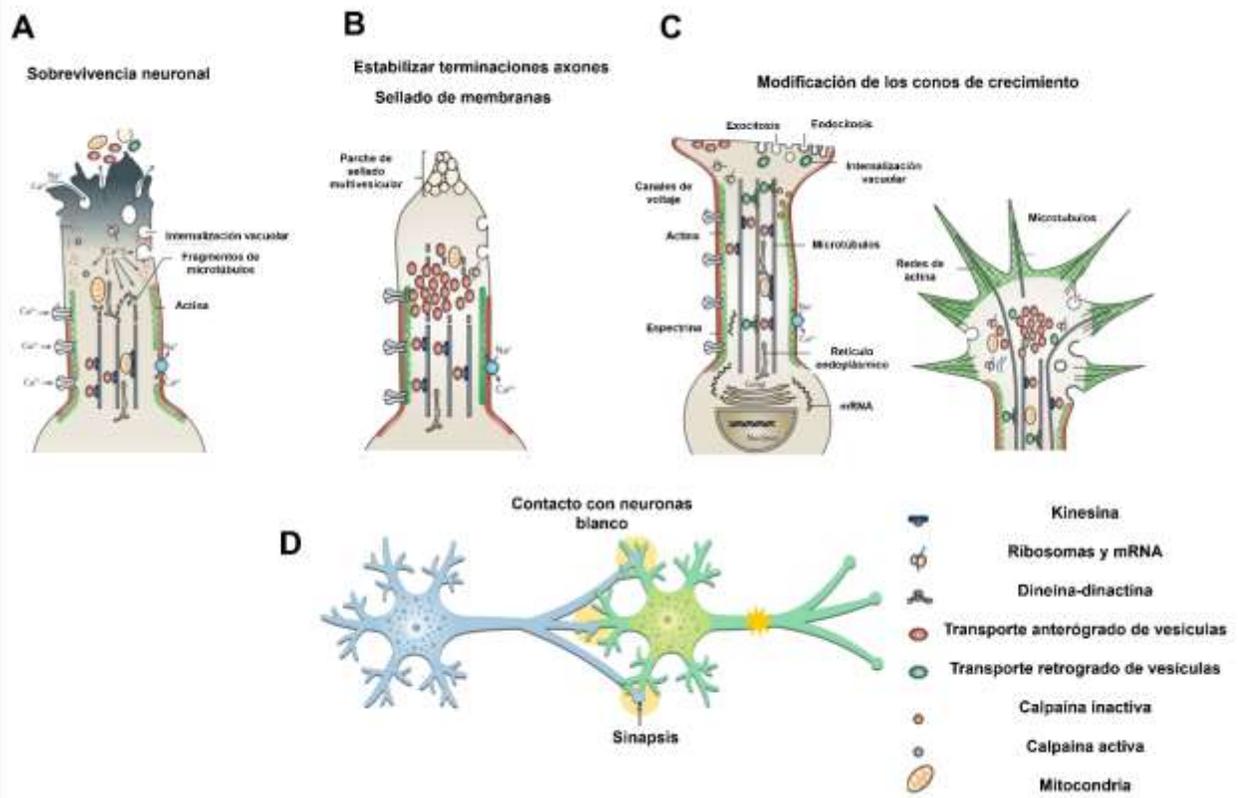


Figura 8. Elementos para la regeneración axonal. A. Pérdida del cono de crecimiento y componentes que participan para estabilizar la terminal axónica después de la LTME. B. El extremo cortado se vuelve a sellar mediante el colapso de la membrana y la acumulación de vesículas para formar un parche de sellado. C. Modificación y reconstrucción del cono de crecimiento, los filamentos de actina se ensamblan para generar la fuerza mecánica. Los microtúbulos se polimerizan y apuntan sus extremos positivos hacia la membrana plasmática. D. Contacto con la célula blanco y sinápsis. Modificada de Regenerating the damaged central nervous system (Horner y Gage 2000) y tomado de Klipatz 2020.

La formación de la cicatriz glial como una barrera física, también limita la regeneración axonal, debido a que diferentes moléculas inhibitorias del crecimiento axonal pueden expresarse después de la LTME, como la semaforina III/ colapsina I que es un quimio-repelente axonal, los inhibidores de crecimiento axonal sulfato de condroitina y queratina, y el proteoglicano NG2 que es expresado por células de la glía. Los astrocitos reactivos pueblan densamente los bordes del epicentro de la lesión, se hipertrofian y regulan fuertemente la expresión de proteínas de filamentos intermedios como la proteína ácida fibroglial (GFAP), nestina y vimentina, que evitan el crecimiento axonal a través del sitio de lesión (Bradbury y Burnside 2019). Los astrocitos que conforman la cicatriz glial, también pueden contribuir a la

restauración de la homeostasis del microambiente y al restablecimiento de la integridad de la barrera hematoespinal, lo cual es importante para contrarrestar el edema. Inhibir la formación de conexiones aberrantes y, ayudar en la regulación del proceso de regeneración al producir una variedad de citocinas como el factor de crecimiento transformante (TGF- β), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF- β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Más aún, algunos de estos factores pueden facilitar la migración de células precursoras de oligodendrocitos, así como su proliferación y diferenciación (Kawano, Kimura-Kuroda y cols., 2012, Bradbury y Burnside 2019). El factor de transcripción antiapoptótico bcl-2 también juega un papel importante en la plasticidad y la regeneración axonal después de una LTME (Davies, 1995).

La cicatriz glía, también limita la filtración de células inmunes provenientes del sistema nervioso periférico. En este contexto, se ha especulado sobre el dualismo de la respuesta inmune en la LTME, por un lado, puede incrementar el daño y causar necrosis progresiva, pero por otro lado, varios investigadores han sugerido que el sistema inmune puede ser protector e incluso ayudar a la regeneración (Bradbury y Burnside, 2019). Se ha sugerido que las células de la microglia, de alguna manera pueden orquestar la recuperación de las células que durante la LTME no han entrado en procesos de apoptosis y favorecer que sus axones se regeneren eventualmente. Otro proceso que debe tomarse en consideración es que, después de la LTME se liberan citosinas involucradas en procesos de reparación que resulta en la preservación de tejido nervioso y en el aumento de los brotes neuronales (Wiese, Karus y cols., 2012). Aunado a lo anterior, se ha descrito que los macrófagos pueden favorecer el proceso de recuperación funcional después de la LTME (Kobayakawa, Ohkawa y cols., 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que el cerebro (Gage, 2000) y la médula espinal maduros, contienen células madre que se dividen continuamente durante la vida adulta, las cuales se encuentran, en el caso de la médula espinal, tanto en el canal ependimario como en las meninges (Horner, Power y cols., 2000). En estas regiones, la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células madre neurales se ve afectada en grado variable por las lesiones, incluidos los accidentes cerebrovasculares y los traumatismos (Quadrato y Di Giovanni, 2013). De tal forma que las funciones motoras, sensitivas y autonómicas pueden recuperarse en diferente grado, tanto en animales como en humanos a pesar de la severidad de la LTME, el nivel de lesión y si se trata de una lesión completa o incompleta. Sin embargo, la regeneración

puede ser limitada, abortiva o aberrante y producir disfunciones importantes y reacciones adversas o dolorosas (Onifer, Smith y cols., 2011). Estudios recientes han demostrado que la génesis celular y la plasticidad sináptica de estas células madre pueden ser influenciadas por el estrés, un ambiente enriquecido y el ejercicio físico (Kempermann, Kuhn y cols., 1997, Gould y Tanapat 1999, Van Praag, Kempermann y cols., 1999, Horner y Gage 2000) lo que promueve la re-expresión en el adulto de una serie de factores de transcripción y cofactores regulados por el desarrollo dentro de las vías de señalización que desempeñan un papel clave tanto en el brote colateral de los axones intactos o lesionados, como en la regeneración axonal y alteran las propiedades de los circuitos neuronales, como resultado de la neurogénesis del adulto (Onifer, Smith y cols., 2011, Quadrato y Di Giovanni 2013).

Por lo anterior, la manipulación de la expresión de factores intrínsecos y extrínsecos puede ser importante para estimular a una célula a reingresar al modo de crecimiento y así favorecer la regeneración del sistema dañado.

I.6. TRATAMIENTO DE LA LTME.

Se han realizado numerosas investigaciones entorno al desarrollo de alternativas terapéuticas, que ayuden a contrarrestar el daño generado por el traumatismo y por los mecanismos secundarios de lesión, que contribuyen a la pérdida de tejido y al déficit funcional (Faden y Stoica 2007, Shah, Peterson y cols., 2020). Dichas estrategias se conocen como neuroprotectoras, porque tratan de limitar el daño y de mantener y proteger a las células que lograron sobrevivir a la LTME (Faden y Stoica 2007, Steeves, Fawcett y cols., 2007) al contrarrestar diferentes procesos de la fisiopatología de la LTME (**Tabla 2**).

Tabla 2. Estrategias experimentales de neuroprotección para el tratamiento de la lesión traumática de médula espinal.

Autor	Tratamiento	Mecanismo sugerido	Resumen de resultados
Bracken, Shepard y cols., 1997, Bracken 2002	Metilprednisolona (MPSS)	Reduce la peroxidación lipídica. Disminuye la inflamación postraumática.	Sin significancia estadística sobre la recuperación (pero aún se utiliza en algunos centros). Sometidos a ensayos combinados.
Bracken, Shepard y cols., 1990	Naloxona	Inhibe el efecto neurotóxico del opioide endógeno dinorfina A.	No hay evidencia de recuperación motora en las escalas NASCIS o ASIA.
Anderson, Hall y cols., 1991, Koc, Akdemir y cols., 1999	Tirilazad	Disminuye la peroxidación lipídica de las membranas neuronales.	No hay evidencia de recuperación funcional en la escala motora NASCIS o ASIA cuando se compara con la administración de MPSS 24 h.
Fehlings, Tator y cols., 1989, Pointillart, Gense y cols., 1993	Nimodipino	Bloquea los canales de calcio y previene la activación de las enzimas apoptóticas. Reduce la isquemia postraumática. Bloquea la liberación del glutamato presináptico.	No hay evidencia de recuperación locomotora.
Festoff, Ameenuddin y cols., 2006, Casha, Zygun y cols., 2012	Miociclina	Forma modificada de la tetraciclina (antibiótico). Disminuye la inflamación y la apoptosis neuronal. Disminuye la activación microglial.	Estudios fase 2 mostraron recuperación funcional con un puntaje de 14 en la escala BBB. Los estudios fase 3, no se han realizado.
Fehlings, Wilson y cols., 2012, Grossman, Fehlings y cols., 2014	Riluzol	Bloquea canales de sodio y disminuye la liberación de glutamato dependiente. Disminuye el daño neuronal.	Estudios fase 1 completados, muestras recuperación de 15.5 en la escala motora. Estudios fase 2 y 3 se en curso.
Diaz-Ruiz, Salgado-Ceballos 2011, Ríos, Orozco-Suarez 2015	Dapsona	Inhibe la enzima mieloperoxidasa. Tiene efecto antiapoptótico.	Favorece la preservación del tejido después de una LTME Favorece la recuperación funcional.

Por otro lado, también se han estudiado alternativas terapéuticas enfocadas en favorecer la neurorregeneración y/o la neuroplasticidad mediante el reemplazo de las células que murieron por necrosis o apoptosis; este tipo de estrategias además buscan favorecer el crecimiento de axones, fortalecer las conexiones funcionales existentes se fortalezcan y reestablecer las sinapsis que restauren los circuitos neuronales requeridos para la recuperación funcional (Medicine, 2005, Steeves, Fawcett y cols., 2007).

Para lograr lo anterior, se ha probado el reemplazo celular, administración de factores neurotróficos, promoción de la guía axonal, eliminación de procesos de inhibición del

crecimiento axonal, manipulación de la señalización intracelular, puentes y sustratos artificiales, así como la modulación de la respuesta inmune (**Tabla 3**) (Horner y Gage 2000). En este contexto, los biomateriales ofrecen múltiples ventajas para el tratamiento de la LTME debido a las características fisicoquímicas que poseen, pueden emplearse como sustratos de soporte celular, regeneración y crecimiento dendrítico para controlar la respuesta inflamatoria y evitar la muerte celular. Se utilizan además, como electrodos para estimular el crecimiento axonal, direccionar las neuronas y como liberadores de fármacos (**Tabla 3**) (Onifer, Smith y cols., 2011).

Algunos de los tratamientos probados han llegado o están cercanos al desarrollo de estudios clínicos (Steevesa y cols., 2012, Medicine, 2020). Sin embargo, hasta el momento no hay tratamientos clínicos eficaces y confiables disponibles y aceptados por la FDA, COFEPRIS o algún otro organismo regulador en materia de salud, para los pacientes con LTME.

Aunado a lo anterior, el manejo hospitalario ante una LTME, sólo incluye los procedimientos quirúrgicos habituales como la estabilización de la columna vertebral y la descompresión de la médula espinal (Fehlings, Vaccaro y cols., 2012, Ahuja, Martin y cols., 2016), por lo que la oportunidad de brindar un tratamiento efectivo dentro de las primeras horas posteriores al evento traumático y evitar la progresión de los eventos secundarios, disminuye la posibilidad de recuperar la funcionalidad, y deja a los pacientes con parálisis total de por vida sin posibilidad de tratamiento y recuperación (Organización Mundial de la Salud 2014, Hachem, Ahuja y cols., 2017).

A la fecha, la rehabilitación física (RB) se considera como la única alternativa terapéutica aceptada para el tratamiento de la LTME, ya que puede generar patrones motores coordinados oscilantes y es capaz de promover la plasticidad de la médula espinal (**Tabla 3**) (Sandrow-Feinberg y Houlé 2015, Hachem, Ahuja y cols., 2017).

Tabla 3. Estrategias experimentales neuroregeneradoras para el tratamiento de la lesión traumática de médula espinal.

Autor	Tratamiento	Mecanismo sugerido	Resumen de resultados
Farmacéuticos			
Takahashi, Yamazaki y cols., 2012, Kamiya, Koda y cols., 2015	Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).	Inhibe el TNF- α y la interleucina-1 β . Promueve la supervivencia celular.	Estudios clínicos fase 1 y 2A han demostrado beneficiar la recuperación motora (ASIA).
Geisler, Coleman y cols., 2001	Gangliósido GM-1 (Singen).	Favorece la regeneración axonal.	Estudio aleatorizado controlado, no mostró beneficios.
Fehlings, Theodore y cols., 2011	Cetrina Toxina derivada de bacterias, BA-210.	Promueve el crecimiento axonal.	Estudios fase 1 y 2A Recuperación locomotora (ASIA).
Sartori, Hofer y cols., 2020	Anti-Nogo Anticuerpo monoclonal que se une e inhibe la proteína Nogo.	Bloquea el crecimiento axonal a través de la activación de la vía Rho. Promueve la regeneración axonal.	Actualmente en fase inicial de ensayos clínicos.
Segal, Pathak y cols., 1999, Grijalva, Guízar-Sahagún y cols., 2003, Grijalva, García-Pérez y cols., 2010	4-Aminopiridina.	Inhibe los canales de potasio.	Favorece la recuperación neurológica.
Trasplantes celulares			
Dalamagkas, Tsintou y cols., 2018, Nakhjavan-Shahraki, Yousefifard y cols., 2018, Jin, Medress y cols., 2019, Buzoianu-Anguiano, Rivera-Osorio y cols., 2020	Células mesenquimales. Células de bulbo olfatorio. Nervio periférico. Células de Schwann. Macrófagos activados. Células madre neuronales.	Son precursores de la regeneración neuronal. Inducen la remielinización. Favorecen la elongación axonal. Promueven la regeneración de los tractos nerviosos.	Estudios clínicos fase 1 mostraron resultados prometedores, sin embargo, los ensayos de la fase 2 y 3 están aún bajo consideración.
Neuromodulación			
Bouton, Shaikhouni y cols., 2016, Ajiboye, Willett y cols., 2017, James, McMahon y cols., 2018	Estimulación epidural o transcutánea en la médula espinal. Estimulación cerebral (estimulación transcraneal de corriente continua y estimulación magnética transcraneal).	Mejora las conexiones y circuitos neuronales dentro de la médula espinal en los tractos intactos restantes.	Mejoran la recuperación funcional.
Biomateriales			
Yang, Laporte y cols., 2009	2- hidroxi-etil metacrilato (pHEMA).	Reduce la acumulación de GFAP.	El material no se integra al tejido.
Horn, Beaumont y cols., 2007, Khaing, Milman y cols., 2011	Ácido hialurónico combinado con BDNF.	Permite el crecimiento axonal organizado.	Favorecen la recuperación locomotora.

Caron, Rossi y cols., 2016	Agarosa/ hidrogeles de carbomero combinado con células mesenquimales o schwann.	Incrementa la población de macrófagos M2.	Permite el crecimiento axonal organizado.
Patel, Joseph y cols., 2010	Colágena combinado con células schwann y laminina.	Evita la migración de astrocitos hacia el tejido huésped Permite el aumento del número de neurofilamentos positivos	Mejor supervivencia celular a largo plazo, favorece la vascularización, rebrote axonal, e infiltración.
Samadikuchaksaraei y Rehabilitation 2007.	Poly-etilen glicol (PEG).	Repara las membranas celulares y revierte la permeabilización de la membrana. Inhibe la producción de radicales libres y disminuye el estrés oxidante.	Reduce la cavitación cística. Previene la extensión del daño en el tejido. Mejora la recuperación funcional. El uso prolongado induce el bloqueo de la conducción.
Álvarez-Mejía y cols., 2015; Mondragón-Lozano y cols., 2017	PPy/I	Actúa sobre la respuesta inflamatoria.	Mejora la recuperación funcional.
Rehabilitación			
Cruciger, Schildhauer y cols., 2016, Gorgey, 2018)	Dispositivos protésicos. Actividad Física.	Estimula precursores para la regeneración neuronal. Favorece la remielinización inducida por oligodendrocitos. Promueve la elongación axonal. Favorece la regeneración de los tractos nerviosos. Proveen asistencia física. Favorece la recuperación de la actividad física a cierto nivel. Permite el mejoramiento en la salud cardiovascular y diferentes parámetros de marcha.	Mejora los resultados funcionales y la restauración de cierto nivel de actividad física.

Tomado de (Samadikuchaksaraei y Rehabilitation 2007, Steeves, Fawcett y cols., 2007, Silva, Sousa y cols., 2014, Ashammakhi, Kim y cols., 2019, Shah, Peterson y cols., 2020).

La RB puede prevenir la aparición de complicaciones a largo plazo, ya que durante el período agudo, realizar ejercicios pasivos de manera intensa puede evitar las contracturas, la atrofia muscular y el dolor, pues la posición de las articulaciones es importante para proteger la estructura articular, mantener el tono muscular óptimo y evitar la rigidez (Chi, 2009). Si el paciente es parapléjico o tetrapléjico, los ejercicios intensivos pasivos de rango de movimiento

(ROM) y estiramiento son necesarios para mantener tróficas las extremidades inferiores. Estos ejercicios deben realizarse por lo menos una vez al día si la extremidad esta flácida y, al menos dos o tres veces al día en presencia de espasticidad, para prevenir las contracturas y favorecer la funcionalidad de las mismas (Diong, Harvey y cols., 2012).

Los ejercicios isométricos activos o activo-asistidos, deben realizarse a los pacientes que aún se encuentran en cama si presentan movimientos parciales y según del nivel de daño. Estudios recientes han demostrado que la movilización temprana juega un importante papel importante en la prevención del declive de la función pulmonar, por lo que deben llevarse a cabo ejercicios de respiración tanto en pacientes parapléjicos como en tetrapléjicos con LTME completa, a fin de proteger la capacidad pulmonar (Jia, Kowalski y cols., 2013). Además, durante la fase aguda, los ejercicios que promueven la fuerza muscular son muy importantes en pacientes parapléjicos y pueden aplicarse en la cama con ayuda de pesas, según de la fuerza muscular del paciente. Estos ejercicios de fuerza y resistencia, permiten el uso posterior de muletas, bicicletas eléctricas, caminadoras y andaderas y, facilita la realización de actividades como la natación (Jacobs y Nash 2004).

Durante la fase subaguda de la RB, se trabaja con ejercicios enfocados en promover la estabilidad y la correcta posición, pues es común que los pacientes con LTME que pasan períodos largos acostados en cama, sufran de hipotensión ortostática y síncope debido a bajas en la presión sanguínea. Por lo anterior, los pacientes deben realizar ejercicios entre 3 o 4 veces al día y cambiar de posición hasta sentarse y mantener el balance en esa posición (Brick, 2014, Nas, Yazmalar y cols., 2015). Las sillas de ruedas son importantes en esta etapa, para cuyo uso también se puede realizar RB neuromuscular funcional que permite estimular las fibras musculares del tronco y de las extremidades inferiores, lo que permite a los pacientes modificar sus posturas con un esfuerzo mínimo e incrementar el volumen muscular gradualmente (Audu, Nataraj y cols., 2011).

Durante la fase crónica de la LTME, el objetivo principal de la RB es lograr la movilización independiente, tanto para pacientes parapléjicos con lesión incompleta como completa. Los pacientes deben de ser capaces de caminar 50 m sin ayuda o con dispositivos de asistencia, el ejercicio en caminadora con soporte de peso corporal, el entrenamiento robótico y la natación, son ejemplos de las terapias que se utilizan en este tipo de pacientes y que permiten

mejorar la función locomotora (Kirshblum, Priebe y cols., 2007). La expectativa más importante en esta fase es que el paciente alcance la máxima independencia posible que permita su reintegración a la sociedad (Nas, Yazmalar y cols., 2015).

De igual forma, se utilizan terapias ocupacionales que permitan a los pacientes sociabilizar, desarrollar al máximo sus capacidades y lidiar con los problemas psicológicos como la depresión, que se presentan a causa de la LTME. Este tipo de terapias dirigidas al ámbito psicosocial, ayuda a los pacientes a encontrar un rol en la sociedad, a sentirse productivos y con un propósito de vida (Youngstrom, 2002, Nas, Yazmalar y cols., 2015).

Actualmente, los estudios experimentales y los ensayos clínicos, abordan diferentes aspectos de la RB con la finalidad de establecer el tipo de entrenamiento que mejor favorezca la recuperación funcional ante una LTME (**Tabla 4**), ya que las personas con esta patología pueden presentar respuestas fisiológicas atípicas al ejercicio como una frecuencia cardíaca anormal, lo que puede limitar su capacidad para mantener la actividad (Nas, Yazmalar y cols., 2015). Se debe tomar en cuenta que, una terapia de RB inapropiada también podría ser perjudicial y originar lesiones de tipo muscular, fracturas, disreflexia autónoma como hipertermia, entre otras (Paker, Soy y cols., 2006).

Tabla 4. Terapias de rehabilitación para pacientes con lesión traumática de médula espinal.

Autor	Tratamiento	Resumen de resultados
Liu, Keeler y cols., 2010	Ejercicio de ciclismo en bicicleta estática o robotizada.	Incrementa los niveles de miR21 y disminuye los niveles de miR15b que se correlacionan con los cambios en la expresión de sus genes diana: genes pro apoptóticos (disminución de PTEN, PDCD4 y ARNm de RAS) y anti-apoptóticos (aumento de ARNm de Bcl-2). Disminuye el ARNm para caspasa-7 y caspasa-9 y reduce los niveles de la proteína caspasa-7.
Singh, Balasubramanian y cols., 2011, Alvarez-Mejia, Morales y cols., 2015	Caminadora	Acelerado recuperación locomotora Mejora las propiedades del reflejo H Reduce la atrofia muscular Disminuye el brote de fibras aferentes de pequeño calibre Preserva el tejido nervioso Disminuye las células inflamatorias
Girgis, Merrett y cols., 2007	Alcance	Expande el área cortical donde los movimientos de la muñeca podrían ser provocados por micro estimulación.

		Aumenta el brote colateral de fibras CST lesionadas rostrales. Aumenta los niveles corticales de GAP-43.
Fisahn, Aach y cols., 2016	Entrenamiento de exoesqueleto	No existe un beneficio constante de la rehabilitación con un exoesqueleto versus una variedad de métodos convencionales en pacientes con LTME crónica.
Gerasimenko, Gorodnichev y cols., 2015	Estimulación eléctrica transcutánea	Puede neuromodular los circuitos espinales y favorecer la recuperación motora.
Frye, Ogonowska-Slodownik y cols., 2017, Marinho-Buzelli, Zaluski y cols., 2019	Terapia acuática	Beneficia los aspectos multidimensionales de la salud de las personas con LTME. La presión del agua (hidrostática) mejora los receptores sensoriales. Reduce el edema. El agua tibia ayuda con los espasmos musculares, promueve relajación y aliviar el dolor.

Definición de abreviaturas: Micro ácido ribonucleico 21 (miR21), micro ácido ribonucleico (miR15b), fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), proteína 4 de muerte celular programada (PDCD4), ácido ribonucleico mensajero (ARNm), tipo de proteínas G señalizadora (RAS), linfoma de células B tipo 2 (Bcl-2), tracto corticoespinal (CST), proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43) y lesión traumática de médula espinal (LTME).

A pesar de la gran cantidad de estrategias terapéuticas que existen para el tratamiento de la LTME, estas se encuentran aún en fase experimental y, los ensayos clínicos aún están etapas iniciales, como se mencionó previamente y, a pesar de que existe una mayor comprensión del proceso fisiopatológico de la LTME, para fines prácticos, no existe hasta la fecha un tratamiento aprobado por la FDA o algún otro organismo regulatorio de salud con reconocimiento internacional que haya aprobado algún tratamiento, además de la RB, que pueda ser aplicado en pacientes con LTME.

Aunado a lo anterior, parece ser que una sola estrategia terapéutica no es suficiente para alcanzar una recuperación funcional adecuada en pacientes con una LTME, por lo que las terapias combinatorias podrían ser una estrategia más efectiva para promover la recuperación de las funciones perdidas a causa de una LTME (Silva, Sousa y cols., 2014).

II. ANTECEDENTES

II. 1. POLIPIRROL/YODO COMO TRATAMIENTO DE LA LTME

El polipirrol (PPy) es uno de los materiales conductores más investigados para sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos, ya que posee una buena conductividad eléctrica, biocompatibilidad, alta estabilidad eléctrica y es fácil de sintetizar (Guimard, Gomez y cols., 2007). Ha sido estudiado previamente como biomaterial promotor de la proliferación y diferenciación celular en tejido hepático, se ha utilizado como material de soporte para la fabricación de músculos artificiales y también se ha visto que favorece el crecimiento neurítico y axonal (Schmidt, Shastri y cols., 1997, Huang, Yin y cols., 2014).

Con la finalidad de modificar algunas de las propiedades fisicoquímicas que posee este polímero como la conductividad y estabilidad eléctrica a fin de incrementar los beneficios observados y descritos previamente, el PPy se ha combinado con otros polímeros o moléculas, como el policarbolactona fumarato (PCLF) y las nanofibras de ácido poliláctico (PLGA), que en estudios *in vitro*, en cultivos celulares, demostró que además de mantener la conductividad eléctrica, incrementa significativamente el crecimiento neurítico y la longitud de las neuritas (Lee, Bashur y cols., 2009). Otros materiales empleados en conjunto con el PPy, son las películas de poli 2-metoxianilina-5 ácido sulfónico (PMAS), el proteoglicano condroitin sulfato (CS), el ácido hialurónico (HA) y el ácido para-toluensulfónico (Pts), en los que se comprobó que la rugosidad de la superficie es importante para la adhesión y diferenciación de células del músculo esquelético, en el caso del PPy+PMAS y del PPy+CS (Moroder, Runge y cols., 2011). Así mismo, se realizó un estudio donde se incorporó neurotrófina 3 (NT-3) durante la síntesis del PPy y, se estudió además la liberación de dicha proteína. Los resultados mostraron que la NT-3 tiene un efecto significativo durante la síntesis electroquímica de PPy, ya que afecta muchas de las propiedades del polímero incluyendo las características de la superficie, la electroactividad y la biocompatibilidad (Thompson, Moulton y cols., 2011).

Otro elemento utilizado para la síntesis de PPy es el anión yodo (I_2) el cual incrementa significativamente la conductividad del PPy cuando el método que se utiliza para la síntesis es por plasma (Cruz, Morales y cols., 1999). El plasma es un gas parcialmente ionizado que contiene iones positivos y negativos, electrones, fotones, especies neutras y moléculas excitadas que cuando colisionan se desprenden más electrones, que a su vez colisionan y se

genera un plasma, el cual puede regresar a su estado basal cuando la ionización o excitación se deja de aplicar (Chu, Chen y cols., 2002, Morales Corona, Pérez Tejada y cols., 2008). Al final se produce una recombinación de los elementos que fueron separados durante el proceso (Orozco, 2007). Los materiales sintetizados a partir del plasma son diferentes de los polímeros sintetizados por métodos convencionales (químicos o electroquímicos), por lo que constituyen una nueva especie de materiales (Morales Corona, Pérez Tejada y cols., 2008).

En reportes anteriores, nuestro grupo de investigación, ha reportado que el PPy/I es un polímero semiconductor que puede ser colocado 48h después de una LTME, el cual es biocompatible con el tejido de la médula espinal (Olayo, Ríos y cols., 2008), posee actividad neuroprotectora, pues contrarresta procesos dañinos como la inflamación (Álvarez-Mejía, Salgado-Ceballos y cols., 2015) e incrementa la conducción nerviosa evaluada a través de potenciales evocados somatosensoriales (Cruz, Mondragon-Lozano y cols., 2012), lo cual contribuye a la recuperación funcional después de la LTME. Sin embargo, y aunque nuestro grupo de investigación ha reportado que la aplicación del PPy/I es suficiente para favorecer la recuperación funcional, pensamos que es posible incrementar sus efectos benéficos al combinarlo con otra estrategia terapéutica como lo es la rehabilitación (RB).

II.2. REHABILITACIÓN POR NADO

La natación (SW) representa una actividad física natural de locomoción que, aunque es poco empleada en los estudios con modelos de LTME en comparación con otras terapias físicas como la RB en caminadora, plano inclinado y alcance de pellet, entre otras, la SW es un tipo de RB que permite la libertad de movimiento sin estar restringido por el peso corporal (Šedý, Urdzíkova y cols., 2008, Magnuson, Smith y cols., 2009, Rossignol y Frigon 2011, Frye, Ogonowska-Slodownik y cols., 2017). Más aun, la secuencia en el número de pasos que se logran para desplazarse en el agua es mayor comparado con los que se pueden realizar fuera de ella después de una LTME, al mismo tiempo que reduce el estado de estrés y ansiedad que se producen por las limitaciones de movimiento (Smith, Shum-Siu y cols., 2006). Además, factores como la presión hidrostática del agua, mejoran la función sensitiva del cuerpo mediante la estimulación de receptores sensoriales y reduce la inflamación. La temperatura a la cual se realiza la actividad también produce un efecto sobre la recuperación funcional, pues el agua tibia ayuda a disminuir los espasmos musculares, promueve la relajación muscular y puede disminuir la alodinia y la hiperalgesia (Heywood, McClelland y cols., 2017). A nivel

celular y molecular, se ha reportaron que la natación mantiene las conexiones sinápticas fuertes y promueve la expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de la NT-3 (Hutchinson, Gómez-Pinilla y cols., 2004).

II.3. REHABILITACIÓN EN MEDIO ENRIQUECIDO

El tipo de RB aplicado, debe favorecer no sólo la recuperación motora por la repetición de la actividad, sino promover también el auto aprendizaje motor y la motivación para realizar la actividad con movimientos naturales de exploración, que incluyan las habilidades motoras finas que se obtienen al realizar diferentes actividades (Nithianantharajah y Hannan 2006). Aspectos que son importantes porque pueden repercutir en el grado de recuperación funcional y, que en la mayoría de los estudios experimentales o ensayos clínicos, no se toman en consideración (Starkey, Bleul y cols., 2014). En este sentido, el medio enriquecido (EE) se ha utilizado como terapia de RB para el tratamiento de distintas enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y Huntington, la epilepsia, el evento cerebrovascular y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Aunado a lo anterior, también se ha probado su efecto en la remisión del cáncer en modelos de cáncer de colon y melanoma (Cao, Liu y cols., 2010). En la LTME, se ha visto que el EE revierte la alodinia, incrementa la recuperación locomotora y favorece la preservación del tejido medular (Berrocal, Pearse y cols., 2007, Starkey, Bleul y cols., 2014). Al igual que la SW, el EE disminuye el estrés y la ansiedad, factores que resultan importantes al repercutir de manera negativa en la recuperación funcional (Maldonado Bouchard y Hook 2014, Starkey, Bleul y cols., 2014). Además, la exposición al EE puede promover la activación neuronal, la señalización y los procesos de plasticidad a través de varias regiones del cerebro (**Fig. 11**). El EE incrementa la estimulación sensitiva, incluyendo las entradas somatosensoriales y visuales, incrementa la estimulación cognitiva, por ejemplo, la información espacial, el reconocimiento de objetos y la modulación de la atención, funciones que se controlan en el hipocampo y en otras áreas corticales (Nithianantharajah y Hannan 2006). También produce modificaciones a nivel celular y molecular al favorecer la arborización dendrítica y el aumento de espinas dendríticas en varias regiones del cerebro (Mohammed, Zhu y cols., 2002); incrementa el número de contactos sinápticos a cualquier edad y modifica la fuerza sináptica, promueve la neurogénesis en el hipocampo de ratones jóvenes (Hosseiny, Pietri y cols., 2015); y la expresión de genes y moléculas implicados en procesos de neurogénesis, regeneración y plasticidad como el factor derivado de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor

derivado del cerebro (BDNF) y de la neurotrofina (NT-3) y NT-4. Aunado a lo anterior, la EE también puede modificar factores de transcripción como el elemento de respuesta del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), y el homólogo de la proteína 1 (HOMER1A), los cuales se han relacionado con la plasticidad sináptica, así como también a la sinaptofisina (Nithianantharajah y Hannan 2006). No obstante lo anterior, en la LTME se han realizado pocos estudios a nivel molecular que expliquen el efecto del EE sobre la recuperación funcional en esta patología, aunque se ha descrito que es capaz de incrementar la expresión del BDNF (Berrocal, Pearse y cols., 2007).

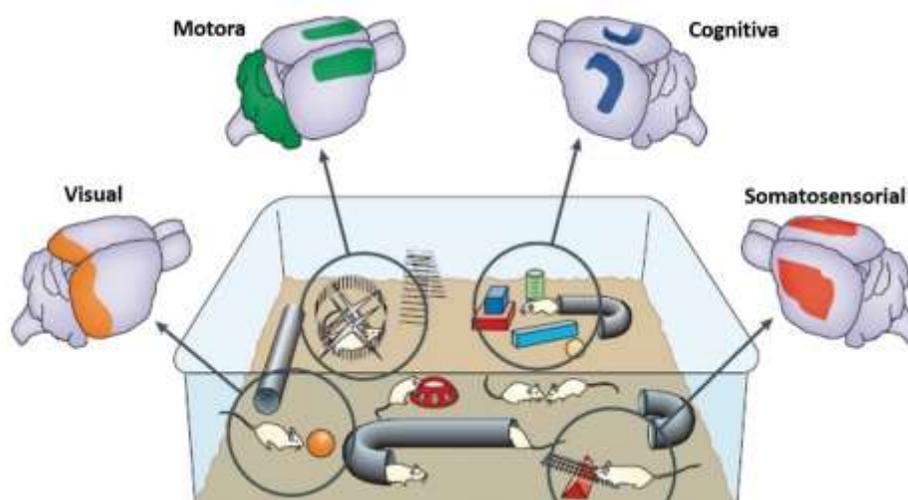


Figura 9. Rehabilitación por Medio Enriquecido (EE). Activa diferentes partes del cerebro, como el área somatosensorial (rojo) y la visual (anaranjado). Incrementa la estimulación cognitiva en el hipocampo (azul) y otras áreas corticales e incrementa la actividad motora al estimular áreas motoras de la corteza cerebral y del cerebelo (verde). Modificado de Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system (Nithianantharajah y Hannan 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

En estudios previos, se demostró que los animales con una LTME que fueron implantados con PPy/I sintetizado por plasma, tuvieron mayor preservación de tejido nervioso, menor respuesta inflamatoria, mejor integración del implante al tejido del huésped y una recuperación funcional superior a la de los animales implantados con polímeros sintetizados por métodos químicos o electroquímicos convencionales. Además, quedó demostrada su capacidad neuroprotectora al atenuar algunos de los procesos fisiopatológicos de la LTME como la lipoperoxidación, la isquemia, el estrés oxidante, la inflamación y la apoptosis.

En cuanto a RB, esta es la única estrategia terapéutica aceptada mundialmente para el tratamiento de la LTME porque fortalece los músculos que aún están activos, previene la pérdida del tono muscular y la espasticidad muscular y mejora la circulación sanguínea. Además, RB modifica la expresión de moléculas relacionadas con la regeneración nerviosa y los procesos de plasticidad, como la proteína asociada al crecimiento 43 o GAP-43, la tubulina β III y la proteína básica de mielina o MBP.

Con base en los mecanismos de acción de ambas estrategias terapéuticas, la aplicación de PPy/I sintetizado en plasma en combinación con un esquema mixto de RB por natación y medio enriquecido (SW/EE) favorecerá una mejor y más completa recuperación funcional después de una LTME.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tendrá el implante de PPy/I sintetizado por plasma y aplicado sólo o en combinación con un esquema mixto de RB por natación y medio enriquecido, sobre la expresión de genes y/o moléculas relacionadas con los procesos de neuroregeneración y plasticidad nerviosa y sobre la recuperación funcional después de una lesión traumática de médula espinal en ratas?

V. HIPÓTESIS

Si el uso combinado del implante de PPy/I y una estrategia mixta de rehabilitación (nado y medio enriquecido), produce una mayor expresión de GAP-43, β III tubulina y MBP, moléculas relacionadas con los procesos de neuroregeneración y plasticidad nerviosa, entonces las ratas que reciban este tratamiento tendrán una mayor recuperación funcional después de una LTME, en comparación con las ratas a las que se les apliquen los tratamientos por separado.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo general

Determinar el efecto del PPy/I en combinación con un esquema mixto de rehabilitación con nado y medio enriquecido sobre la expresión de GAP-43, β III tubulina y MBP, moléculas asociadas a la regeneración y plasticidad nerviosa y la recuperación funcional en un modelo LTME por contusión en ratas.

VI. 2. Objetivos particulares

Evaluar el efecto PPy/I en combinación con un esquema mixto de rehabilitación con nado y medio enriquecido sobre:

1. La recuperación funcional (escala BBB y LSS).
2. Cantidad de tejido nervioso preservado.
3. Expresión de las proteínas relacionadas en los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa (inmunohistoquímicas)

Activación e inactivación de genes relacionados con los procesos regeneración y plasticidad nerviosa de (microarreglos).

VII. METODOLOGÍA

Todos los experimentos con los animales, se realizaron de acuerdo las especificaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (Anexos 1 y 2) y con la autorización del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (Número 2015-785-060) (Anexos 3 y 4).

VII.1, Tipo de estudio: Experimental, Analítico, Longitudinal, Prospectivo.

VII.2. Universo de Estudio

Se utilizaron 90 ratas hembra adultas, de la cepa Long-Evans, con peso corporal entre 250 y 300 g. Los animales fueron colocados en cajas individuales en un bioterio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, con ciclos luz-obscuridad de 12x12 h, con alimento y agua a libre demanda.

VII.3. Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión

Se incluyeron ratas hembra de la cepa Long-Evans, sanas, con peso corporal entre 250 y 300 g, a quienes al momento de realizarles la LTME con el estereotáxico New York University Impactor (NYU), registraron un valor numérico menor a 10 y un hematoma en la zona central de la médula espinal, así como parálisis en ambas extremidades posteriores el día siguiente de la cirugía.

Criterios de exclusión

Se excluyeron las ratas con cualquier alteración que pudieran deberse a la degeneración de la cepa o que presentaron alguna infección o afectación del estado de salud.

Criterios de eliminación

Se eliminaron aquellas ratas que al momento de realizarles la LTME registraron un error mayor a 10 al ser lesionadas con el impactador NYU, o que el hematoma posterior al impacto se encontrara lateralizado con respecto a la región central de la médula espinal, o que presentaran ruptura de meninges al momento de realizar la lesión, o que no presentaran parálisis de las extremidades posteriores al día siguiente de la cirugía, y aquellas que no completaron el tiempo de evaluación propuesto o que presentaron autosarcofagia.

VII.4. Variables

Independientes: LTME, administración de PPy/I y la RB.

Dependientes: Expresión de genes relacionados con los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa, expresión de proteínas relacionadas con los genes involucrados en los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa, recuperación locomotora, preservación de tejido medular.

VII.5. Síntesis del Polímero de PPy/I

Se sintetizó una película de PPy/I por la técnica de polimerización por plasma en un reactor tubular de vidrio con un volumen aproximado de 1.5 L en donde a través de válvulas en los extremos del reactor se introdujeron tanto el monómero de pirrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 99%) como el yodo (Sigma-Aldrich; 99.8%) por medio de la reducción de la presión (10^{-2} mbar aproximadamente), en el interior del reactor al utilizar una bomba de vacío. La polimerización se llevó a cabo a través de descargas de resplandor generadas por plasma con un voltaje de 700 V y una potencia de 80 W durante 300 min. Posterior a la síntesis, se realizó la caracterización del PPy/I mediante espectroscopia infrarroja (IR) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS5, el análisis morfológico por medio de microscopia electrónica de barrido (Jeol JMS 5900LV) y el análisis elemental mediante sonda (EDS Oxford INCA-XACT) (Cruz, Morales y cols., 1999, Cruz, Mondragon-Lozano y cols., 2012).

Se preparó una suspensión a partir de la película de PPy/I, para lo cual se pulverizaron fragmentos de la película y se agregó solución fisiológica (5 mg de PPy/I en 1 ml solución de Cloruro de Sodio 0.9%), para su posterior aplicación en el sitio de lesión (Mondragon-Lozano, Ríos y cols., 2017).

La forma de preparación del biomaterial PPy/I descrita, fue estandarizada anteriormente por nuestro grupo de investigación y probada en trabajos previos para el tratamiento de la LTME tanto por contusión como por sección completa de la médula espinal (Olayo, Ríos y cols., 2008, Mondragon-Lozano, Ríos y cols., 2017).

VII.6. Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron vía intramuscular con una mezcla de ketamina y xilacina a razón de 75 y 25 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Se aplicaron medidas de asepsia y antisepsia, previa tricotomía del dorso del animal. Se realizó disección por planos de piel y músculos en la región torácica, se retiró la apófisis espinosa de la vértebra torácica 9 (T9) para realizar una laminectomía y exponer la médula espinal sin dañar las meninges, para posteriormente realizar una LTME por contusión de intensidad moderada con el estereotáxico NYU, que deja caer directamente sobre la médula espinal expuesta, un cilindro de acero de 2 mm de diámetro con un peso de 10 g, a una altura de 25 mm en forma vertical, guiada y controlada por sensores conectados a una computadora que registró el peso, la deformación de la médula espinal, la altura de la caída del impactador y la velocidad de la misma (**Fig. 12**) (Gruner, 1992, Vialle, Grochocki y cols., 2007). Después de producir la LTME tanto los músculos como la piel fueron suturados por planos con puntos separados.



Figura 10. Impactador New York (NYU) para producir la lesión traumática de la médula espinal. El dispositivo mide con precisión el movimiento de un cilindro de acero de 10 g que cae de una altura determinada, en este caso de 25.0 mm, sobre el segmento torácico 9 (T9) de la médula espinal expuesto por laminectomía. El dispositivo mide el movimiento de la columna vertebral subyacente al sitio de impacto, muestra la trayectoria de la barra que cae y calcula con precisión ($\pm 1\%$) cuatro parámetros de contusión: velocidad de impacto (ImpV), distancia de compresión del cordón medular (Cd), el tiempo de compresión (Ct) y la tasa de compresión del cordón medular ($Cr=Cd/Ct$)

VII.7. Cuidados post-operatorios

Después de la cirugía, los animales fueron colocados en cajas individuales y llevados al bioterio, donde recibieron el antibiótico de penicilina benzatínica administrada vía intramuscular (1 200,000 UI) y tratamiento analgésico con paracetamol (5 ml/L de agua durante 5 días). Como terapia post-operatoria, la vejiga neurogénica y el intestino se vaciaron manualmente todos los días hasta que el animal recuperó el control de esfínteres. La salud general de cada animal en el estudio se verificó diariamente. Aunado a lo anterior, se hicieron registros de los animales que presentaron autosarcofagia, hiperextensión, edema, espasticidad o anquilosis de las extremidades posteriores. Y cuando fue necesario, se proporcionó el tratamiento adecuado.

VII. 8. Diseño Experimental

Una vez realizada la LTME, las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos ($n=6$ /grupo): sin tratamiento (control); aplicación del biopolímero (PPy/I); RB mixta por natación y medio enriquecido (SW/EE); y tratamiento combinado (PPy/I + SW/EE). Además, se consideró un grupo sin LTME y sin tratamiento (Sham). La recuperación locomotora se evaluó

semanalmente con las escalas Basso-Beatide-Bresnahan (BBB) y Louisville (LSS), la cantidad de tejido preservado se evaluó mediante análisis histológico-morfométrico (hematoxilina/eosina y software FIJI), la expresión de proteínas relacionadas con los procesos de regeneración y plasticidad por inmunofluorescencia (Software Image J) y la expresión génica mediante microarreglos.

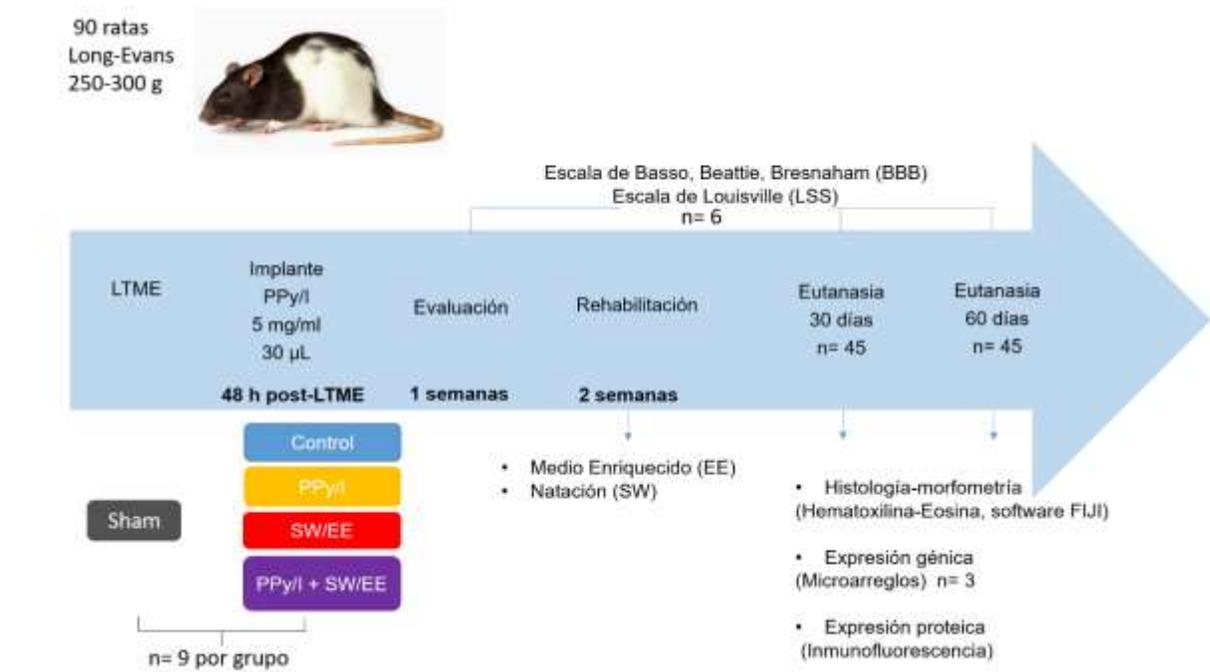


Figura 11. Diseño experimental. Se definen los pasos que se siguieron durante la realización del presente protocolo de investigación en un modelo de lesión traumática de médula espinal (LTME) por contusión de intensidad moderada. Los cinco grupos experimentales considerados: laminectomía sin LTME (sham), LTME sin tratamiento (control), aplicación del biopolímero (PPy/I), RB mixta por natación y medio enriquecido (SW/EE); y tratamiento combinado (PPy/I + SW/EE). Se muestran también, los procedimientos y las técnicas con las que estos realizaron, los tiempos de evaluación, las escalas utilizadas para evaluar el grado de recuperación funcional tanto en campo abierto con la escala BBB (Basso, Beathie y Bresnahan) como en tanque de nado con la escala LSS (Louisville).

VII.9. Tratamientos

Aplicación del PPy/I

La administración de PPy/I se realizó 48 h después de la LTME, a razón de 5 mg/ml en un volumen de 30 μ L, mediante inyección directa en el sitio de lesión, previa re-apertura de la herida quirúrgica y bajo efecto anestésico (Alvarez-Mejia, Morales y cols., 2015, Mondragon-Lozano, Rios y cols., 2017).

Terapias de Rehabilitación

La RB mixta con SW/EE, comenzó 15 días después de la LTME a fin de evitar lesionar aún más la médula espinal, por la susceptibilidad del tejido nervioso durante las etapas iniciales después de una lesión de esta naturaleza (Magnuson, Smith y cols., 2009, Piao, Stoica y cols., 2013). Las terapias de RB y las evaluaciones de la recuperación funcional se realizaron en las instalaciones del Proyecto Camina A.C.

Previo al inicio de la terapia con SW/EE, los animales recibieron diariamente masaje y movilizaciones pasivo-asistidas, mediante movimientos circulares según permitiera cada articulación, como se realiza el movimiento en una bicicleta, para facilitar el reaprendizaje del movimiento en las extremidades posteriores.

Rehabilitación por nado

Pre-entrenamiento

Una semana antes de producirles la LTME, los animales fueron colocados en un tanque de vidrio (149x18.5x30 cm) con agua a temperatura controlada para realizar la actividad de nado. Al final del carril, el tanque contaba con una plataforma acrílica antiderrapante para que el animal pudiera descansar como se describió por Smith y cols., (2009). La adaptación de los animales al nuevo ambiente se realizó colocándolos por 6 días consecutivos en el tanque de agua durante 2 min, con incrementos de 1 min cada día hasta llegar a 7 min al término de la semana de pre-entrenamiento. Al final de la actividad los animales recibieron semillas o cereal como refuerzo positivo (Smith, Brown y cols., 2009).

Rehabilitación

Dos semanas después de producirse la LTME, se iniciaron las sesiones de RB con natación (Magnuson, Smith y cols., 2009), se colocaron a los animales en el tanque con agua cada tercer día con sesiones de 2 min, se incrementó 1 min cada semana hasta concluir 6 semanas. En cada sesión, los animales recibieron apoyo por parte del rehabilitador para llevar a cabo la actividad mientras no tuvieran el control del tren posterior. Aunado a lo anterior, se llevaron a cabo sesiones de masajes musculares en las extremidades posteriores al concluir la actividad para relajar los músculos y evitar la contractura muscular (Guerra y Saavedra 2004).

Rehabilitación en medio enriquecido

Los animales fueron colocados 2 h diariamente durante 30 o 60 días según el grupo experimental al que correspondían, en un ambiente enriquecido provisto con diferentes artículos de distintos colores y texturas, incluyendo ruedas de ejercicio, tubos plásticos para laberintos, barras de ejercicio y circuitos de obstáculos, los cuales fueron modificados periódicamente a fin de evitar la habituación e incrementar la estimulación motora-sensitiva mediante actividades novedosas, así como la interacción social con otras 5 o 6 ratas a la vez y la exploración del ambiente (Krech, Rosenzweig y cols., 1960, Will, Rosenzweig y cols., 1977, van Praag, Kempermann y cols., 2000).

Recuperación funcional.

El grado de recuperación funcional se determinó por medio de dos escalas, la escala locomotora de Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) y la escala de Louisville (LSS).

Escala Basso, Beattie and Bresnahan (BBB)

La escala BBB (Basso, Beattie y cols., 1995, Basso, Beattie y cols., 1996), evalúa el movimiento de las tres articulaciones de las extremidades posteriores (cadera, rodilla y tobillo), la amplitud de los mismos, el soporte de peso corporal, la coordinación entre las patas delanteras y las traseras y el tiempo de repetición de los mismos. Consta de 22 puntos, donde cero indica movimiento nulo y 21 indica una marcha normal (Anexo 5). La evaluación se realizó a doble ciego, en un campo abierto, sobre una superficie plana, 24 h después de la LTME para comprobar que los animales presentarán parálisis completa de las extremidades posteriores y, después se realizó una vez por semana durante 8 semanas para evaluar el grado de recuperación funcional.

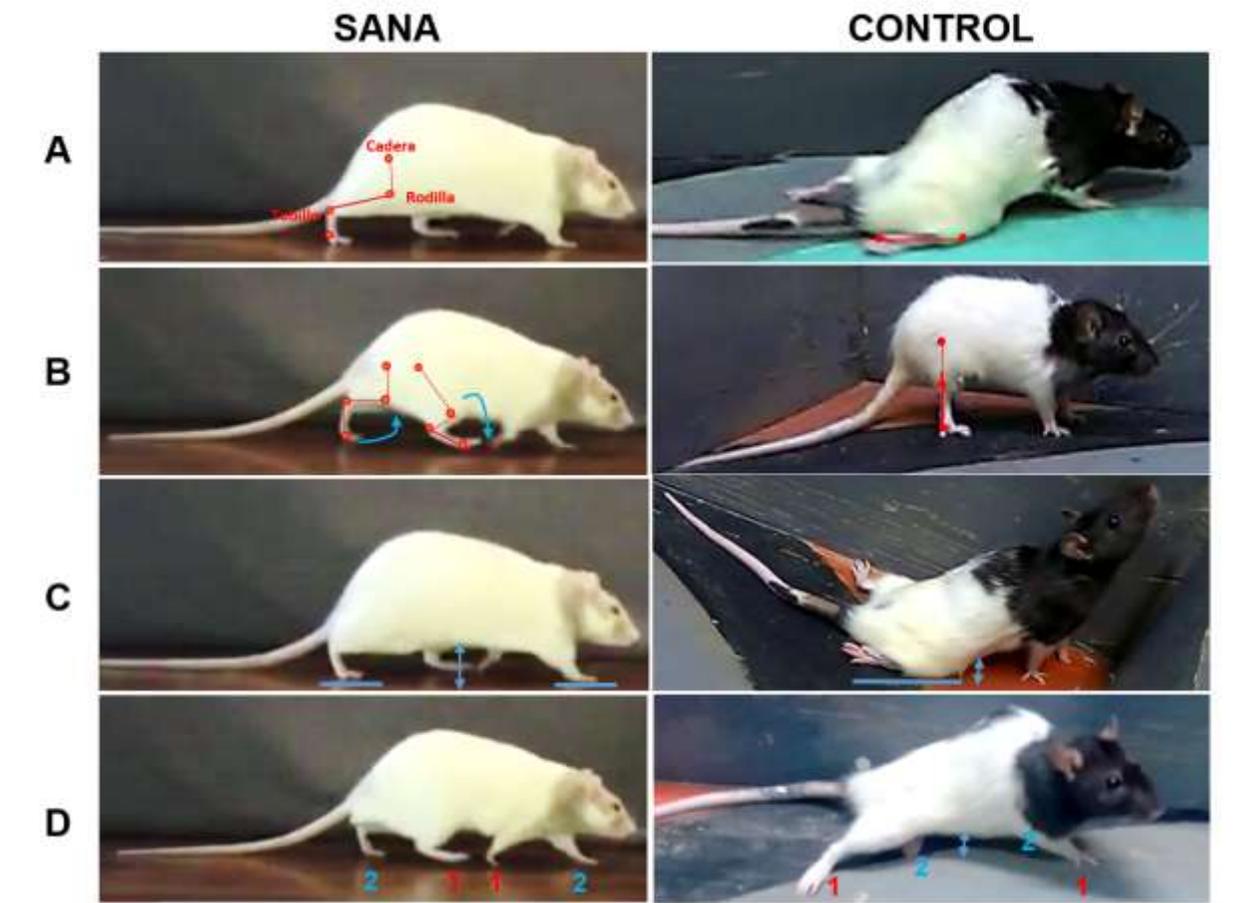


Figura 12. Parámetros de evaluación de la escala BBB. **A.** Movimiento de las tres articulaciones de las extremidades posteriores, cadera, rodilla y tobillo. **B.** Amplitud de los movimientos. **C.** Soporte de peso corporal. **D.** Coordinación entre las patas anteriores, posteriores y levantamiento de cola.

Escala Louisville (LSS)

La escala LSS (Smith, Burke y cols., 2006, Smith, Shum-Siu y cols., 2006), evalúa la dependencia que presentan los miembros posteriores con respecto a los anteriores, el movimiento y alternancia de las extremidades posteriores y la posición y control del cuerpo con respecto a la superficie del agua (**Fig. 14**). Consta de 18 puntos que van de 0 a 17, donde cero es la ausencia de las características mencionadas y, 17 representa el movimiento y control adecuado para nadar (Anexo 6).

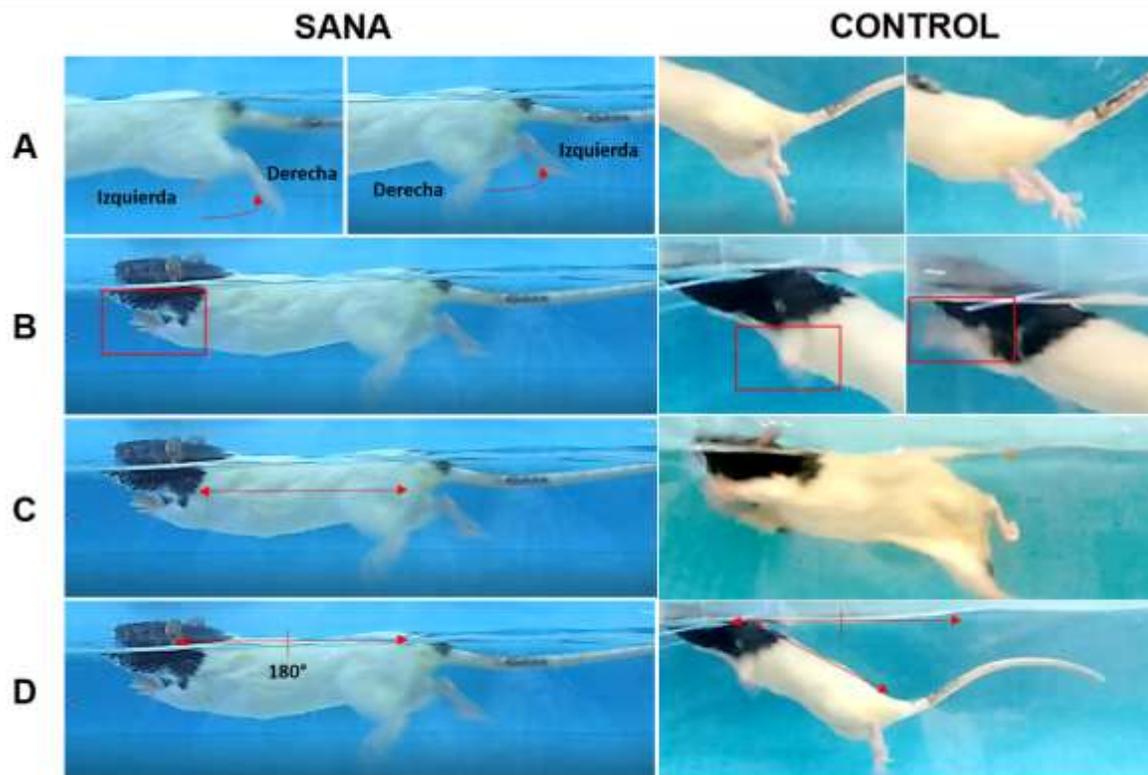


Figura 13. Parámetros de evaluación de la escala Louisville (LSS). **A.** Movimiento y alternancia de las extremidades posteriores para un animal sin LTME, el cual obtiene de dichas extremidades el movimiento, la fuerza y el impulso para desplazarse a través del tanque de agua. **B.** Dependencia de las extremidades anteriores para realizar el desplazamiento a través del tanque de agua en un animal con LTME. Nótese que los animales sanos sólo usan las extremidades anteriores para direccionar su desplazamiento. **C.** Control del cuerpo. Los animales Sanos mantienen el control del tronco en el plano horizontal durante el desplazamiento. **D.** Posición del cuerpo con relación a la superficie del agua, donde un ángulo mayor a 20° indica déficit funcional.

La escala LSS categoriza a las ratas según el puntaje que obtienen, el cual representa el grado de recuperación locomotora que logran para realizar el desplazamiento en el agua mediante el control y la amplitud de sus movimientos. Si alcanzan entre 0 y 5 puntos se clasifican como pobres nadadoras, de 6 a 11 como nadadoras intermedias y de 12 a 17 como buenas nadadoras (Smith, Burke y cols., 2006, Smith, Brown y cols., 2009).

VII.10. Eutanasia de los animales

Al finalizar los dos meses de RB por SW/EE y, al concluir las evaluaciones funcionales correspondientes, los animales fueron sacrificados con pentobarbital a dosis letal (100 mg/kg, por vía intraperitoneal) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana referente al sacrificio

humanitario animal (Anexo 7) (NOM-033-SAG/ZOO-2014 , NOM-033-ZOO-1995). Se realizó perfusión vía intracardiaca con 200 ml de solución salina más 1000 UI de heparina a temperatura ambiente, seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4% más glutaraldehído en una relación 1:1000 (Gage, Kipke y cols., 2012). Al término de la perfusión se extrajo la médula espinal incluyendo el epicentro de la lesión más un cm en dirección cefálica y un cm en dirección caudal. Posteriormente, las muestras se deshidrataron y se colocaron en parafina, se realizaron cortes longitudinales de 6 μ m de grosor hasta llegar al epicentro de la lesión con un micrótomo de la marca Leica (RM21125RT). Se seleccionaron 9 laminillas por cada animal, que contenían 5 cortes cada una. Se utilizaron tres laminillas para el estudio histológico/morfométrico, tres para el de inmunofluorescencia y tres más para el de inmunohistoquímica.

VII.11. Análisis Morfométrico

Para realizar el análisis morfométrico, del total de cortes realizados de cada médula espinal, se seleccionó la que contenían los cortes donde el epicentro de la lesión fuera más evidente y después, a partir de esa laminilla, se seleccionó una laminilla antes y una después y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Thompson y Richter 1960). De las tres laminillas seleccionadas, se consideraron tres cortes de tejido medular, se tomaron imágenes panorámicas con un microscopio Leica (MZ6) de campo claro y se colocó cada uno de los cortes en orientación cefálico-caudal y se cuantificó el daño presente conformado por el epicentro de la LTME, los quistes y microquistes producidos también como resultado de la LTME y, se restó del área total del corte de tejido medular. Las mediciones se realizaron con el software FIJI (Schindelin, Arganda-Carreras y cols., 2012).

VII.12. Inmunofluorescencia

Las laminillas seleccionadas para este estudio se colocaron en la estufa a 60°C para retirar el exceso de parafina, se hidrataron en un tren de alcoholes graduados y se colocaron en un vaso coplin vertical de plástico con buffer de citratos 10 mM a pH 6, dentro de una olla a presión durante 20 min, para realizar la recuperación de antígeno. Posterior a este proceso, los tejidos fueron permeabilizados con PBS-T (PBS 0.01M-Tritón 0.1%) durante 30 min y bloqueados los sitios inespecíficos con 5% de suero de caballo en PBS-T en cámara húmeda durante 30 min. Transcurridos los 30 min se colocaron los anticuerpos primarios anti-rabbit GAP-43 (1:500; BioRad), anti-rabbit MBP (1:200; ABCAM) y anti- β III tubulina (1:500; ABCAM) en una cámara

húmeda a 4 °C durante toda la noche. Después se realizaron lavados con PBS-T y se colocaron los anticuerpos secundarios Alexa flúor® 488 donkey anti-rabbit igG (1:300, Molecular Probes) y Alexa flúor® 594 donkey anti- rabbit IgG (1:300, Molecular Probes), durante 2 h a temperatura ambiente y en condiciones de obscuridad. Los núcleos de las células fueron marcados con Hoechst (1 nM).

Para disminuir la autofluorescencia generada por el propio tejido, el medio de fijación o la parafina, las laminillas se colocaron en una solución de Sudán negro B (Sigma Aldrich) al 0.1% en 70% de etanol durante 15 min. Después se retiró el exceso de Sudán negro con agua destilada y PBS-T y se cubrieron los tejidos con vectashield ® (Baschong, Suetterlin y cols., 2001) y un cubreobjetos.

Las laminillas se observaron en un microscopio confocal Nikon TI eclipse (A1), donde se obtuvieron imágenes 20X de cuatro regiones circundantes al epicentro (cefálico-dorsal, cefálico-ventral, caudal-dorsal y caudal-ventral) para realizar la cuantificación de la expresión de GAP-43/MBP y β III tubulina/MBP. La fluorescencia específica se cuantificó en 3 campos diferentes, correspondientes a 500 x 500 micras para cada corte. Las cuantificaciones se realizaron en el tejido de la médula espinal, sin tomar en cuenta el quiste y tomando como referencia el epicentro de la lesión, con el programa Imagen para Windows.

VII. 13. Inmunohistoquímica

Después de desparafinar las muestras, hidratarlas y recuperar los antígenos descritos previamente, los cortes de tejido fueron procesados con el Kit RTU Vectastain® (Vector laboratorios, Estados unidos) y bloqueados con suero normal de caballo al 2.5% (Vector) durante 20 min, en cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente, se colocó el anticuerpo primario anti-rabbit (1:500, ABCAM) para GFAP y se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit/mouse IgG (Vector) por 2 h a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-tritón de 5 min cada uno. Las laminillas se incubaron usando el kit Vectastain® durante una hora y se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS-tritón y uno con agua destilada de 5 min cada uno.

Al finalizar los lavados, se colocó la 3-3' diaminobencidina durante 5 min y se realizaron lavados con PBS-Tritón y agua destilada. Después, los cortes de tejido medular fueron

digitalizados con un microscopio óptico Leica, el objetivo de 20X. Las imágenes resultantes se analizaron por medio del software Fiji para Windows 10 (Schindelin, Arganda-Carreras y cols., 2012), y se consideraron cinco cortes de tres laminillas previamente seleccionadas. El área circundante al sitio de lesión se dividió en cuatro cuadrantes correspondientes a las regiones cefálica-dorsal, cefálica-ventral, caudal-dorsal y caudal-ventral. La cuantificación de astrocitos inmunoreactivos a GFAP contenidos dentro de dichas áreas, se realizó manualmente.

VII.14. EXPRESIÓN GÉNICA

Aislamiento del ácido ribonucleico (ARN)

Para analizar la expresión génica después de la LTME y las estrategias de RB aplicadas, se formaron nuevos grupos experimentales a los que se les realizaron las evaluaciones funcionales durante 30 y 60 días tal y como se describió previamente. Al término del seguimiento, los animales se sacrificaron por decapitación con apego a los lineamientos señalados en la NOM-033-ZOO-1995 y la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Se extrajo 1 cm total de la médula espinal, a partir del epicentro de la lesión, 0.5 cm en dirección cefálica y 0.5 cm en dirección caudal. Cabe señalar que, para extraer el tejido medular, durante todo el proceso se trabajó a 4°C, para lo cual se colocó el cuerpo del animal en una cama de hielo y se irrigó todo el tiempo a la médula espinal con PBS al 1X a 4°C. Una vez que se extrajo el tejido, se colocó en un tubo eppendorff con 1 ml de TRIzol (BioRad) para ser homogenizado, después se le agregó 200 µl de cloroformo, se agitó y se centrifugó durante 15 min a 4°C y 12 g.

Una vez centrifugado el tejido, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, para precipitar el ARN mediante la adición de 500 µl de Isopropanol (Sigma-aldrich). Los tubos fueron incubados en hielo durante 30 minutos y al terminar se centrifugaron durante 10 min a 12 g.

La fase acuosa fue desechada y el pellet formado, lavado con etanol al 75%, después se centrifugó durante 5 min a 7500 g. Finalmente, el pellet fue hidratado con agua libre de ribonucleasas (RNAsas) y 24 h después se tomó la lectura de concentración y pureza usando el Nanodrop 2000/2000 c a 260/280 nm de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Preparación del RNA para el microarreglo

Análisis de la integridad del ARN

La integridad del ARN de las muestras, se determinó con el bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y el software 2100 Expert, que mediante el análisis completo del gel de electroforesis, examinó el nivel de degradación del ARN y lo clasificó de acuerdo a un sistema de numeración de 1 a 10, donde 1 es el perfil de ARN más degradado y 10 el más intacto. Las muestras con un número de integridad (RIN) ≥ 7.0 fueron incluidos en el análisis del microarreglo.

Microarreglo

El análisis del microarreglo se realizó de acuerdo a los protocolos de Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA), en el laboratorio de microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de la primera cadena se sintetizó a partir de 200 ng de ARN, con la enzima Superscript II transcriptasa reversa con un oligómero de poli (T) que está incorporada a un promotor T7. Para obtener el ácido ribonucleico (ARNc), la síntesis de la segunda cadena de ADNc fue seguida por la transcripción *in vitro*. Este RNAc se uso como molde para un segundo ciclo de síntesis de DNAc con la incorporación de 2'-deuxiridina, 5'-trifosfato (dUTPs) dentro de la nueva cadena. Después, el DNAc se fragmentó y se usaron las endonucleasas glicosilasa uracil-DNA y purina-pirimidina; los fragmentos resultantes fueron marcados con biotina y se realizó la hibridación a 45°C durante 16 h. Posteriormente, se tiñeron con straptavidina-ficoheritrina conjugada, se lavaron y se escanearon con base en el protocolo Affimetrix para chips Clariom™ S.

El análisis de expresión génica se realizó con el microarreglo soluciones Clariom S (Clariom™ S). El escaneo y la obtención de resultados del microarreglo fueron seguidos de la transformación de los datos de fluorescencia en archivos CEL con la Consola de expresión Affymetrix (ECS) y utilizando el software de la Consola de comandos de Affymetrix Gene Chip (AGCC).

Para identificar los posibles procesos biológicos modificados por la sobreexpresión o disminución génica provocada por la LTME y por cada uno de los tratamientos aplicados, se

realizó un análisis con la base de datos Análisis de proteínas a través de la relación evolutiva (PANTHER) v16.0 que realiza un análisis en el cual clasifica a los genes de acuerdo a la Categoría Ontogénica (GO) en la que participan, dichas categorías están organizadas según el tipo de familia o subfamilia a la que el gen en cuestión pertenece (clase de proteína), la función molecular que realiza, el proceso biológico en el que podría participar y la interacción con otras moléculas. Cabe señalar que los genes analizados pueden participar en una o más Categorías Ontogénicas (GO).

VII.15. Análisis Estadístico

A los datos obtenidos como resultado se les aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para definir la inferencia estadística. Para los datos de las evaluaciones funcionales (escalas BBB y LSS) se analizaron mediante una ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Tukey para las comparaciones múltiples. La cantidad de tejido preservado y la astrocitosis reactiva se analizaron mediante la prueba ANOVA de una sola vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. La cuantificación de fluorescencia para β III-tubulina/MBP se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn y para GAP43/MBP, se realizó mediante ANOVA unidireccional seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El programa IBM® SPSS versión 20.0 para Windows 10 y el software GraphPad Prism® versión 6.0 para Windows 10, se utilizaron para analizar y graficar los datos, respectivamente.

Los resultados del microarreglo fueron normalizados usando el algoritmo de análisis robusto multichip (RMA), con la consola de expresión Affymetrix (ECS). Después se realizó un análisis por comparación usando el software R (Paquete Bioconductor) y se aplicó una ANOVA de una sola vía, además de un análisis tasa de falsos descubrimientos (FDR). Posterior a esto, se realizó un análisis de expresión diferencial con el paquete Modelos lineales de datos de micromatrices (LIMMA) con la prueba t moderada y el FDR Benjamini-Hochberg, como análisis estadístico. Los resultados se obtuvieron a través del software 4.0.1 Consola de análisis transcriptómico de Affymetrix (TAC) (Thermo Fisher Scientific), con base en una razón de cambio mayor a 2 y menor a 2, con un valor de $p < 0.05$ para indicar las diferencias entre los genes expresados al aplicar los tratamientos probados.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Caracterización del PPy/I sintetizado por plasma

La estructura química del biopolímero PPy/I sintetizado por plasma tiene absorciones de espectroscopía infrarroja (IR) con contribución de siete bandas de absorción principales. El ancho centrado en 3332 cm^{-1} incluye interacciones $=\text{C}-\text{H}$, $\text{N}-\text{H}$ y $\text{O}-\text{H}$ en el polímero. Los dos primeros son parte de la estructura del PPy/I, pero el O-H se origina de la oxidación atmosférica. La banda de absorción centrada en 2932 cm^{-1} se puede asignar a grupos alifáticos $-\text{C}-\text{H}$ que no forman parte de la estructura canónica del PPy que podrían estar relacionados con la presencia de fragmentos de pirrol debido a las colisiones de alta energía entre las partículas durante la síntesis por plasma. La absorción en 2359 y 2220 cm^{-1} corresponde a resonancias de grupos $-\text{C}=\text{}$, expresados como $\approx\text{C}\approx$, y grupos de nitrilo; el primero está asociado con la columna vertebral de los anillos de pirrol, pero el otro sugiere una alta deshidrogenación y la rotura de algunos anillos del monómero. La banda de absorción con la intensidad más alta está en 1611 cm^{-1} y puede asociarse con grupos $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{N}$ de anillos de pirrol. También se pueden encontrar otras absorciones de grupos $=\text{C}-\text{H}$ en la estructura del PPy en 1415 y 728 cm^{-1} . Otra pequeña absorción puede estar en 604 cm^{-1} atribuida a los grupos $\text{C}-\text{I}$, originados en el dopaje con yodo durante la polimerización por plasma. Por lo tanto, la estructura del PPy/I, tiene contribuciones de sus propios grupos químicos y de otros derivados de fragmentos de los anillos del pirrol (**Fig. 14A**).

El contenido elemental en % de átomos se muestra en el inserto de la **Figura 14B**. El análisis se realizó considerando aproximadamente el primer nm de la superficie de la muestra, que generalmente está ligeramente más oxidada que las capas más profundas. Como muestra el inserto de la **Figura 14B**, el contenido de oxígeno fue del 9,58%; mientras que el contenido de C, N y Si, fue de 74.97%, 14.48% y 0.97%, respectivamente. La relación atómica C/N de las moléculas de pirrol es 4, sin embargo, en el PPy/I, la relación atómica la C/N fue de 5.2, que es ligeramente más alta que la del pirrol debido a la fragmentación y oxidación ocurrida durante la síntesis. Cabe destacar que no se encontraron átomos de yodo en la superficie de los polímeros. En otros trabajos, se ha discutido que una de las funciones del yodo en la polimerización por plasma es catalizar las reacciones químicas, además de su función de dopante. El PPy/I se sintetizó como películas delgadas (**Fig. 14C**) y se molió manualmente en

un mortero de ágata con pistilo para obtener un polvo con un diámetro medio aparente de partículas de aproximadamente 1 μm (Fig. 14D).

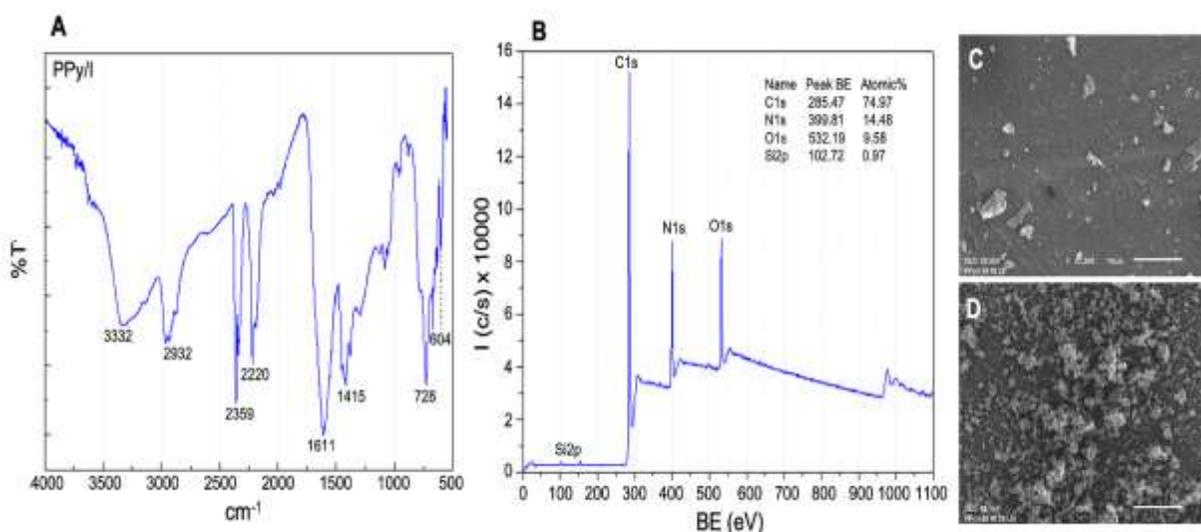


Figura 14. Caracterización del implante de polipirrol/ yodo (PPy/I). **A.** Contenido elemental en porcentaje de átomos. **B.** Grupos químicos y otros derivados de fragmentos de anillos de pirrol. **C.** Películas delgadas de la síntesis del PPy/I obtenidas en un microscopio electrónico de barrido. **D.** Polvo de PPy/I obtenido mediante molido manual en un mortero Agatha para obtener un polvo con un diámetro aparente medio de partículas de aproximadamente 1 μm .

VIII.2. Condición clínica

El estado general de salud y la condición clínica de los animales que recibieron RB por SW/EE, fue mejor que la de los animales del grupo control, ya que los animales con RB recuperaron el control de esfínteres, y vaciaron sus vejigas e intestinos por sí mismos, desde la primera semana después de iniciar el tratamiento; mientras que los animales del grupo de control no recuperaron esta capacidad. Más aún, en el grupo tratado con PPy/I+SW/EE, no hubo casos de edema en las extremidades posteriores, ni antes ni después del inicio de la RB, mientras que en el grupo que recibió solo SW/EE, ocurrieron 3 casos de edema, los cuales mejoraron durante la primera semana después del inicio del tratamiento. Así mismo, la RB por SW/EE redujo 3 veces el número de animales con hiperextensión de las extremidades posteriores, mientras que los animales con espasticidad en los grupos experimentales que recibieron SW/EE y PPy/I+SW/EE mejoraron en un máximo de 15 días después de que se inició la RB y, la espasticidad no reapareció, caso contrario a lo observado en los animales que no recibieron RB. No se identificaron animales con anquilosis en los grupos que recibieron RB. Además, los

dos casos de autosarcófagia que se observaron, se resolvieron completamente después de que se iniciara la RB por SW/EE. Todo lo anterior se reflejó en el rendimiento de los animales durante la evaluación funcional realizada con la escala BBB en campo abierto.

VIII.3. Recuperación de la función locomotora. Evaluada con las escalas LSS y BBB.

La recuperación funcional de las extremidades posteriores de los animales incluidos en el estudio se evaluó mediante dos escalas: la escala LSS y la escala BBB.

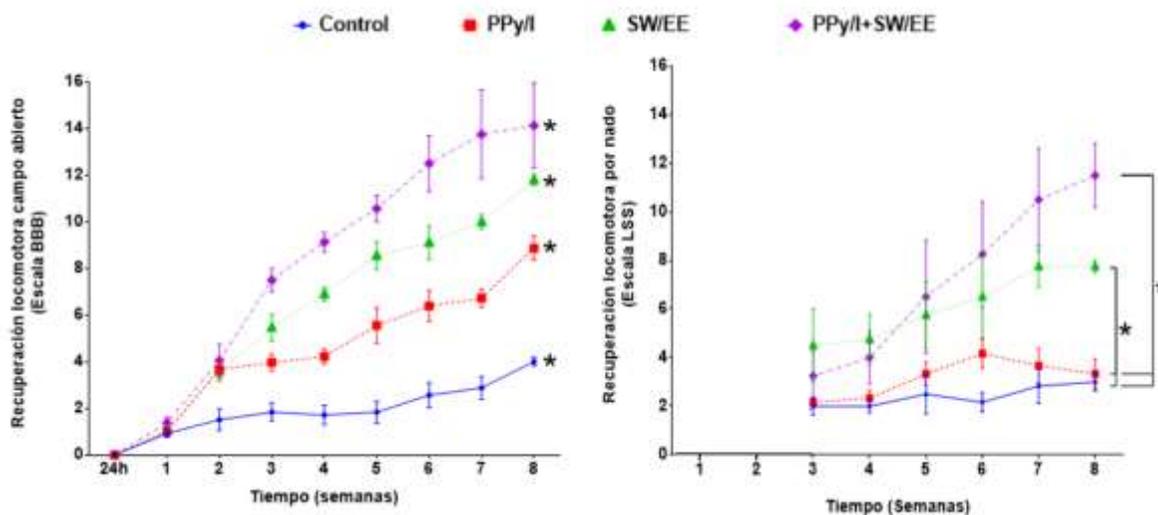
Con respecto a la recuperación funcional evaluada y medida con la escala LSS, las ratas del grupo control obtuvieron una puntuación de 3 ± 0.36 (**Fig. 15A**), lo que indica que exhibieron movimientos ligeros en las tres articulaciones, disminución del control corporal en el agua y dependencia constante de las extremidades anteriores durante todas las sesiones de SW, lo que las clasificó como nadadoras pobres. En la escala BBB, este grupo obtuvo un puntaje promedio final de 4 ± 0.18 (19.04% de la recuperación motora completa), lo que significa que los animales presentaron movimientos ligeros en las tres articulaciones evaluadas, es decir, la cadera, la rodilla y el tobillo (**Fig. 15B**).

Aunque las ratas que recibieron el polímero PPy/I pero que no se sometieron a RB por SW/EE, lograron una puntuación en la escala de LSS similar a la obtenida por el grupo control (**Fig. 15A**), estos animales obtuvieron una puntuación en la escala BBB de más del doble de lo logrado por los animales del grupo de control, puntaje de 8.87 ± 0.52 (42.23% de recuperación motora completa) al final del período de evaluación, lo que significa que las ratas exhibieron movimientos amplios de las tres articulaciones de las extremidades posteriores e intención de caminar y, en algunos casos, exhibieron una colocación plantar exitosa de las extremidades posteriores en la superficie de evaluación (**Fig. 15B**).

Las ratas que se sometieron solo a RB por SW/EE lograron una puntuación de 7.75 ± 0.2 en la escala de LSS, por lo que fueron clasificadas como nadadoras intermedias al final del estudio, ya que exhibieron amplios movimientos de sus extremidades posteriores y control corporal que les permitió permanecer en paralelo a la superficie del agua durante el desplazamiento, aunque se mantuvo la dependencia de las extremidades anteriores (**Fig. 15A**). Este grupo logró una puntuación de 11.8 ± 0.26 (56.19% de recuperación motora completa) en la escala BBB al final del período de evaluación, lo que significa que las ratas

exhibieron movimientos amplios de las tres articulaciones, colocaron correctamente las patas posteriores sobre la superficie de evaluación y soportaron su peso corporal de manera frecuente o consistente, aunque no presentaron coordinación entre las extremidades anteriores y posteriores durante la marcha (**Fig. 15B**).

En contraste, las ratas del grupo que recibió PPy/I+SW/EE, calificaron como buenas nadadoras en la escala de LSS con un puntaje final de 11.5 ± 1.3 debido al movimiento extenso de las articulaciones de las extremidades posteriores, sin dependencia de las extremidades anteriores, con control del cuerpo durante el desplazamiento y el movimiento de la cola (**Fig. 15A**). Cabe señalar que los movimientos realizados por los animales de este grupo fueron consistentes y coordinados desde el comienzo de la evaluación hasta la sexta semana, a diferencia de lo que se observó en el grupo que recibió solo la RB con SW/EE. Al evaluar a las ratas del grupo PPy/I+SW/EE con la escala funcional BBB, se observó que estas pudieron sostener el tren posterior y coordinar sus extremidades anteriores y posteriores durante la marcha de manera consistente, por lo que el grupo obtuvo un puntaje promedio de 14.13 ± 1.83 (67.28% de recuperación motora completa; **Fig. 15B**).



Basso, Beattie y Bresnahan o BBB. ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey *p < 0,0001

VIII.4. Cuantificación del tejido preservado y análisis morfológico.

Después de dos meses de seguimiento, se realizó el análisis histológico después de teñir los cortes de tejido con hematoxilina-eosina para identificar cambios en la citoarquitectura del área rostral y caudal de la médula espinal, así como del epicentro de la lesión de los animales de cada grupo experimental.

En el caso del grupo control, se observó una marcada reacción astrogliar y la presencia de macrófagos dentro y fuera del sitio de la lesión, así como una disposición irregular y desordenada del tejido nervioso. Del mismo modo, se identificó la formación de estructuras vacuolares y pseudoquistes que contenían fragmentos de axones degenerados y restos celulares alrededor del sitio de la lesión. En el área rostral de la médula espinal de los animales pertenecientes a los grupos tratados con PPy/I y PPy/I+SW/EE, se observó la presencia de hemosiderófagos que fagocitaban restos de sangre y productos de la hemorragia resultante del trauma, así como hemosiderina en el área caudal, lo cual también se observó en la región caudal de la médula espinal de los animales que se sometieron a RB (**Fig. 16A**). Aunque la reacción astrogliar disminuyó en los tres grupos que recibieron alguno de los tratamientos, se observó la presencia de macrófagos espumosos en el epicentro de la lesión y en el área caudal, lo cual fue más evidente en los grupos que recibieron por separado el PPy/I o la RB por SW/EE, en contraste con el grupo que recibió ambos tratamientos en combinación (PPyI+SW/EE). En los grupos que fueron tratados con el biopolímero PPy/I, los macrófagos fagocitaron restos celulares, pero no fragmentos del PPy/I (**Fig. 16A**), cuya presencia redujo el daño estructural al tejido nervioso en las porciones rostral y caudal de la médula espinal. Cabe destacar que, el epicentro de la lesión de los animales que recibieron cualquiera de los 3 tratamientos fue ocupado principalmente por tejido, mientras que en el grupo control, se formó una zona quística en esta área. Además, se observaron vasos sanguíneos de reciente formación en el epicentro de la lesión en los grupos tratados con PPy/I o SW/EE, lo que fortalece la idea de un probable proceso de reparación. Más aún, en el grupo que recibió el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE, en la región caudal se observó la presencia de neuronas con núcleos redondos e intactos y nucléolos, mientras que en el grupo que recibió

solo el PPy/I, algunas neuronas estaban en buen estado, aunque otras estaban en proceso de muerte celular por autofagia, principalmente en la zona rostral (**Fig. 16A**).

En los animales del grupo de control, se detectó la menor cantidad de tejido nervioso preservado ($23 \pm 0,52 \mu\text{m}$), la formación de numerosos microquistes y quistes en la periferia del epicentro de la lesión y quistes grandes en la porción central de la médula espinal (**Fig. 16A y B**). Aunque el grupo tratado con SW/EE no mostró diferencias significativas con respecto al resto de los grupos en relación a la preservación del tejido nervioso debido al adelgazamiento de la médula espinal en el epicentro de la lesión, si exhibió un daño reducido inducido por la LTME ($24.52 \pm 01.32 \mu\text{m}$) aunado a la presencia de neuronas cerca del sitio de la lesión y tejido de composición no identificada aún (**Fig. 16A y B**). Por otro lado, la cantidad de tejido preservado en los animales del grupo que recibió el PPy/I ($25.91 \pm 0.82 \mu\text{m}$), así como del grupo que recibió el tratamiento combinado con PPy/I+SW/EE ($26.74 \pm 0.78 \mu\text{m}$), mostraron diferencias significativas en comparación con los animales del grupo de control ($p = 0.0228$ y $p = 0.0029$, respectivamente), pero sin diferencias significativas entre estos dos grupos (**Fig. 16B**).

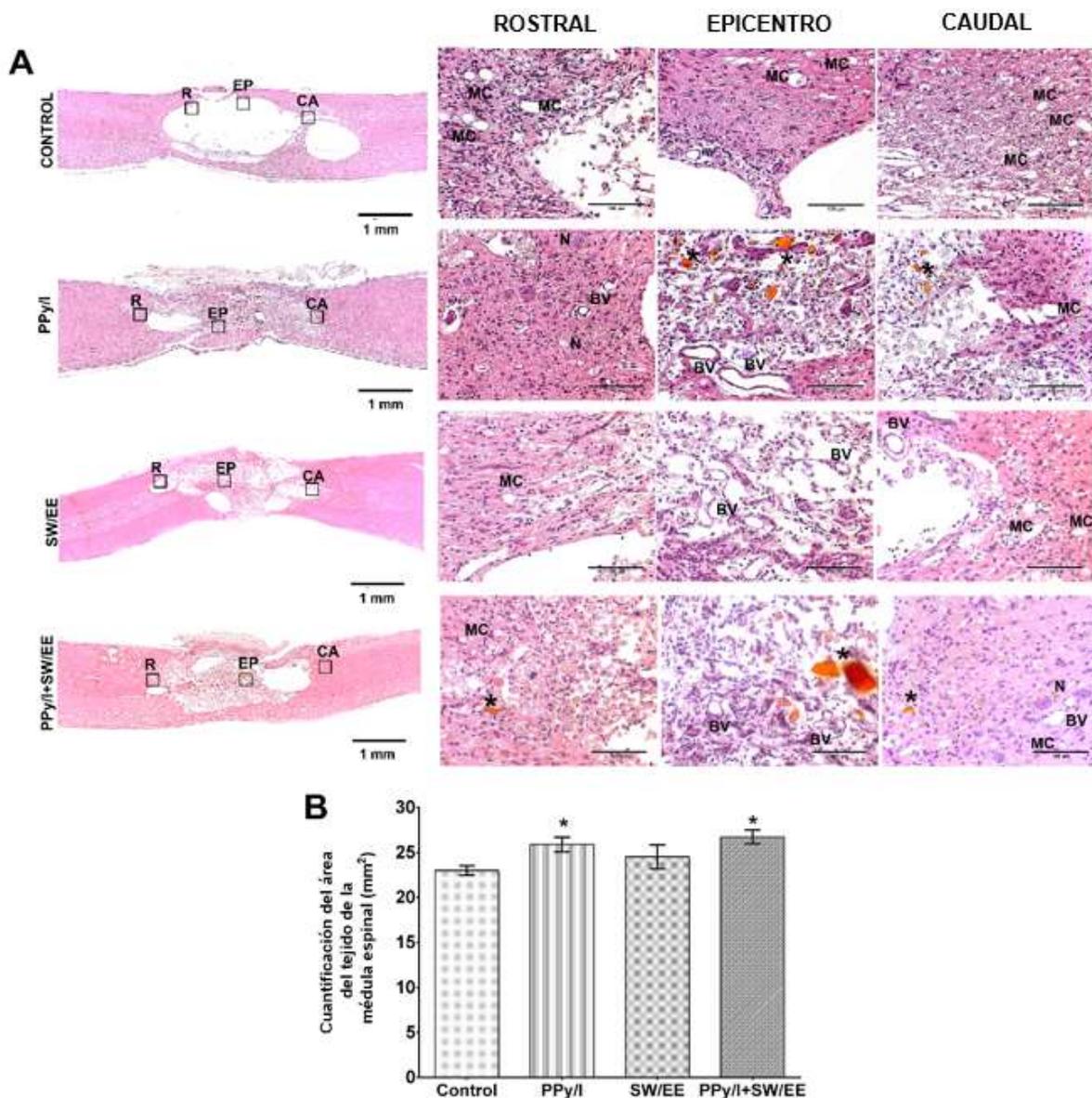


Figura 16. Análisis histológico. **A.** Cortes longitudinales de la médula espinal de animales representativos de cada grupo teñidos con hematoxilina-eosina (2.0X). Se muestra el grado de destrucción del tejido medular y los quistes formados en la médula espinal de animales representativos de cada grupo, con sus respectivos acercamientos a 20X y 40X en el epicentro de la lesión (EP) y las áreas rostral (R) y caudal (CA) de la médula espinal, donde se observan macrófagos (MC) y se aprecia el biopolímero alrededor del sitio de lesión (SL) en los especímenes de los grupos tratados con polipirrol yodo (PPy/I) y PPy/I+ rehabilitación física con nado y medio enriquecido (SW/EE). Nótese que en el espécimen de este último grupo también se observa la presencia de neuronas (N) y la neoformación de vasos sanguíneos (BV). **B.** Cuantificación del tejido preservado, mediante análisis morfométrico con el software Fiji. ANOVA de una vía seguida de Dunnett ($p < 0.05$). Media \pm SEM ($n = 6$). El grupo control sin tratamiento es diferente al de PPy/I ($p = 0.0028$) y PPy/I+RB ($p = 0.0029$).

VIII.5. Evaluación por Inmunofluorescencia de la expresión de GAP-43, MBP y β III-tubulina.

Se evaluaron las moléculas relacionadas con los procesos de plasticidad y regeneración nerviosa, incluidas GAP-43, β III-tubulina y MBP. La inmunofluorescencia para β III-tubulina y GAP-43 mostró la expresión de ambos marcadores en el epicentro de la lesión en los grupos de tratamiento PPy/I, SW/EE y PPy/I+SW/EE, mientras que en las ratas del grupo control, la expresión de estas moléculas estuvo prácticamente ausente. Lo relevante es que la médula espinal de los animales tratados con SW/EE y PPy/I+SW/EE exhibió fibras positivas a β III-tubulina que cruzaron el sitio de la lesión y se colocalizaron con GAP-43 (**Fig. 17**), mientras que MBP mostró una ligera expresión en el epicentro de la lesión sin colocalización con β III-tubulina (**Fig. 18**). Estos resultados se observaron en el 66% de los animales tratados con SW/EE o PPy/I+SW/EE, en el 33% de los animales tratados con PPy/I y en ninguno de los animales del grupo de control.

Aunque el grupo control no mostró expresión de MBP (verde) ni de β III-tubulina (rojo) en el sitio de lesión, es posible observar la expresión de MBP a lo largo de la sustancia blanca en la periferia del tejido dañado. Lo mismo se observa en el caso del grupo tratado con PPy/I y SW/EE. Sin embargo, en el grupo que recibió el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE, sólo se observó marcaje positivo para β III-tubulina y expresión de MBP cerca de los cuerpos celulares localizados en el sitio de lesión (**Fig. 18**).

El análisis de la inmunofluorescencia para la proteína β III-tubulina mostró un aumento significativo de su expresión en los grupos que recibieron PPy/I, SW/EE o PPy/I+SW/EE, ($p=0.0002$, $p<0.0001$ y $p=0.0009$, respectivamente). Con respecto a GAP-43 y MBP, el inmunomarcaje solo fue significativo en el grupo que recibió el PPy/I ($p=0.0096$ y 0.0032 , respectivamente) (**Fig. 19**).

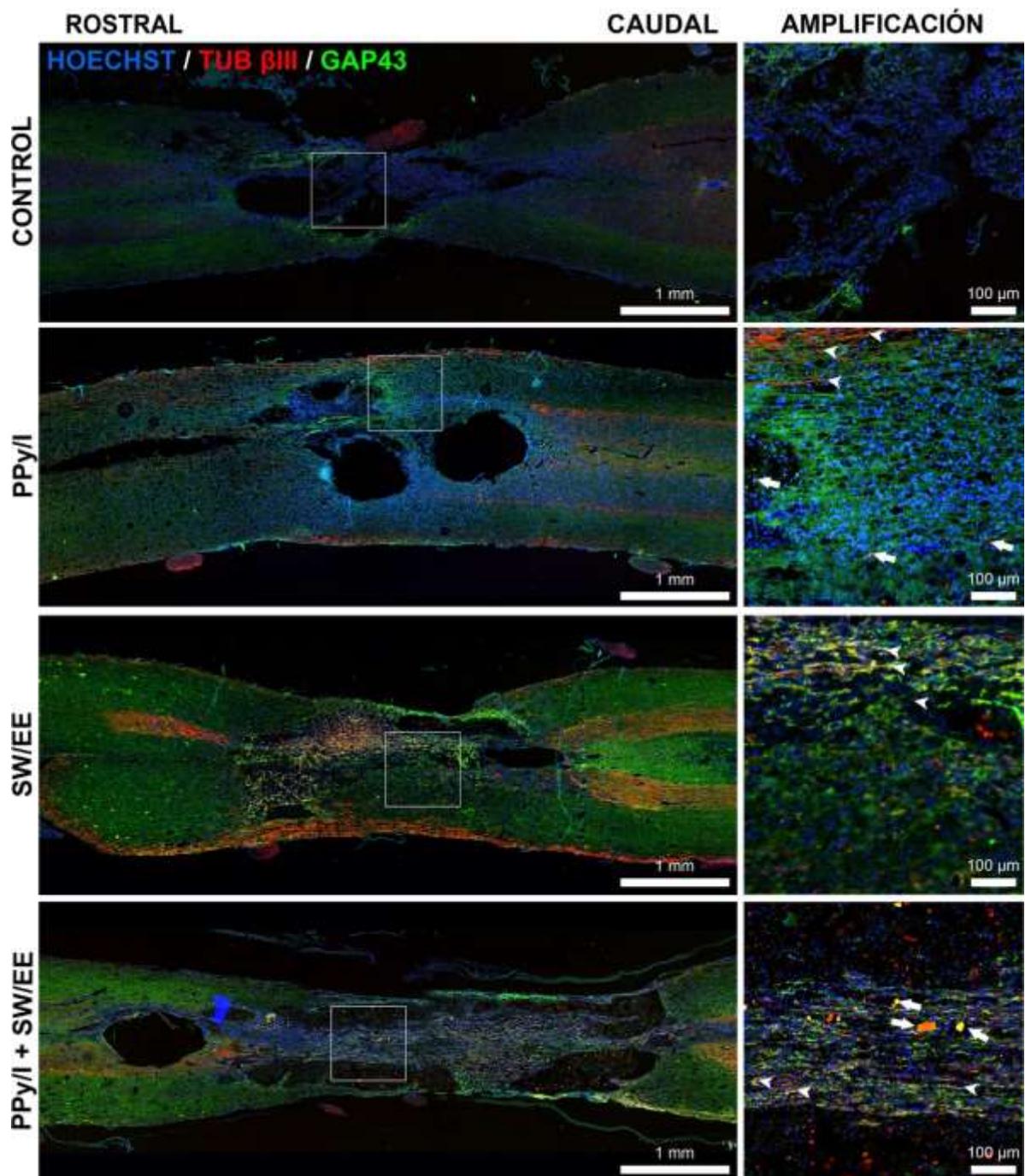


Figura 17. Expresión de moléculas relacionadas con los procesos de regeneración y plasticidad neuronal después de una lesión traumática de médula espinal (LTME). Doble marcaje inmunohistoquímico de cortes longitudinales de la médula espinal 8 semanas después de una LTME: Sin tratamiento (Control), polipirrol/yodo (PPy/I), rehabilitación por nado y medio enriquecido (SW/EE) y, tratamiento combinado (PPy/I+SW/EE). Se observa el inmuno-marcaje de GAP-43 (verde), proteína asociada al recrecimiento axonal y, de β III-tubulina (rojo), proteína

asociada a la regeneración y guía axonal. Los núcleos celulares se observan en azul (Hoechst). Co-localización de GAP43 y β III tubulina (puntas de flecha), PPy/I implantado (flechas).

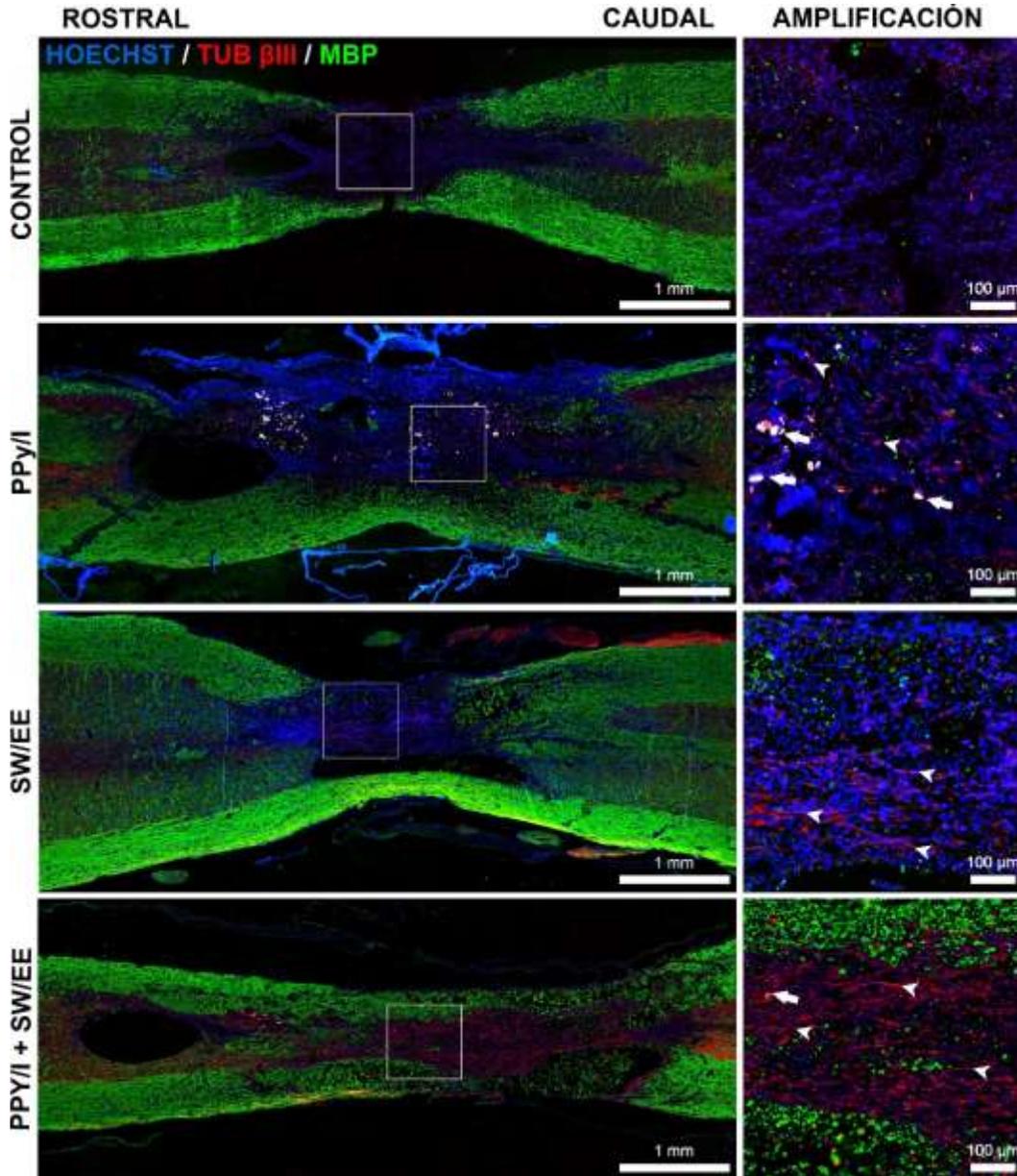


Figura 18. Expresión de la proteína básica de la mielina (MBP) después de una lesión traumática de médula espinal. Doble marcaje inmunohistoquímico en cortes longitudinales de la médula espinal 8 semanas después de una lesión traumática de la médula espinal: Sin tratamiento (Control), polipirrol/yodo (PPy/I), rehabilitación por nado y medio enriquecido (SW/EE) y, tratamiento combinado (PPy/I+SW/EE). Inmuno-marcaje de MBP (verde), proteína relacionada con los procesos de mielinización y de β III-tubulina (rojo), proteína asociada a la regeneración y guía

axonal. Los núcleos celulares se encuentran marcados en azul (Hoechst). Co-localización de MBP y β III-tubulina (puntas de flecha), PPy/I implantado (flechas).

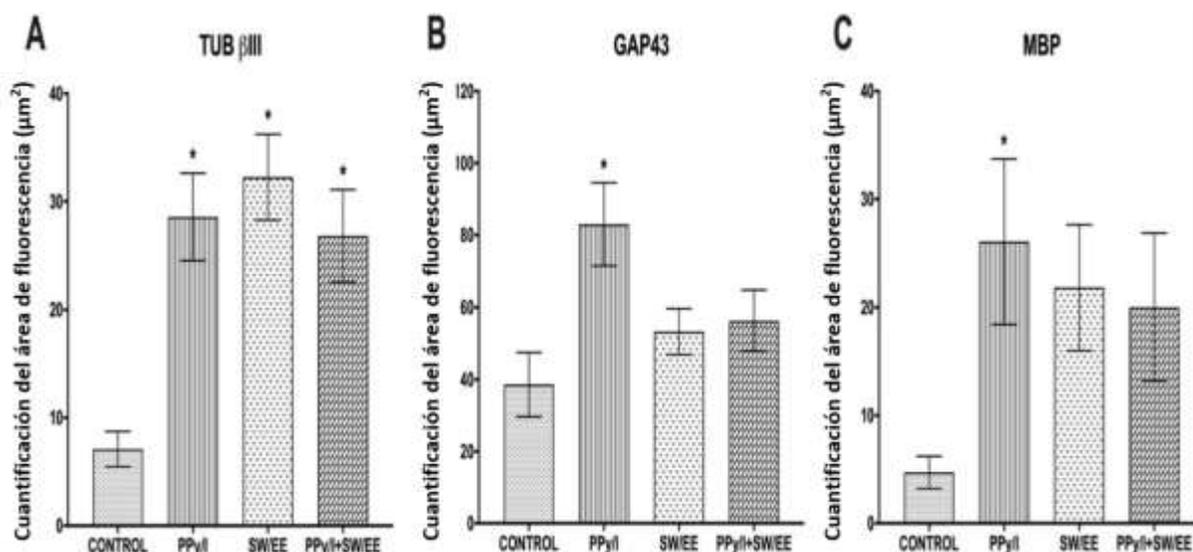


Figura 19. Cuantificación del área de fluorescencia resultante del análisis de inmunofluorescencia de β III-tubulina, GAP-43 y MBP 8 semanas después de la lesión traumática de la médula espinal: Sin tratamiento (Control), polipirrol/yodo (PPy/I), rehabilitación por nado y medio enriquecido (SW/EE) y, tratamiento combinado (PPy/I+SW/EE). La proteína β III-tubulina mostró un aumento significativo en los grupos PPy/I, SW/EE y PPy/I+SW/EE (* $p=0.0002$, $p<0.0001$ y $p=0.0009$, respectivamente) al compararlos con el grupo control. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El immuno-marcaje de las proteínas GAP-43 y MBP mostró un aumento significativo en el grupo tratado con PPy/I (* $p=0.0096$ y $p=0.0032$, respectivamente) al compararlos con el grupo control. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

VIII.6. Astrocitos inmunoreactivos a GFAP.

En el grupo de control, la expresión de GFAP aumentó en respuesta a la LTME debido a la gliosis reactiva producida principalmente por astrocitos hipertróficos, mientras que en los grupos tratados con SW/EE, PPy/I y PPy/I+SW/EE, la expresión de GFAP disminuyó (**Fig. 22A**). El porcentaje de astrocitos inmunoreactivos a GFAP en el grupo control fue de 85.6 ± 6.4 mm². En el grupo que recibió RB por SW/EE, el área astrocítica se redujo a 63.06 ± 5.6 mm² y en el grupo tratado con PPy/I se redujo a 50.2 ± 3.3 mm², mientras que en el grupo que recibió el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE, se redujo a 47 ± 5.6 mm². Aunque las diferencias fueron significativas en todos los casos ($p=0.05$), esta fue mayor en los animales tratados con PPy/I ($p=0.0001$) y con PPy/I+SW/EE ($p=0.0001$), en los que la formación de la

ciatriz glial se caracterizó por la presencia de gliosis moderada en la interfaz entre el biopolímero PPy/I y el tejido de la médula espinal (**Fig. 20A y B**).

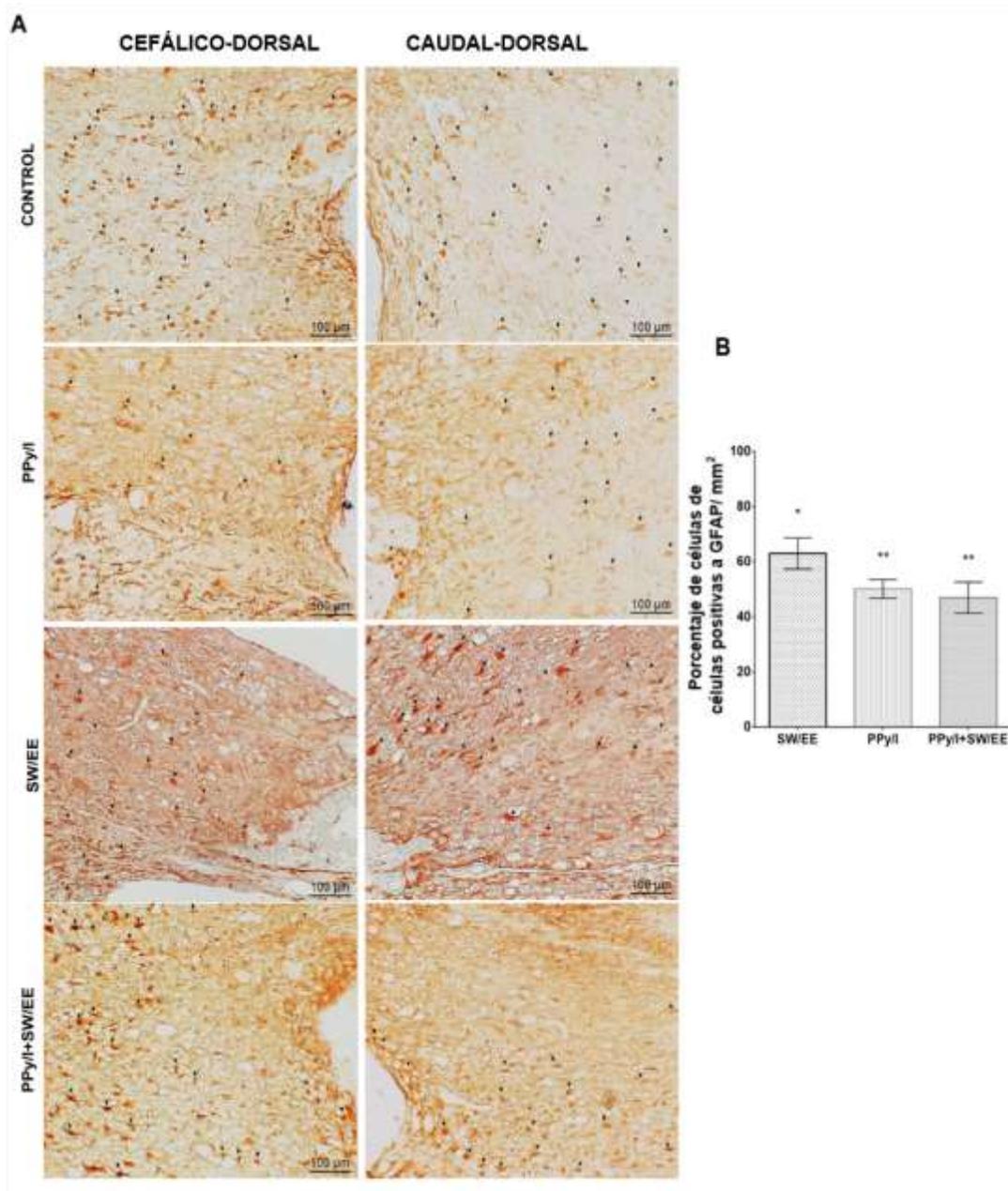


Figura 20. Expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) después de una lesión traumática de médula espinal (LTME). A. Astrocitos inmunoreactivos a GFAP después de la rehabilitación por nado y medio enriquecido (SW/EE), del tratamiento con polipirrol yodo (PPy/I) y de la combinación de ambos (PPy/I+SW/EE). B. Cuantificación de los astrocitos inmunoreactivos en la médula espinal de los animales incluidos en los diferentes grupos experimentales. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnet (* $p < 0.05$), Media \pm SEM.

VIII.7. Expresión génica

Se analizó la integridad del RNA de un total de 15 muestras que corresponden a 3 animales por grupo y 30 días de evaluaciones funcionales. Los grupos analizados corresponden a un grupo Sham, Control, PPy/I y PPy/I+SW/EE. En la **Figura 21** se presentan los electrogramas y el gel, obtenido a partir de muestras representativas de cada grupo experimental, que indican un RIN superior a 7 y fragmentos de RNA conservados.

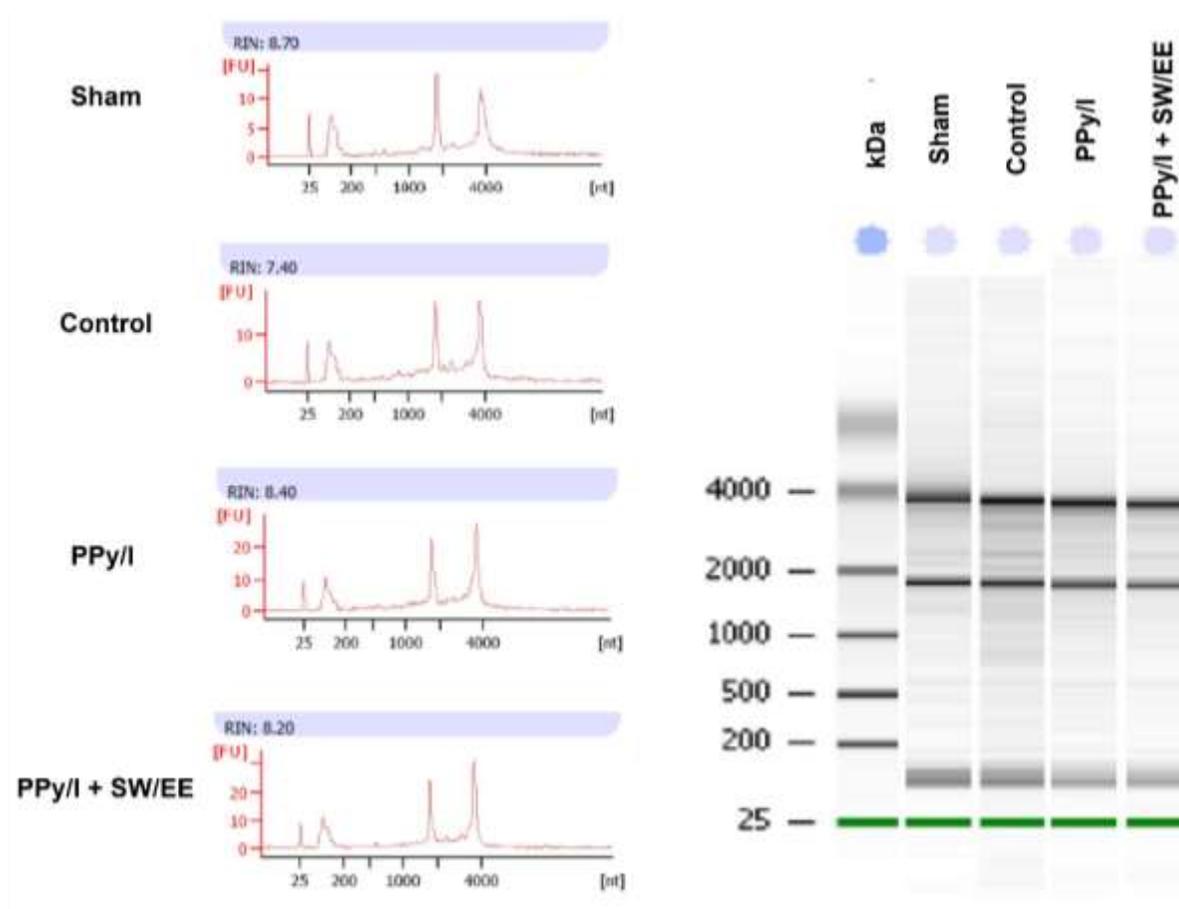


Figura 21. Análisis de la calidad del RNA. Electrogramas del bioanalizador y gel que indican la integridad del RNA (RIN) representativos de cada uno de los grupos experimentales analizados.

Los perfiles de expresión génica entre los grupos experimentales se analizaron con el programa TAC, con una significancia de $p < 0.05$ y un fold change (FC) o razón de cambio menor a 2 o mayor a -2. Es así como al comparar el grupo sham y el grupo control, se observó que, de un total de 23188 genes analizados en el microarreglo, 3570 se modificaron debido a la LTME, de ese grupo de genes 1734, es decir el 48.57% están sobre expresados y 1836, es

decir el 51.43% se encuentran regulados a la baja. Asimismo, la comparación del grupo control el que recibió el PPy/I, mostró que este último modifica 82 genes en total, de los cuales 65 son sobreexpresados y 17 presentan disminución en su expresión.

La comparación en la expresión de genes entre el grupo control y el grupo con el tratamiento PPy/I+SW/EE, indicó un total de 84 genes modificados por la intervención combinada, 41 sobre expresados y 43 presentaron una disminución en su expresión (**Fig. 22A**). Estos datos señalan que la intervención con PPy/I regula a la alta una mayor cantidad de genes comparado con el tratamiento de la combinación (PPy/I + SW/EE) cuya modificación en la expresión de genes representa casi el mismo porcentaje para genes regulados a la alta que aquellos que regulados a la baja (**Fig. 22B**).

La comparación de los perfiles de expresión génica también se realizó entre los grupos PPy/I y PPy/I + SW/EE observándose que entre ambos tratamientos modifican la expresión de 156 genes en total posterior a la LTME, de los cuales, comparten sólo 10.

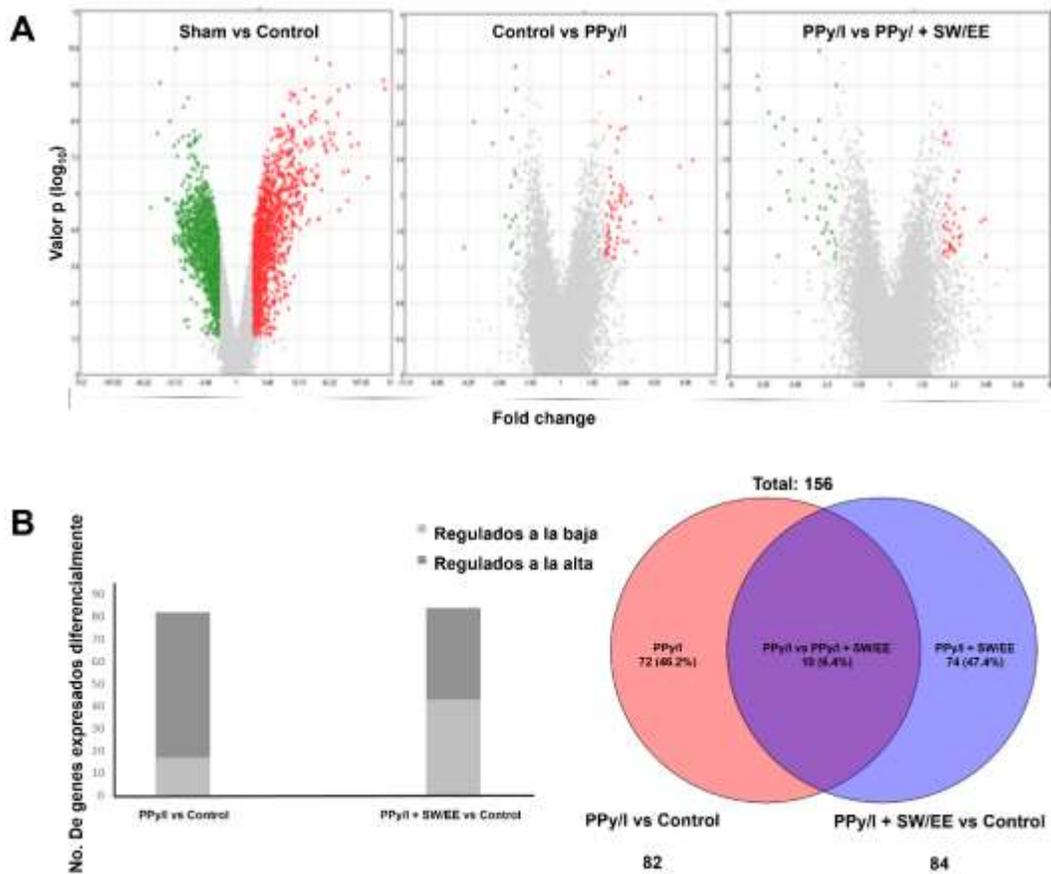


Figura 22. Expresión génica diferencial. **A.** Gráfica de Volcán de los genes expresados diferencialmente FC (-2 a +2), $p < 0.05$, a los 30 días después de la lesión traumática de la médula espinal (LTME). Los genes sobre expresados se encuentran representados en rojo y los en verde. **B.** Comparación del número de genes expresados en el grupo control y los grupos con los tratamientos PPy/I y PPy/I + SW/EE. Así como el número de genes expresados y compartidos entre PPy/I y PPy/I + SW/EE.

Considerado los datos del microarreglo obtenidos y el análisis con la base de datos PANTHER se encontró que las GO con mayor participación de genes tanto con el tratamiento de PPy/I como con PPy/I + SW/EE fueron la categoría de “procesos biológicos” donde sobresalieron las subcategorías “procesos celulares” y “procesos metabólicos”, “regulación biológica”, “localización”, “respuesta a estímulos” y “señalización” (**Fig. 23 y 24**).

El tratamiento con PPy/I modificó 34 genes relacionados con procesos de metabolismo celular, biogénesis celular, comunicación celular, respuesta celular a estímulos, “transducción de

señales”, principalmente. Aunado al análisis con la plataforma PANTHER, se realizó una búsqueda bibliográfica enfocada en los trabajos de LTME que resaltan la expresión de los genes encontrados en cada uno de los procesos biológicos mencionados y se encontró que los genes cuya expresión se modifica con la administración de PPy/I, en general parecen estar relacionados con procesos de diferenciación durante el desarrollo del SNC (Samd14, Dapl1, Adam8), neurogénesis (Ache) transmisión sináptica (Rerg, Slc18a3, Sl32a1), crecimiento de neuritas y supresión de la muerte neuronal (Adam8), (**Fig. 23**).

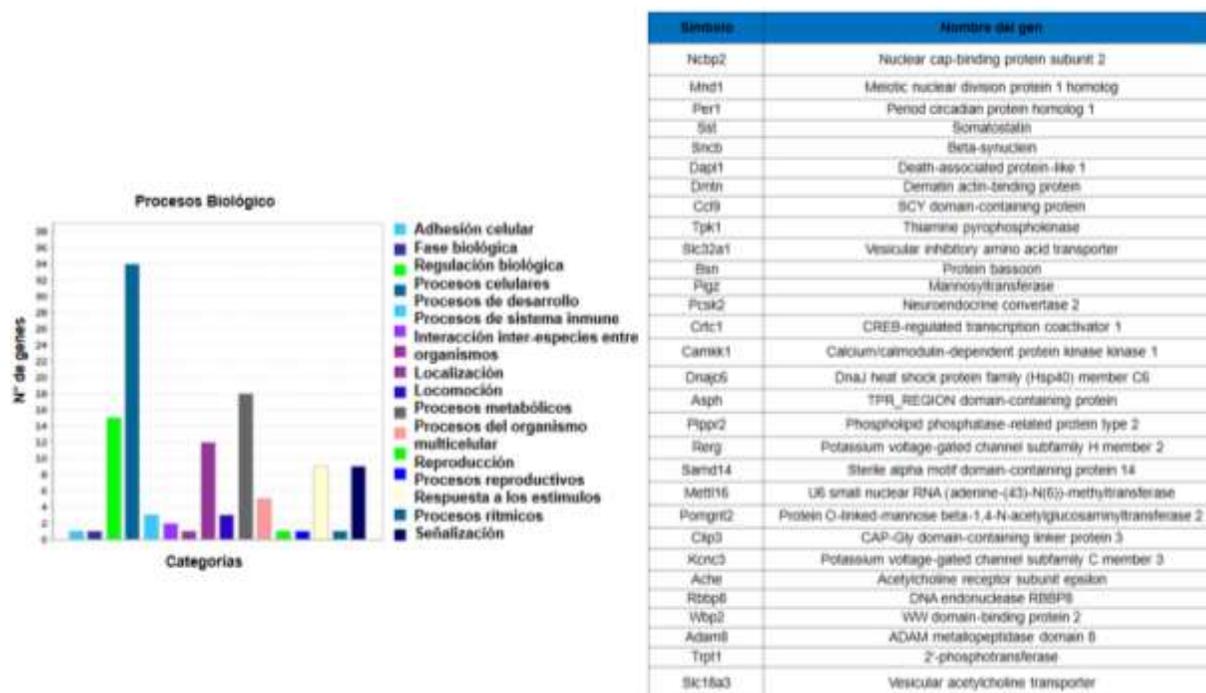


Figura 23. Análisis de genes con la administración de polipirrol/yodo (PPy/I) según el proceso biológico en el que participan. A. Procesos biológicos alterados por PPy/I sintetizado por plasma y aplicado después de una lesión traumática de médula espinal (LTME). **B.** Lista de genes que participan en procesos celulares modificados por PPy/I.

Mientras que el tratamiento combinado PPy/I + SW/EE, modificó 41 genes relacionados con procesos, celulares, biogénesis, procesos de desarrollo celular, muerte celular transducción de señales procesos basados en microtúbulos, entre otros (**Fig. 24**). Aunado a lo anterior se encontró que, el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE, favoreció la expresión de genes que participan en la organización celular (Clip3, Parvg, Tubb4, Dnah12 y Dnah11), guía y proyección axonal (Dpys15, Dpys13, Calb1 y Kcnc3), desarrollo del SNC (Junb, VEGFb, Kitlg,

Cdkn1a, Bcl-2 y Clip3), sinaptogénesis (Cdkn1a, Ttyh3), angiogénesis (VEGFB, Hba1 y Hbaa1) y mielinogénesis (Myrf, Dopey1) (**Fig. 24**).

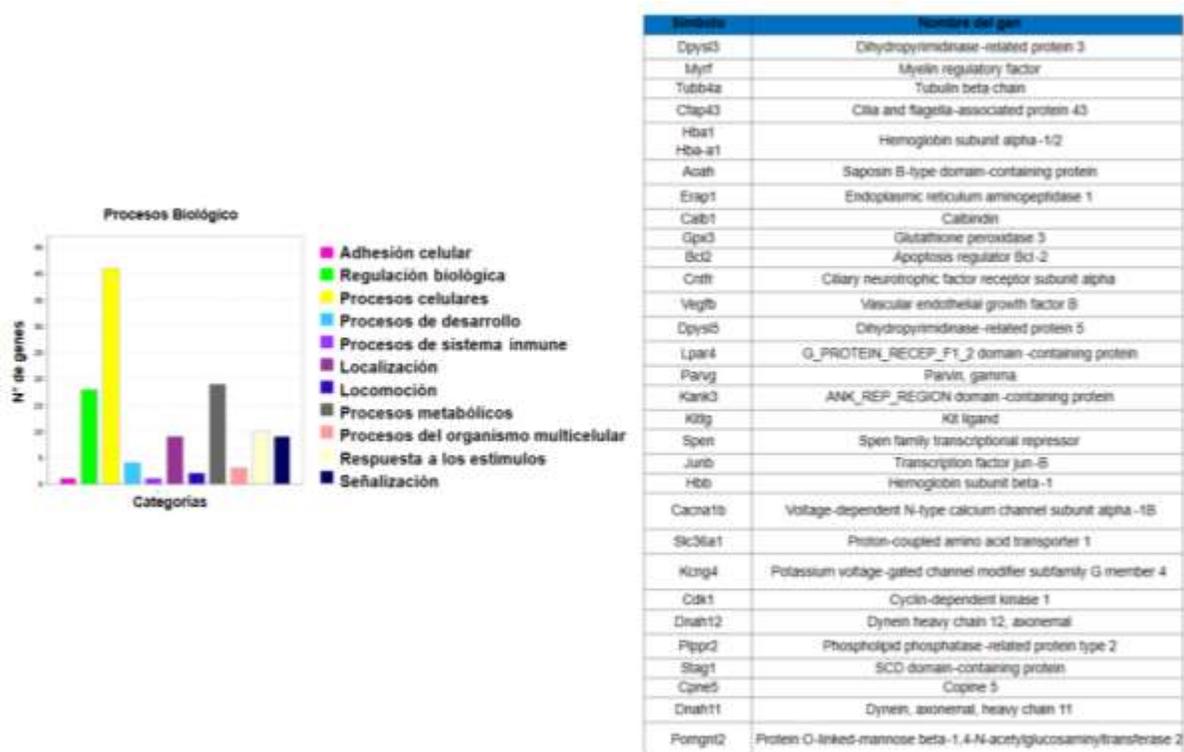


Figura 24. Análisis de genes con la administración de polipirrol/yodo (PPy/I) sintetizado por plasma y aplicado en combinación con la rehabilitación mixta por nado y medio enriquecido (SW/EE) según el proceso biológico en el que participan. A. Procesos biológicos alterados por el tratamiento con PPy/I + SW/EE después de una lesión traumática de médula espinal (LTME). **B.** Lista de genes que participan en procesos celulares modificados por PPy/I + SW/EE.

Con base en la información anterior, el FC y la $p < 0.05$ del microarreglo, se eligió a la Tubb3, Tubb4 y a VEGF para la validación del mismo para un estudio posterior.

IX. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la aplicación combinada del biopolímero PPy/I sintetizado por plasma más la RB mixta por SW/EE (PPy/I+SW/EE), mejora la salud general de los animales, promueve la preservación del tejido nervioso en el sitio de la lesión, reduce la formación de la cicatriz glía, promueve la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de plasticidad nerviosa no solo en los extremos distales y proximales del sitio de

la lesión, sino a través del área lesionada y, permite una mayor recuperación de la función motora después de una LTME por contusión.

Aunque se han descrito algunos efectos benéficos de diferentes biomateriales sintetizados por métodos químicos o electroquímicos convencionales, incluyendo la reducción del daño a la membrana celular y del estrés oxidante, el aumento de la angiogénesis y de la regeneración y remielinización axonal (Kataoka, Suzuki y cols., 2004, Hejcl, Ruzicka y cols., 2018), así como la reducción de la astrocitosis y la formación de la cicatriz glial (Woerly, Doan y cols., 2004), poco o nada se refieren a la recuperación de la función motora. En el presente estudio, se mostró el efecto benéfico del PPy/I sintetizado por plasma, en la recuperación de la función motora como lo había reportado nuestro grupo de investigación en trabajos previos, pero con diferentes condiciones experimentales y modelo de LTME (Cruz, Mondragon-Lozano y cols., 2012, Alvarez-Mejia, Morales y cols., 2015b, Mondragon-Lozano, Rios y cols., 2017). Más aún, en un trabajo previo, se demostró que los animales con LTME por sección completa de la médula espinal que recibieron PPy/I sintetizado por plasma, tuvieron una mejor integración del implante en el tejido nervioso, menor respuesta inflamatoria y una mejor recuperación funcional que los animales a los que se les aplicó el PPy/I sintetizado por métodos químicos o electroquímicos convencionales (Álvarez-Mejía, Salgado-Ceballos y cols., 2015a).

Lo anterior puede deberse al hecho de que el método de síntesis por plasma modifica las características fisicoquímicas del biomaterial incluyendo la humectabilidad, la rugosidad o la energía libre en la superficie (Kostov, Nishime y cols., 2014). Debido a lo anterior, el tratamiento con plasma ha sido utilizado para aumentar la adhesión celular y la biocompatibilidad del material a través de la funcionalización de la superficie con grupos químicos hidrofílicos y mejorar las propiedades de la superficie (Sagbas, 2016). En este punto, el tratamiento de la superficie con plasma de argón seguido de plasma de oxígeno, conduce a la incorporación de grupos polares como los grupos hidroxilo que promueven la adhesión celular (Jordá-Vilaplana, Fombuena y cols., 2014), o la modificación por plasma atmosférico del aire, que aumenta la energía libre de la superficie y mejora la humectabilidad y rugosidad de los materiales (Jordá-Vilaplana, Fombuena y cols., 2014). Como algunos polímeros tratados con plasma disminuyen significativamente el ángulo de contacto con el agua (de 70° a 24°), aumentan drásticamente la rugosidad a nanoescala, lo que mejora la biocompatibilidad (Wang, Favi y cols., 2016, Griffin, Ibrahim y cols., 2017). Otros tratamientos

con plasma promueven la adhesión y la proliferación celular al aumentar la energía superficial, la hidrofilia y su funcionalidad química cuando se introducen residuos de oxígeno y nitrógeno en la superficie de los polímeros (Chen, Siow y cols., 2017), lo que podría explicar, al menos en parte, la activación de los procesos de regeneración (aumento en la expresión de GAP-43) y de plasticidad (aumento en la expresión de β III-tubulina), observados en los animales que recibieron el implante de PPy/I después de LTME. Además, se ha mostrado que el material funcionalizado con grupos COOH y el andamio funcionalizado con NH₂, promueven la diferenciación celular (Griffin, Ibrahim y cols., 2017). Debido a que el PPy/I sintetizado por plasma contiene gran cantidad de grupos NH₂ es posible que dicho polímero favorezca la diferenciación de las células madre neurales intrínsecas localizadas tanto en la capa endodérmica de la médula espinal (Rusanescu, 2016) como en las meninges (Meletis, Barnabe-Heider y cols., 2008, Decimo, Bifari y cols., 2011), las cuales podrían haber favorecido la recuperación funcional observada al final del seguimiento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que diferentes tratamientos con plasma podrían producir diversos efectos, ya que también se ha demostrado que el material modificado con argón tiene mayor capacidad de adsorción de proteínas y es más efectivo para favorecer la adhesión de fibroblastos dérmicos humanos, así como para permitir una mayor integración tisular y angiogénesis después de implantarlos subcutáneamente, en comparación con los andamios tratados con oxígeno y plasma de nitrógeno (Griffin, Palgrave y cols., 2018).

En el presente estudio y, con el objetivo de aumentar los efectos benéficos del PPy/I sintetizado por plasma, se utilizó en combinación con la RB física, la única estrategia terapéutica aceptada mundialmente para el tratamiento de pacientes con una LTME (Sandrow-Feinberg y Houlé 2015, Hachem, Ahuja y cols., 2017a). No obstante lo anterior, se ha demostrado que si se aplica la RB física en la fase aguda de la LTME, los mecanismos secundarios de daño como la inflamación y el estrés oxidante pueden incrementarse y con ello el daño a la médula espinal, ya que algunos tipos de RB física pueden alterar la presión arterial, aumentar la extravasación de macromoléculas en el parénquima de la médula espinal y exacerbar los procesos inflamatorios (Smith, Brown y cols., 2009, Fu, Wang y cols., 2016). Debido a que casi ningún tipo de RB física puede iniciarse en las primeras etapas después de la LTME por la condición general del paciente y de la propia médula espinal, en el presente estudio esta estrategia terapéutica se implementó dos semanas después de la LTME para

evitar la progresión del daño, proteger a las neuronas supervivientes, generar simultáneamente un entorno favorable para el crecimiento axonal y/o aumentar la conducción nerviosa en las fibras supervivientes.

Aunque se ha descrito que la RB por SW produce mejoras importantes en el movimiento y en el patrón de marcha de las extremidades posteriores (Smith, Shum-Siu y cols., 2006a), cuando se evalúa a los animales en un campo abierto, no se observa una recuperación funcional significativa probablemente porque este tipo de RB no siempre mejora la fuerza generada (Magnuson, Smith y cols., 2009), ya que la retroalimentación cutánea y la carga de las extremidades se reducen significativamente en comparación con lo que ocurre durante la marcha con soporte de peso (Muir y Steeves, 1995). Debido a lo anterior, agregamos al algoritmo terapéutico de RB por SW, la RB por EE, lo que puede haber influido en las diferencias observadas, ya que la RB proporcionada por EE, requiere de varios elementos que permiten la actividad física voluntaria y libre individualmente o en grupos; esta última condición incluye la interacción social, la cual es otra forma de RB por estimulación (Fischer y Peduzzi, 2007). Se ha demostrado que la RB por EE promueve la expresión de genes y moléculas involucradas en los procesos de neurogénesis, regeneración y plasticidad como son el factor de crecimiento nervioso o NGF (Keyvani, Sachser y cols., 2004, Birch, McGarry et al. 2013), el factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF (Berrocal, Pearse y cols., 2007) y el factor neurotrófico derivado de células gliales o GDNF (Nithianantharajah y Hannan, 2006), así como el factor de crecimiento similar a la insulina I o IGF-1 (Koopmans, Brans y cols., 2006, Fischer y Peduzzi, 2007) y el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Cao, Jiao y cols., 2004). La RB por EE también puede aumentar las espinas dendríticas de las neuronas (Mohammed, Zhu y cols., 2002), modificar el potencial de membrana (Hosseiny, Pietri y cols., 2015) y promover la sinaptogénesis y la angiogénesis (Gogolla, Galimberti y cols., 2009, Williamson, Chao y cols., 2012, Birch, McGarry y cols., 2013).

Con el esquema de RB mixto (SW/EE) que se utilizó, los animales recuperaron el control del esfínter urinario y anal en etapas tempranas, lo que les permitió vaciar sus vejigas e intestinos voluntariamente a partir de la primera semana de tratamiento, lo cual no ocurrió en los animales del grupo de control. Cabe destacar que, casi ningún animal de los grupos que recibieron la RB por SW/EE, presentó espasticidad en las extremidades posteriores y, aquellos que sí la llegaron a presentar, está disminuyó al iniciar la RB. Lo anterior permitió a los

animales permanecer más activos durante la evaluación en campo abierto y generar movimientos más amplios, coordinados y consistentes en las extremidades posteriores, en comparación con los de los animales de los grupos que no recibieron la RB. Al combinar la RB por SW y EE, la actividad motora y la actividad sensorial se estimularon simultáneamente en los animales. Esto puede producir cambios bioquímicos en arborizaciones dendríticas, espinas dendríticas y sinaptogénesis (Mohammed, Zhu y cols., 2002, Hosseiny, Pietri y cols., 2015). Específicamente, en la LTME, ha demostrado que la RB por EE permite la preservación del tejido nervioso, revierte la percepción anormal del dolor y mejora la recuperación de la función motora (Berrocal, Pearse y cols., 2007).

La estrategia de RB utilizada en el presente estudio, aunada a la aplicación del PPy/I, aumentó los efectos benéficos de la RB, los cuales se alcanzaron en un tiempo más corto. Los animales que recibieron solo la RB por SW/EE, pudieron sostener su peso corporal con frecuencia y dar algunos pasos, pero no pudieron coordinar el movimiento de sus extremidades anteriores y posteriores al final del estudio, mientras que los animales del grupo que recibió el tratamiento combinado con PPy/I+SW/EE, pudieron mantener su peso corporal sobre sus extremidades posteriores de forma consistente, dar pasos plantares y coordinar el movimiento de sus extremidades anteriores y posteriores consistentemente ($BBB = 14.13 \pm 1.83$). Más aún, el nivel máximo de recuperación funcional alcanzado por los animales tratados con RB por SW/EE a las 8 semanas (11.8 ± 0.26), se alcanzó antes de la semana 6 en los animales tratados con PPy/I+SW/EE. Miranda y colaboradores (2012), usaron un modelo de LTME similar al descrito en este trabajo y, RB mediante laberinto, rampa y caminadora, informaron que los mejores resultados se obtuvieron en el grupo que se sometió a RB por rampa, ya que estos animales obtuvieron una puntuación de 11.4 en la escala BBB, lo que significa que los animales pudieron sostener su peso corporal y producir pasos frecuentes, aunque no pudieron coordinar el movimiento de sus extremidades anteriores con el de sus extremidades posteriores (Miranda, Vicente y cols., 2012). Así mismo, Smith y colaboradores (2006a) informaron hallazgos similares cuando utilizaron el mismo modelo de LTME, pero con RB por SW y retroalimentación cutánea durante 64 días a partir del día 14 después de la LTME, con lo que los investigadores observaron una recuperación máxima de 10.9 ± 1.3 en la escala BBB (Smith, Shum-Siu y cols., 2006a). Cuando se aplicó un esquema de RB similar, pero iniciaron la RB por SW al tercer día después de la LTME, los animales solo alcanzaron una puntuación de 9.2 ± 1.2 en la escala BBB (Smith, Brown y cols., 2009), lo que concuerda con la teoría

acerca de que puede ser contra producido iniciar la RB con actividades que requieren esfuerzo en la etapa temprana después de la LTME. Cabe señalar que Berrocal y colaboradores (2007) informaron que los animales con LTME que recibieron RB por EE lograron 13 a 14 puntos en la escala BBB después de 84 días de evaluación (Berrocal, Pearse y cols., 2007). Debido a que el estudio de seguimiento solo se realizó durante 60 días, consideramos importante extender el período de seguimiento en futuros estudios para permitir que la recuperación funcional alcance su máximo nivel para conocer el alcance real de nuestra propuesta terapéutica.

Otro punto a considerar es que, aunque la escala BBB fue desarrollada y validada por Basso y colaboradores en 1995 con ratas hembra de las cepas Sprague-Dawley y Long-Evans, con LTME producida con el impactador NYU y, que se ha utilizado ampliamente para realizar la evaluación funcional en animales con esta patología (Basso, Beattie y cols., 1995), estudios posteriores han demostrado que la escala BBB tiene reproducibilidad alta y sensibilidad satisfactoria para identificar lesiones de intensidad leve; reproducibilidad satisfactoria pero sensibilidad insatisfactoria para identificar lesiones de intensidad moderada y, reproducibilidad reducida y sensibilidad insatisfactoria para identificar lesiones de intensidad severa (Barros Filho y Molina 2008). Por lo tanto, es importante incluir pruebas de cinemática o mecánica de la marcha en futuras evaluaciones funcionales a fin de generar datos más consistentes.

Se ha sugerido que la LTME por contusión de intensidad moderada, disminuye la capacidad del animal para soportar su peso corporal pero no disminuye su capacidad para generar patrones motores. Sin embargo, en LTME severa, incluso cuando se proporciona algún tipo de soporte de peso corporal, dicha capacidad se pierde (Kuerzi, Brown y cols., 2010). Debido a lo anterior, la recuperación funcional observada en los animales del presente estudio puede estar relacionada con la actividad de los centros generadores de patrones (GPC) en la médula espinal, los cuales constituyen circuitos interneuronales capaces de generar actividad rítmica básica al alternar entre múltiples grupos musculares con un patrón temporal apropiado de activación (Rossignol y Frigon 2011). Los GPC están interconectados y, en el caso específico de los cuadrúpedos, las cuatro extremidades están controladas por diferentes GPC (McCrea y Rybak 2008).

Otro factor que puede haber contribuido a la recuperación funcional de los animales es la cantidad de tejido preservado, la cual se evaluó al final del seguimiento mediante el análisis morfométrico de la médula espinal. Los animales de los grupos que recibieron el biopolímero PPy/I tenían una mayor cantidad de tejido conservado. Esto puede deberse al efecto neuroprotector del PPy/I, el cual se demostró previamente en un estudio realizado por nuestro propio grupo de investigación (Olayo, Ríos y cols., 2008). En el estudio, la aplicación de PPy/I, además de tener el efecto descrito anteriormente, disminuyó la presencia de células inflamatorias en la médula espinal después de LTME (Álvarez-Mejía, Salgado-Ceballos y cols., 2015a) y aumentó la presencia de neuronas y oligodendrocitos en el tejido preservado alrededor del epicentro de la lesión.

Adicionalmente, se reportó la presencia de vasos sanguíneos en el sitio de lesión, en los grupos PPy/I y SW/EE que sugiere que podría estar en curso un proceso de reparación en el tejido lesionado. Esta generación endógena de nuevos vasos celulares puede ocurrir en un esfuerzo de auto-reparación, sin embargo, muchos de estos nuevos vasos sanguíneos no logran organizarse en una vasculatura funcional (Bearden y Segal 2004). Casella y cols., (2001), estudiaron la formación de vasos sanguíneos 2, 4, 7 y 14 días después de una LTME por contusión moderada y encontraron que al día 4, la formación de nuevos vasos sanguíneos era evidente en el sitio de lesión. Para el día 7, esos nuevos vasos formaron cordones continuos orientados longitudinalmente a través del sitio de lesión pero a los 14 días, el número de vasos presentes en el sitio de lesión, disminuyó drásticamente (Casella, Marcillo y cols., 2002). Cao y cols., (2017). Y con radiación de sincrotrón μ CT (SR μ CT) para caracterizar los cambios espaciales temporales en 3D en la microvasculatura posterior a la LTME, analizaron la vasculatura en condiciones normales de la médula espinal y posterior a una LTME y observaron una disminución significativa en la fracción de volumen vascular, en la densidad de bifurcación, en la densidad del segmento vascular y en la densidad de conectividad vascular un día después de la lesión, seguida de un aumento gradual a los 3, 7 y 14 días. También reportaron un aumento en la tortuosidad vascular que se estabilizó a los 7 días posteriores a la LTME y disminuyó ligeramente durante el proceso de recuperación vascular señalado a los 28 días (Cao, Zhou y cols., 2017).

En el presente estudio, la presencia de nuevos vasos sanguíneos en el sitio de lesión fue observada a los 30 días después de la LTME pero sólo en los grupos que recibieron alguno

de los tratamientos, lo que sugiere que el PPy/I y la RB mixta por SW/EE, podrían favorecer la preservación de los nuevos vasos formados a partir de la lesión y con esto impactar sobre el grado de recuperación alcanzado. Al respecto, se han reportado diferentes estrategias que promueven la angiogénesis de forma aguda después de la LTME y han mostrado una reducción de la degeneración secundaria y una mejor recuperación funcional. Algunas de las estrategias empleadas incluyen factores de crecimiento como el VEGF y el PDGF, trasplantes de células con efectos angiogénicos y la aplicación de algunos biomateriales con propiedades pro-angiogénicas o capacidad para transportar células o moléculas que favorezcan este mecanismo (Haggerty, Maldonado-Lasunción y cols., 2018, Rocha, Sousa y cols., 2018).

Hasta el momento, no se ha descrito nada acerca del posible efecto angiogénico del PPy/I, aunque los datos obtenidos del análisis de la expresión génica indican que favorece la expresión de moléculas relacionadas con el proceso de angiogénesis y junto con la SW/EE, favorece la expresión de VEGF, pero son necesarios más estudios al respecto, que corroboren los hallazgos encontrados en el análisis histológico.

La expresión de moléculas relacionadas con los procesos de plasticidad y regeneración nerviosa también pudo participar en el proceso de recuperación funcional observado en el presente estudio. Se ha dicho que la capacidad de regeneración de la medula espinal es limitada y poco probable, sin embargo, en los últimos años se ha tenido un progreso significativo en el entendimiento de los procesos regenerativos necesarios para restaurar el daño posterior a una lesión en el SNC. Lee-Liu y cols. (2014) analizaron los procesos biológicos activados en respuesta a la lesión de la médula espinal al comparar las etapas regenerativas y no regenerativas, mostraron diferencias génicas clave entre ambas etapas y las agruparon en dos grupos. El primero involucra procesos relacionados con el soporte y diferenciación de células madre o progenitoras, como procesos de ciclo celular, de desarrollo y metabólicos. El segundo considera los procesos involucrados en proporcionar un entorno permisivo o no permisivo para la regeneración, como la respuesta inmune y la inflamatoria, procesos de oxidación y reducción y la respuesta al estrés (Lee-Liu, Moreno y cols., 2014).

En este sentido, el tratamiento con PPy/I y PPy/I + SW/EE después de la LTME, modificaron un total de 34 y 41 genes respectivamente, relacionados con procesos celulares, metabólicos, de regulación biológica, de respuesta a estímulos y de señalización. Más aún, PPy/I favoreció

la expresión de genes implicados en procesos de diferenciación durante el desarrollo del SNC (Samd14, Dapl1, Adam8), la neurogénesis (Ache), la transmisión sináptica (Rerg, Slc18a3, Sl32a1), el crecimiento de neuritas y la supresión de la muerte neuronal (Adam8). Mientras que el tratamiento combinado PPy/I +SW/EE modificó genes implicados en la organización celular (Clip3, Parvg, Tubb4, Dnah12, Dnah11), la guía y la proyección axonal (Dpys15, Dpys13, Calb1, Kcnc3), el desarrollo del SNC (Junb, VEGFb, Kitlg, Cdkn1a, Bcl-2, Clip3), la sinaptogénesis (Cdkn1a, Ttyh3), la angiogénesis (VEGFb, Hba1. Hba-a1) y la mielinogénesis (Myrf, Dopey1). Por lo que es probable que la modificación de estos procesos contribuya al grado de recuperación funcional alcanzado en los animales de este estudio y a la diferencia significativa que se presenta entre los tratamientos con PPy/I y con PPy/I + SW/EE.

Se ha descrito que algunas de las moléculas y procesos importantes para que se lleve a cabo la regeneración y/o la plasticidad en la médula espinal están relacionados con la etapa del desarrollo, por lo que resulta esencial promover estos procesos. En este rubro, la proteína β III-tubulina es un elemento de los microtúbulos del citoesqueleto y un miembro de la familia de las tubulinas que se encuentra casi exclusivamente en las neuronas y juega un papel importante durante el desarrollo del SNC (Sullivan y Cleveland, 1986). Su expresión puede aumentar después de una lesión en la edad adulta (Storer y Houle, 2003, Tischfield, Baris y cols., 2010) y puede ser modificada por la RB. Cabe destacar que en el presente estudio se identificó a la proteína β III-tubulina en las fibras que atravesaron el epicentro de la lesión en los animales de los grupos que recibieron RB por SW/EE y PPy/I + SW/EE; efecto que no se observó en los animales del grupo control, en los que se encontró baja expresión de esta proteína en la periferia del epicentro de la lesión. Esto puede indicar que la β III-tubulina tiene un efecto neuroprotector ya que las β -tubulinas contienen una cisteína en la posición 239, mientras que la β III-tubulina tiene una cisteína en la posición 124. La posición 239 se puede oxidar fácilmente, mientras que la posición 124 es relativamente resistente a la oxidación (Ludueña, 1993, Ludueña y Banerjee, 2008), por lo que un aumento en la expresión de β III-tubulina durante el proceso de estrés oxidante observado después de LTME, puede proporcionar un efecto neuroprotector.

La aplicación tanto del biopolímero PPy/I como de la RB por SW/EE también aumentó la expresión de GAP-43, una molécula involucrada en los procesos de regeneración y elongación axonal (Kusik, Hammond y cols., 2010). Esto es relevante ya que se ha demostrado que un

aumento en la expresión de GAP-43 promueve la plasticidad nerviosa y cambios en las redes espinales que controlan los patrones locomotores que a su vez promueven la recuperación funcional (Girgis, Merrett y cols., 2007). Por el contrario, la expresión de la MBP, molécula que participa en el proceso de mielinización y está directamente relacionada con la funcionalidad axonal, mostró baja expresión en el epicentro de la lesión y no se co-localizó con la β III-tubulina, probablemente debido a que los procesos de regeneración axonal todavía estaban activos, ya que la mielinización solo tiene lugar cuando estos procesos ya han terminado. Sin embargo, la remielinización de los axones periféricos al sitio de la lesión fue promovida por la aplicación del biopolímero PP/I y/o la RB por SW/EE, lo cual es importante debido a que la MBP es capaz de atenuar la activación de la microglía (Cui, Liu y cols., 2016) y su expresión ocurre no solo cuando se aplican estrategias de RB que involucran la realización de actividades físicas, sino también cuando se aplican tareas de aprendizaje (Sampaio-Baptista, Vallès y cols., 2019), y en el caso de la LTME, ambas deben ser considerada cuando se necesita volver a aprender a caminar.

A pesar de esto, también se ha descrito que, en organismos desarrollados, los procesos de plasticidad se pueden bloquear debido a la reacción de las células gliales después de la LTME ya que tanto los astrocitos como la microglía forman una cicatriz capaz de limitar el crecimiento axonal al formar una barrera física que previene el crecimiento neuronal y axonal (Lin, Xu y cols., 2014), lo cual y está relacionado con un aumento en la expresión de moléculas como GFAP. Al respecto, cabe señalar que, en el presente estudio, aunque la RB por SW/EE fue capaz de disminuir la expresión de GFAP, esta expresión se redujo aún más en el grupo que recibió el tratamiento combinado PPy/I + SW/EE, en el que se observó una delgada cicatriz glial y se detectó una menor expresión de GFAP en comparación con la observada en los animales del grupo control. De esta forma, el PPy/I y la RB por SW/EE son capaces de modular la reactividad de los fenotipos de astrocitos y microglia en la cicatriz glial, y promover así la neuroregeneración.

Es importante señalar que, aunque varios biopolímeros como la policaprolactona (Chen, Knight y cols., 2011), el colágeno (Suzuki, Kanchiku y cols., 2015), la fibronectina (Khatun, King y cols., 2007), el ácido hialurónico (Wen, Yu y cols., 2016), la agarosa (Han, Lee y cols., 2018), el polietilenglicol (Ren, Liu y cols., 2019), diferentes hidrogeles y el NeuroGel (Woerly, Doan y cols., 2004, Hejčl, Růžička y cols., 2018), han probado su capacidad para disminuir el

número de astrocitos reactivos, preservar el tejido nervioso y promover el recrecimiento, la remielinización axonal y la recuperación funcional, la mayoría de estos biopolímeros no producen todos esos efectos beneficiosos juntos. Más aún, algunos de estos efectos benéficos pueden deberse al hecho de que algunos de esos biopolímeros se aplicaron en combinación con células, fármacos o moléculas tróficas; así, dado que, en general, los biomateriales se utilizan prácticamente como andamio, soporte o guía, estos efectos pueden haberse debido a las células, fármacos o moléculas tróficas más que al propio polímero (Führmann, Tam y cols., 2016, Wang, Wang y cols., 2017, Anopas, Junquan y cols., 2018, Zhou, Fan y cols., 2018).

En el presente estudio, el biopolímero PPy/I ejerció sus efectos neuroprotectores y neuroregeneradores por sí solo y sin ser combinado con células, moléculas o fármacos. Esto puede deberse al método de síntesis utilizado, ya que la síntesis por plasma, que aquí se empleó, es capaz de modificar las características físico-químicas de los biopolímeros y, por tanto, la forma en que interactúan con el tejido nervioso. Además, algunos de los biomateriales sintetizados por métodos químicos y electroquímicos convencionales que han sido probados en modelos experimentales de LTME no tuvieron ningún efecto benéfico, produjeron citotoxicidad o tuvieron un impacto limitado o nulo en la recuperación funcional (Thonhoff, Lou y cols., 2008, Yu, Neeley y cols., 2009, Krishna, Konakondla y cols., 2013, Alvarez-Mejia, Morales y cols., 2015, Mendonça, Soares y cols., 2016). En este contexto, en un estudio realizado en ratas Sprague-Dawley con LTME, tratadas con RB en caminadora y andamios cargados con NT-3, aunque los autores informaron una robusta regeneración axonal, la función motora no difirió significativamente de la observada en los animales que no recibieron la RB (Anopas, Junquan y cols., 2018). Debido a lo anterior, es importante probar el efecto del PPy/I sintetizado por plasma en combinación con células, moléculas o fármacos para identificar si sus efectos benéficos pueden incrementarse aún más en estas condiciones.

Otra cuestión que debe tenerse en cuenta, es que aunque la expresión de factores tróficos aumenta intrínseca o extrínsecamente después de la LTME, los receptores de estos neurotransmisores, así como sus transportadores y canales iónicos asociados, están regulados negativamente (Lu, Blesch y cols., 2001, Hollis, Jamshidi y cols., 2009), probablemente debido a una disminución en el patrón de disparo de las neuronas resultante tanto de la pérdida de las conexiones supraespinales como de la inmovilización que se produce después de la LTME. Esto genera cambios en las propiedades electrofisiológicas y en la

conectividad del sistema, lo que puede producir la hiperreflexia y disreflexia autonómica, observadas frecuentemente en esta patología (Weaver y Neurotrauma 2001), las cuales no se documentaron en los animales tratados con RB, PPy/I o ambos en el presente estudio.

Actualmente, la recuperación neurológica de los pacientes con LTME es todavía limitada (Hachem, Ahuja y cols., 2017), y aunque varios estudios han reportado cierto grado de recuperación funcional incluso sin tratamiento en algunos modelos animales con lesiones leves o moderadas, con hemisecciones o con lesiones parciales o incompletas (Bareyre, Kerschensteiner y cols., 2004, Hilton, Anenberg y cols., 2016, Kakuta, Adachi y cols., 2019) esto se observa con menos frecuencia en los seres humanos. Se ha descrito que la recuperación espontánea es inducida por cambios adaptativos o plásticos que causan alteraciones en las propiedades neuronales (Filli y Schwab 2015, Hilton, Anenberg y cols., 2016), estos cambios promueven la presencia de brotes colaterales en dirección rostral y caudal al sitio de la lesión, producen alteraciones en los mapas corticales (Kim, Li y cols., 2003) y generan cambios en las redes espinales asociadas con los GPC (Rossignol y Frigon 2011). Sin embargo, lo anterior no conduce a una recuperación funcional sustancial por sí sola y requiere no una, sino varias intervenciones terapéuticas adicionales para lograr dicha recuperación. Por tanto, la presente propuesta incluyó dos estrategias de RB (SW y EE) y la aplicación de un biopolímero PPy/I, combinación que favorece la preservación del tejido nervioso, promueve la expresión de β III-tubulina y GAP-43 (moléculas relacionadas con la plasticidad y la regeneración), reduce la formación de la cicatriz glial, permite que las fibras nerviosas atraviesen el sitio lesión y favorece la recuperación de la función motora después de una LTME, lo que podría representar en el futuro una opción terapéutica para los pacientes con LTME.

X. CONCLUSIÓN

La administración del biopolímero PPy/I, el esquema mixto de RB (SW/EE) y el tratamiento combinado de PPy/I+SW/EE, favorecen los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa evaluados a través de la expresión de GAP-43 y β III-tubulina. Más aún, los tratamientos con SW/EE y PPy/I+SW/EE, presentaron fibras positivas a β III-tubulina que colocalizaron con GAP-43 y atravesaron el sitio de lesión. Sin embargo, la expresión de MBP solo fue significativa en grupo tratado con PPy/I, aunque no colocalizó con β III-tubulina. En contraste,

los tratamientos con PPy/I y PPy/I+SW/EE, disminuyeron la expresión de GFAP en forma significativa, lo que sugiere que son capaces de modular la reactividad de los fenotipos de astrocitos asociados a la formación de la cicatriz glial.

El tratamiento con PPy/I y PPy/I+SW/EE después de una LTME, modificó un total de 34 y 41 genes respectivamente, relacionados con procesos celulares, metabólicos, de regulación biológica, de respuesta a estímulos y de señalización. Específicamente la aplicación de PPy/I favoreció la expresión de genes implicados en procesos de diferenciación durante el desarrollo del SNC, neurogénesis, transmisión sináptica, crecimiento de neuritas y supresión de la muerte neuronal; mientras que el tratamiento combinado PPy/I+SW/EE, modificó genes implicados en la organización celular, guía y proyección axonal, desarrollo del SNC, sinaptogénesis, angiogénesis y mielinogénesis.

Aunado a lo anterior, la administración combinada de PPy/I y RB (SW/EE), favoreció la presencia de neuronas y oligodendrocitos en el tejido alrededor del sitio de lesión, así como la presencia de vasos sanguíneos en el sitio de lesión tanto en la aplicación por separado de PPy/I y SW/EE como en su aplicación en combinación PPy/I+SW/EE.

Con el esquema de RB mixto (SW/EE) se observó una mejoría en la salud general de los animales, los cuales recuperaron el control del esfínter urinario y anal en etapas tempranas. Además, casi ningún animal de los grupos que recibieron la RB por SW/EE, presentó espasticidad en las extremidades posteriores y, en aquellos que sí la llegaron a presentar, está disminuyó al iniciar la RB sin producirse hiperflexia ni disreflexia en los animales tratados con RB y PPy/I, condiciones patológicas que pueden presentarse tanto por la pérdida de las conexiones supraespinales como de la inmovilización que se produce después de la LTME.

Más aún, con el esquema mixto de RB (SW/EE), los animales permanecieron más activos durante la evaluación en campo abierto y generaron movimientos más amplios, coordinados y consistentes en las extremidades posteriores, en comparación con los de los animales de los grupos que no recibieron la RB.

La aplicación combinada de PPy/I+SW/EE incrementó los efectos benéficos que se obtienen con las terapias por separado, ya que los animales del grupo que recibió el tratamiento

combinado, fueron capaces de sostener su peso corporal sobre sus extremidades posteriores de forma consistente, dar pasos con apoyo plantar y coordinar el movimiento de sus extremidades anteriores y posteriores de forma consistente.

Es importante resaltar que la administración del PPy/l sintetizado por plasma, por sí solo ejerció los efectos neuroprotectores y neuroregeneradores descritos en el presente estudio, aún sin haberse administrado en combinado con células, moléculas o fármacos como ocurre con otros polímeros utilizados por diferentes grupos de investigación.

XI. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES

1. El análisis de la expresión de genes relacionados con los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa requiere de:

- Una evaluación detallada de los genes encontrados con cada uno de los tratamientos que permita identificar las vías de señalización que están modificando y favoreciendo específicamente los procesos de regeneración y plasticidad o, incluso otros procesos que pudieran promover el efecto funcional observado.
- La validación del microarreglo por medio de PCR.
- Un estudio génico a diferentes cortes de tiempo con la administración de PPy/l y RB por separado, que permita establecer la etapa del proceso de restauración en el que cada tratamiento está contribuyendo y el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto.
- Analizar y validar el posible efecto angiogénico del PPy/l y del esquema mixto de RB (SW/EE) que podría explicar el proceso de reparación del tejido y la recuperación funcional observada.

2. La expresión de proteínas relacionadas con los genes involucrados en los procesos de regeneración y plasticidad nerviosa requiere de validación cuantitativa y cualitativa en el tejido medular, a fin de identificar dónde y cómo se están dando los cambios que favorecen a la recuperación funcional observada.

3. Además de la cantidad de tejido nervioso preservado después de una LTME, se deberá evaluar lo siguiente:

- Identificar los tipos celulares que se encuentran en el tejido presente en el sitio de lesión en los animales que recibieron cualquiera de los 3 tratamientos, para determinar qué tipo celular ejerce mayor efecto sobre la restauración del tejido y, a su vez, si dependiendo del tratamiento administrado un tipo celular se ve mayormente favorecido.
- Evaluar si las neuronas observadas en la periferia del sitio de lesión son de nueva formación o si son aquellas que lograron sobrevivir debido a los tratamientos administrados.

4. Aún y cuando se obtuvieron resultados alentadores sobre la recuperación motora con las pruebas utilizadas (escalas de Louisville y BBB), es importante incluir pruebas de cinemática o mecánica de la marcha en futuras evaluaciones funcionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, C. S., A. R. Martin and M. Fehlings (2016). "Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma." F1000Res **5**.
- Ahuja, C. S., A. R. Martin and M. J. F. Fehlings (2016). "Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma." **5**.
- Ajiboye, A. B., F. R. Willett, D. R. Young, W. D. Memberg, B. A. Murphy, J. P. Miller, B. L. Walter, J. A. Sweet, H. A. Hoyen and M. W. J. T. L. Keith (2017). "Restoration of reaching and grasping movements through brain-controlled muscle stimulation in a person with tetraplegia: a proof-of-concept demonstration." **389**(10081): 1821-1830.
- Alizadeh, A., S. M. Dyck and S. J. F. i. n. Karimi-Abdolrezaee (2019). "Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms." **10**: 282.
- Alvarez-Mejía, L., J. Morales, G. J. Cruz, M.-G. Olayo, R. Olayo, A. Díaz-Ruíz, C. Ríos, R. Mondragón-Lozano, S. Sánchez-Torres and A. Morales-Guadarrama (2015). "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **26**(7): 1-11.
- Alvarez-Mejía, L., J. Morales, G. J. Cruz, M.-G. Olayo, R. Olayo, A. Díaz-Ruíz, C. Ríos, R. Mondragón-Lozano, S. Sánchez-Torres and A. Morales-Guadarrama (2015b). "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **26**(7): 1-11.
- Alvarez-Mejía, L., J. Morales, G. J. Cruz, M.-G. Olayo, R. Olayo, A. Díaz-Ruíz, C. Ríos, R. Mondragón-Lozano, S. Sánchez-Torres and A. J. J. o. M. S. M. i. M. Morales-Guadarrama (2015). "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training." **26**(7): 1-11.
- Alvarez-Mejía, L., J. Morales, G. J. Cruz, M. G. Olayo, R. Olayo, A. Díaz-Ruiz, C. Rios, R. Mondragon-Lozano, S. Sanchez-Torres, A. Morales-Guadarrama, O. Fabela-Sanchez and H. Salgado-Ceballos (2015). "Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training." J Mater Sci Mater Med **26**(7): 209.
- Álvarez-Mejía, L., H. Salgado-Ceballos, R. Olayo, G. Cruz, M. Olayo, A. Díaz-Ruiz, C. Ríos, R. Mondragón-Lozano, A. Morales-Guadarrama and S. Sánchez-Torres (2015). "Efecto de implantes de polipirrol sintetizados por diferentes métodos sobre lesiones de médula espinal en ratas." Revista mexicana de ingeniería biomédica **36**(1): 07-21.

Álvarez-Mejía, L., H. Salgado-Ceballos, R. Olayo, G. J. Cruz, M. G. Olayo, A. Díaz-Ruiz, C. Ríos, R. Mondragón-Lozano, A. Morales-Guadarrama, S. Sánchez-Torres and J. Morales (2015a). "Effect of Pyrrole Implants Synthesized by Different Methods on Spinal Cord Injuries of Rats." Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica **36**(1): 7-21.

Anderson, D. K., E. D. Hall, J. M. Braugher, J. M. McCALL and E. D. J. J. o. n. Means (1991). "Effect of delayed administration of U74006F (tirilazad mesylate) on recovery of locomotor function after experimental spinal cord injury." **8**(3): 187-192.

Anopas, D., L. Junquan, U. Milbreta, V. P. H. Lin, J. S. Chin, S. K. Wee, T. P. Er, S. Y. Chew and W. T. Ang (2018). Exploring new treatment for spinalized rats by synergising robotic rehabilitation system and regenerative medicine. 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), IEEE.

Ashammakhi, N., H.-J. Kim, A. Ehsanipour, R. D. Bierman, O. Kaarela, C. Xue, A. Khademhosseini and S. K. J. T. E. P. B. R. Seidlits (2019). "Regenerative therapies for spinal cord injury." **25**(6): 471-491.

Audu, M. L., R. Nataraj, S. J. Gartman and R. J. Triolo (2011). "Posture shifting after spinal cord injury using functional neuromuscular stimulation--a computer simulation study." J Biomech **44**(9): 1639-1645.

Balentine, J. J. L. i., a. j. o. t. methods and pathology (1978). "Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury." **39**(3): 236-253.

Bareyre, F. M., M. Kerschensteiner, O. Raineteau, T. C. Mettenleiter, O. Weinmann and M. E. J. N. n. Schwab (2004). "The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats." **7**(3): 269-277.

Barros Filho, T. E. P. d. and A. E. I. S. Molina (2008). "Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in wistar rats." Clinics **63**: 103-108.

Baschong, W., R. Suetterlin and R. H. Laeng (2001). "Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM)." J Histochem Cytochem **49**(12): 1565-1572.

Basso, D. M., M. S. Beattie and J. C. Bresnahan (1995). "A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats." Journal of Neurotrauma **12**(1): 1-21.

Bearden, S. E. and S. S. J. M. Segal (2004). "Microvessels promote motor nerve survival and regeneration through local VEGF release following ectopic reattachment." **11**(8): 633-644.

Beattie, M. S., A. A. Farooqui and J. C. J. J. o. n. BRESNAHAN (2000). "Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury." **17**(10): 915-925.

Berrocal, Y., D. D. Pearse, A. Singh, C. M. Andrade, J. S. McBroom, R. Puentes and M. J. Eaton (2007). "Social and Environmental Enrichment Improves Sensory and Motor Recovery after Severe Contusive Spinal Cord Injury in the Rat." Journal of Neurotrauma **24**(11): 1761-1772.

Birch, A. M., N. B. McGarry and Á. M. Kelly (2013). "Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner." Hippocampus **23**(6): 437-450.

Blanquie, O. and F. Bradke (2018). "Cytoskeleton dynamics in axon regeneration." Current Opinion in Neurobiology **51**: 60-69.

Bouton, C. E., A. Shaikhouni, N. V. Annetta, M. A. Bockbrader, D. A. Friedenber, D. M. Nielson, G. Sharma, P. B. Sederberg, B. C. Glenn and W. J. J. N. Mysiw (2016). "Restoring cortical control of functional movement in a human with quadriplegia." **533**(7602): 247-250.

Bracken, M. B., M. J. Shepard, W. F. Collins, T. R. Holford, W. Young, D. S. Baskin, H. M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers and J. J. N. E. J. o. M. Maroon (1990). "A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study." **322**(20): 1405-1411.

Bracken, M. B., M. J. Shepard, T. R. Holford, L. Leo-Summers, E. F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D. L. Herr, P. W. Hitchon and L. F. J. J. Marshall (1997). "Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial." **277**(20): 1597-1604.

Bracken, M. B. J. C. D. o. S. R. (2002). "Steroids for acute spinal cord injury." (2).

Bradbury, E. J. and E. R. Burnside (2019). "Moving beyond the glial scar for spinal cord repair." Nat Commun **10**(1): 3879.

Bradke, F., J. W. Fawcett and M. E. Spira (2012). "Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration." Nat Rev Neurosci **13**(3): 183-193.

Brick, N. (2014). "Locomotor training for walking after spinal cord injury." Orthop Nurs **33**(2): 115-116.

Buzoianu-Anguiano, V., J. Rivera-Osorio, S. Orozco-Suárez, A. Vega-García, E. García-Vences, S. Sánchez-Torres, I. Jiménez-Estrada, G. Guizar-Sahagún, J. Mondragon-Caso, F. Fernández-Valverde, I. Madrazo and I. Grijalva (2020). "Single vs. Combined Therapeutic Approaches in Rats With Chronic Spinal Cord Injury." **11**(136).

Cafferty, W. B. J., A. W. McGee and S. M. Strittmatter (2008). "Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity?" Trends in Neurosciences **31**(5): 215-220.

Cao, L., X. Jiao, D. S. Zuzga, Y. Liu, D. M. Fong, D. Young and M. J. During (2004). "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory." Nat Genet **36**(8): 827-835.

Cao, L., X. Liu, E.-J. D. Lin, C. Wang, E. Y. Choi, V. Riban, B. Lin and M. J. During (2010). "Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition." Cell **142**(1): 52-64.

Cao, Y., Y. Zhou, S. Ni, T. Wu, P. Li, S. Liao, J. Hu and H. J. J. o. n. Lu (2017). "Three dimensional quantification of microarchitecture and vessel regeneration by synchrotron radiation microcomputed tomography in a rat model of spinal cord injury." **34**(6): 1187-1199.

Caron, I., F. Rossi, S. Papa, R. Aloe, M. Sculco, E. Mauri, A. Sacchetti, E. Erba, N. Panini and V. J. B. Parazzi (2016). "A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury." **75**: 135-147.

Casella, G. T., A. Marcillo, M. B. Bunge and P. M. J. E. n. Wood (2002). "New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord." **173**(1): 63-76.

Casha, S., D. Zygun, M. D. McGowan, I. Bains, V. W. Yong and R. J. B. John Hurlbert (2012). "Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury." **135**(4): 1224-1236.

Chen, B. K., A. M. Knight, N. N. Madigan, L. Gross, M. Dadsetan, J. J. Nesbitt, G. E. Rooney, B. L. Currier, M. J. Yaszemski and R. J. J. B. Spinner (2011). "Comparison of polymer scaffolds in rat spinal cord: a step toward quantitative assessment of combinatorial approaches to spinal cord repair." **32**(32): 8077-8086.

Chen, T. F., K. S. Siow, P. Y. Ng and B. Y. Majlis (2017). "Enhancing the biocompatibility of the polyurethane methacrylate and off-stoichiometry thiol-ene polymers by argon and nitrogen plasma treatment." Materials Science and Engineering: C **79**: 613-621.

Chen, Y., Y. Tang, L. C. Vogel and M. J. Devivo (2013). "Causes of spinal cord injury." Top Spinal Cord Inj Rehabil **19**(1): 1-8.

Chi, J. H. (2009). "Combination therapy improves walking in spinal cord transaction." Neurosurgery **65**(6): N10-11.

Chierzi, S., G. M. Ratto, P. Verma and J. W. J. E. J. o. N. Fawcett (2005). "The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK." **21**(8): 2051-2062.

Chu, P. K., J. Y. Chen, L. P. Wang and N. Huang (2002). "Plasma-surface modification of biomaterials." Materials Science and Engineering: R: Reports **36**(5): 143-206.

Cisneros-Dreinhofer, F. and A. Hurtado-Padilla (2003). "Incidencia de las lesiones vertebrales traumáticas en el Servicio de Cirugía de Columna de un hospital de concentración del sistema de seguridad social." Acta Ortop Mex **7**(6): 292-297.

Couillard-Despres, S., L. Bieler and M. Vogl (2017). Pathophysiology of traumatic spinal cord injury. Neurological Aspects of Spinal Cord Injury, Springer: 503-528.

Cruciger, O., T. A. Schildhauer, R. C. Meindl, M. Tegenthoff, P. Schwenkreis, M. Citak, M. J. D. Aach and R. A. Technology (2016). "Impact of locomotion training with a neurologic controlled hybrid assistive limb (HAL) exoskeleton on neuropathic pain and health related quality of life (HRQoL) in chronic SCI: a case study." **11**(6): 529-534.

Cruz, G., J. Morales and R. Olayo (1999). "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole." Thin solid films **342**(1-2): 119-126.

Cruz, G. J., R. Mondragon-Lozano, A. Diaz-Ruiz, J. Manjarrez, R. Olayo, H. Salgado-Ceballos, M. G. Olayo, J. Morales, L. Alvarez-Mejia, A. Morales, M. Mendez-Armenta, N. Plascencia, M. del Carmen Fernandez and C. Rios (2012). "Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection." J Mater Sci Mater Med **23**(10): 2583-2592.

Cruz, G. J., J. Morales and R. Olayo (1999). "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole." Thin Solid Films **342**(1): 119-126.

Cui, Z.-Q., B.-L. Liu, Q.-L. Wu, Y. Cai, W.-J. Fan, M.-C. Zhang, W.-L. Ding, B. Zhang, J.-M. Kang and H. J. C. m. j. Yan (2016). "Could intrathymic injection of myelin basic protein suppress inflammatory response after co-culture of T lymphocytes and BV-2 microglia cells?" **129**(7): 831.

Cummings, B. (2001). "Meninges - Functions of the Spinal Chord
."

EHS Anatomy & Physiology Retrieved 15062020.

Cuzzocrea, S., D. P. Riley, A. P. Caputi and D. J. P. r. Salvemini (2001). "Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury." **53**(1): 135-159.

Dalamagkas, K., M. Tsintou and A. M. J. N. r. r. Seifalian (2018). "Stem cells for spinal cord injuries bearing translational potential." **13**(1): 35.

Davies, A. M. (1995). "The Bcl-2 family of proteins, and the regulation of neuronal survival." Trends Neurosci **18**(8): 355-358.

Decimo, I., F. Bifari, F. J. Rodriguez, G. Malpeli, S. Dolci, V. Lavarini, S. Pretto, S. Vasquez, M. Sciancalepore and A. Montalbano (2011). "Nestin-and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction." Stem cells **29**(12): 2062-2076.

Diaz-Ruiz, A., H. Salgado-Ceballos, S. Montes, G. Guizar-Sahagún, N. Gelista-Herrera, M. Mendez-Armenta, S. Diaz-Cintra and C. J. J. o. n. r. Ríos (2011). "Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury." **89**(3): 373-380.

Diong, J., L. A. Harvey, L. K. Kwah, J. Eyles, M. J. Ling, M. Ben and R. D. Herbert (2012). "Incidence and predictors of contracture after spinal cord injury--a prospective cohort study." Spinal Cord **50**(8): 579-584.

Donnelly, D. J. and P. G. J. E. n. Popovich (2008). "Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury." **209**(2): 378-388.

Dumont, R. J., D. O. Okonkwo, S. Verma, R. J. Hurlbert, P. T. Boulos, D. B. Ellegala and A. S. Dumont (2001). "Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms." Clin Neuropharmacol **24**(5): 254-264.

Dumont, R. J., S. Verma, D. O. Okonkwo, R. J. Hurlbert, P. T. Boulos, D. B. Ellegala and A. S. Dumont (2001). "Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy." Clin Neuropharmacol **24**(5): 265-279.

Faden, A. I. and B. J. A. o. n. Stoica (2007). "Neuroprotection: challenges and opportunities." **64**(6): 794-800.

Fainstein, M. K., B. Aguilar-Maldonado and M. M. Moreno (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas, Manual Moderno.

Fehlings, M. G., C. H. Tator and R. D. J. J. o. n. Linden (1989). "The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury." **71**(3): 403-416.

Fehlings, M. G., N. Theodore, J. Harrop, G. Maurais, C. Kuntz, C. I. Shaffrey, B. K. Kwon, J. Chapman, A. Yee and A. J. J. o. n. Tighe (2011). "A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury." **28**(5): 787-796.

Fehlings, M. G., A. Vaccaro, J. R. Wilson, A. Singh, W. C. D, J. S. Harrop, B. Aarabi, C. Shaffrey, M. Dvorak, C. Fisher, P. Arnold, E. M. Massicotte, S. Lewis and R. Rampersaud (2012). "Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS)." PLoS One **7**(2): e32037.

Fehlings, M. G., J. R. Wilson, R. F. Frankowski, E. G. Toups, B. Aarabi, J. S. Harrop, C. I. Shaffrey, S. J. Harkema, J. D. Guest and C. H. J. J. o. N. S. Tator (2012). "Riluzole for the treatment of acute traumatic spinal cord injury: rationale for and design of the NACTN Phase I clinical trial." **17**(Suppl1): 151-156.

Festoff, B. W., S. Ameenuddin, P. M. Arnold, A. Wong, K. S. Santacruz and B. A. J. J. o. n. Citron (2006). "Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury." **97**(5): 1314-1326.

Filli, L. and M. E. J. N. r. r. Schwab (2015). "Structural and functional reorganization of propriospinal connections promotes functional recovery after spinal cord injury." **10**(4): 509.

Fisahn, C., M. Aach, O. Jansen, M. Moisi, A. Mayadev, K. T. Pagarigan, J. R. Dettori and T. A. Schildhauer (2016). "The Effectiveness and Safety of Exoskeletons as Assistive and Rehabilitation Devices in the Treatment of Neurologic Gait Disorders in Patients with Spinal Cord Injury: A Systematic Review." Global Spine J **6**(8): 822-841.

Fischer, F. R. and J. D. Peduzzi (2007). "Functional Recovery in Rats With Chronic Spinal Cord Injuries After Exposure to an Enriched Environment." The Journal of Spinal Cord Medicine **30**(2): 147-155.

Forman, H. J. and E. Cadenas (2012). Oxidative Stress and Signal Transduction, Springer US.

Frye, S. K., A. Ogonowska-Slodownik and P. R. Geigle (2017). "Aquatic Exercise for People With Spinal Cord Injury." Archives of Physical Medicine and Rehabilitation **98**(1): 195-197.

Frye, S. K., A. Ogonowska-Slodownik, P. R. J. A. o. p. m. Geigle and rehabilitation (2017). "Aquatic exercise for people with spinal cord injury." **98**(1): 195-197.

Fu, J., H. Wang, L. Deng and J. Li (2016). "Exercise Training Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury." Neural Plast **2016**: 4039580.

Führmann, T., R. Tam, B. Ballarin, B. Coles, I. E. Donaghue, D. Van Der Kooy, A. Nagy, C. Tator, C. Morshead and M. J. B. Shoichet (2016). "Injectable hydrogel promotes early survival of induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes and attenuates longterm teratoma formation in a spinal cord injury model." **83**: 23-36.

Gage, F. H. J. S. (2000). "Mammalian neural stem cells." **287**(5457): 1433-1438.

Gage, G. J., D. R. Kipke and W. Shain (2012). "Whole animal perfusion fixation for rodents." JoVE (Journal of Visualized Experiments)(65): e3564-e3564.

Geisler, F. H., W. P. Coleman, G. Grieco, D. Poonian and S. S. G. J. Spine (2001). "The Sygen® multicenter acute spinal cord injury study." **26**(24S): S87-S98.

Gerasimenko, Y., R. Gorodnichev, T. Moshonkina, D. Sayenko, P. Gad and V. Reggie Edgerton (2015). "Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans." Annals of Physical and Rehabilitation Medicine **58**(4): 225-231.

Girgis, J., D. Merrett, S. Kirkland, G. Metz, V. Verge and K. J. B. Fouad (2007). "Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery." **130**(11): 2993-3003.

Gogolla, N., I. Galimberti, Y. Deguchi and P. Caroni (2009). "Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus." Neuron **62**(4): 510-525.

Gomez, T. M. and N. C. Spitzer (1999). "In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients." Nature **397**(6717): 350-355.

Gorgey, A. S. J. W. j. o. o. (2018). "Robotic exoskeletons: The current pros and cons." **9**(9): 112.

Gould, E. and P. J. B. p. Tanapat (1999). "Stress and hippocampal neurogenesis." **46**(11): 1472-1479.

Griffin, M., A. Ibrahim, A. Seifalian, P. Butler, D. Kalaskar and P. Ferretti (2017). "Chemical group-dependent plasma polymerisation preferentially directs adipose stem cell differentiation towards osteogenic or chondrogenic lineages." Acta biomaterialia **50**: 450-461.

Griffin, M., R. Palgrave, V. G. Baldovino-Medrano, P. E. Butler and D. M. Kalaskar (2018). "Argon plasma improves the tissue integration and angiogenesis of subcutaneous implants by modifying surface chemistry and topography." International journal of nanomedicine **13**: 6123.

Grossman, R. G., M. G. Fehlings, R. F. Frankowski, K. D. Burau, D. S. Chow, C. Tator, A. Teng, E. G. Toups, J. S. Harrop and B. J. J. o. n. Aarabi (2014). "A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury." **31**(3): 239-255.

Gruner, J. A. (1992). "A Monitored Contusion Model of Spinal Cord Injury in the Rat." Journal of Neurotrauma **9**(2): 123-128.

Guerra, J. L. and J. L. M. Saavedra (2004). Manual de fisioterapia, El Manual Moderno.

Guimard, N. K., N. Gomez and C. E. J. P. i. p. s. Schmidt (2007). "Conducting polymers in biomedical engineering." **32**(8-9): 876-921.

Hachem, L. D., C. S. Ahuja and M. G. Fehlings (2017). "Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation." J Spinal Cord Med **40**(6): 665-675.

Hachem, L. D., C. S. Ahuja and M. G. Fehlings (2017a). "Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation." The Journal of Spinal Cord Medicine **40**(6): 665-675.

Hachem, L. D., C. S. Ahuja and M. G. J. T. j. o. s. c. m. Fehlings (2017). "Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation." **40**(6): 665-675.

Haggerty, A. E., I. Maldonado-Lasunción and M. J. B. M. Oudega (2018). "Biomaterials for revascularization and immunomodulation after spinal cord injury." **13**(4): 044105.

Hall, E. D. (2015). The Contributing Role of Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in the Course of CNS Injury Neurodegeneration and Neuroprotection. Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects, CRC Press/Taylor & Francis.

Han, S., J. Y. Lee, E. Y. Heo, I. K. Kwon, T. Y. Yune, I. J. B. Youn and b. r. communications (2018). "Implantation of a Matrigel-loaded agarose scaffold promotes functional regeneration of axons after spinal cord injury in rat." **496**(3): 785-791.

Hejcl, A., J. Ruzicka, K. Kekulova, B. Svobodova, V. Proks, H. Mackova, K. Jirankova, K. Karova, L. Machova Urdzikova, S. Kubinova, J. Cihlar, D. Horak and P. Jendelova (2018). "Modified Methacrylate Hydrogels Improve Tissue Repair after Spinal Cord Injury." Int J Mol Sci **19**(9).

Hejčl, A., J. Růžička, K. Kekulová, B. Svobodová, V. Proks, H. Macková, K. Jiráňková, K. Kárová, L. Machová Urdziková and Š. J. I. j. o. m. s. Kubinová (2018). "Modified methacrylate hydrogels improve tissue repair after spinal cord injury." **19**(9): 2481.

Heywood, S., J. McClelland, B. Mentiplay, P. Geigle, A. Rahmann and R. Clark (2017). "Effectiveness of Aquatic Exercise in Improving Lower Limb Strength in Musculoskeletal Conditions: A Systematic Review and Meta-Analysis." Arch Phys Med Rehabil **98**(1): 173-186.

Hill, C. E. (2017). "A view from the ending: Axonal dieback and regeneration following SCI." Neurosci Lett **652**: 11-24.

Hilton, B. J., E. Anenberg, T. C. Harrison, J. D. Boyd, T. H. Murphy and W. J. J. o. N. Tetzlaff (2016). "Re-establishment of cortical motor output maps and spontaneous functional recovery via spared dorsolaterally projecting corticospinal neurons after dorsal column spinal cord injury in adult mice." **36**(14): 4080-4092.

Hollis, E. R., P. Jamshidi, K. Löw, A. Blesch and M. H. J. P. o. t. N. A. o. S. Tuszynski (2009). "Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkB-induced Erk activation." **106**(17): 7215-7220.

Horky, L. L., F. Galimi, F. H. Gage and P. J. J. J. o. C. N. Horner (2006). "Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury." **498**(4): 525-538.

Horn, E. M., M. Beaumont, X. Z. Shu, A. Harvey, G. D. Prestwich, K. M. Horn, A. R. Gibson, M. C. Preul and A. J. J. o. N. S. Panitch (2007). "Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury." **6**(2): 133-140.

Horner, P. J. and F. H. Gage (2000). "Regenerating the damaged central nervous system." Nature **407**(6807): 963-970.

Horner, P. J., A. E. Power, G. Kempermann, H. G. Kuhn, T. D. Palmer, J. Winkler, L. J. Thal and F. H. J. J. o. N. Gage (2000). "Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord." **20**(6): 2218-2228.

Hosseiny, S., M. Pietri, A. Petit-Paitel, H. Zarif, C. Heurteaux, J. Chabry and A. Guyon (2015). "Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development." Brain Structure and Function **220**(6): 3435-3448.

Huang, Z.-B., G.-F. Yin, X.-M. Liao and J.-W. Gu (2014). "Conducting polypyrrole in tissue engineering applications." Frontiers of Materials Science **8**(1): 39-45.

Hutchinson, K. J., F. Gómez-Pinilla, M. J. Crowe, Z. Ying and D. M. Basso (2004). "Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats." Brain **127**(6): 1403-1414.

Jacobs, P. L. and M. S. Nash (2004). "Exercise recommendations for individuals with spinal cord injury." Sports Med **34**(11): 727-751.

James, N. D., S. B. McMahon, E. C. Field-Fote and E. J. J. T. L. N. Bradbury (2018). "Neuromodulation in the restoration of function after spinal cord injury." **17**(10): 905-917.

Jamme, I., E. Petit, D. Divoux, A. Gerbi, J.-M. Maixent and A. J. N. Nouvelot (1995). "Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals." **7**(1): 333-337.

Jia, X., R. G. Kowalski, D. M. Sciubba and R. G. Geocadin (2013). "Critical care of traumatic spinal cord injury." J Intensive Care Med **28**(1): 12-23.

Jiménez-Ávila, J., J. Álvarez-Garnier and W. Bitar-Alatorre (2012). "Costo directo de la lesión medular completa de la columna cervical." Acta Ortopédica Mexicana **26**(1): 10-14.

Jin, M. C., Z. A. Medress, T. D. Azad, V. M. Doulames and A. J. N. f. Veeravagu (2019). "Stem cell therapies for acute spinal cord injury in humans: a review." **46**(3): E10.

Jordá-Vilaplana, A., V. Fombuena, D. García-García, M. Samper and L. Sánchez-Nácher (2014). "Surface modification of polylactic acid (PLA) by air atmospheric plasma treatment." European polymer journal **58**: 23-33.

Kakuta, Y., A. Adachi, M. Yokohama, T. Horii, T. Mieda, Y. Iizuka, K. Takagishi, H. Chikuda, H. Iizuka and K. J. H. Nakamura (2019). "Spontaneous functional full recovery from motor and sensory deficits in adult mice after mild spinal cord injury." **5**(6): e01847.

Kamiya, K., M. Koda, T. Furuya, K. Kato, H. Takahashi, T. Sakuma, T. Inada, M. Ota, S. Maki and A. J. E. S. J. Okawa (2015). "Neuroprotective therapy with granulocyte colony-stimulating factor in acute spinal cord injury: a comparison with high-dose methylprednisolone as a historical control." **24**(5): 963-967.

Kataoka, K., Y. Suzuki, M. Kitada, T. Hashimoto, H. Chou, H. Bai, M. Ohta, S. Wu, K. Suzuki and C. Ide (2004). "Alginate Enhances Elongation of Early Regenerating Axons in Spinal Cord of Young Rats." Tissue Engineering **10**(3-4): 493-504.

Kawano, H., J. Kimura-Kuroda, Y. Komuta, N. Yoshioka, H. P. Li, K. Kawamura, Y. Li and G. Raisman (2012). "Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system." Cell Tissue Res **349**(1): 169-180.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. J. N. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." **386**(6624): 493-495.

Keyvani, K., N. Sachser, O. W. Witte and W. Paulus (2004). "Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment." J Neuropathol Exp Neurol **63**(6): 598-609.

Khaing, Z. Z., B. D. Milman, J. E. Vanscoy, S. K. Seidlits, R. J. Grill and C. E. J. J. o. N. E. Schmidt (2011). "High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury." **8**(4): 046033.

Khatun, F., V. King, A. Alovskaya, R. Brown and J. Priestley (2007). Fibronectin based biomaterials as a treatment for spinal cord injury, MARY ANN LIEBERT INC.

Kim, J.-E., S. Li, T. GrandPré, D. Qiu and S. M. J. N. Strittmatter (2003). "Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B." **38**(2): 187-199.

Kim, Y.-H., K.-Y. Ha and S.-I. J. C. i. o. s. Kim (2017). "Spinal cord injury and related clinical trials." **9**(1): 1-9.

Kirshblum, S. C., M. M. Priebe, C. H. Ho, W. M. Scelza, A. E. Chiodo, L.-A. J. A. o. p. m. Wurmser and rehabilitation (2007). "Spinal cord injury medicine. 3. Rehabilitation phase after acute spinal cord injury." **88**(3): S62-S70.

Kobayakawa, K., Y. Ohkawa, S. Yoshizaki, T. Tamaru, T. Saito, K. Kijima, K. Yokota, M. Hara, K. Kubota, Y. Matsumoto, K. Harimaya, K. Ozato, T. Masuda, M. Tsuda, T. Tamura, K. Inoue, V. R. Edgerton, Y. Iwamoto, Y. Nakashima and S. Okada (2019). "Macrophage centripetal migration drives spontaneous healing process after spinal cord injury." **5**(5): eaav5086.

Koc, R., H. Akdemir, E. Karaküçük, I. Öktem and A. J. S. C. Menkü (1999). "Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury." **37**(1): 29-32.

Koopmans, G. C., M. Brans, F. Gomez-Pinilla, S. Duis, W. H. Gispen, I. Torres-Aleman, E. A. Joosten and F. P. Hamers (2006). "Circulating insulin-like growth factor I and functional recovery from spinal cord injury under enriched housing conditions." Eur J Neurosci **23**(4): 1035-1046.

Kostov, K. G., T. M. C. Nishime, A. H. R. Castro, A. Toth and L. R. d. O. Hein (2014). "Surface modification of polymeric materials by cold atmospheric plasma jet." Applied Surface Science **314**: 367-375.

Krech, D., M. R. Rosenzweig and E. L. Bennett (1960). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry." Journal of comparative and physiological psychology **53**(6): 509.

Krishna, V., S. Konakondla, J. Nicholas, A. Varma, M. Kindy and X. J. T. j. o. s. c. m. Wen (2013). "Biomaterial-based interventions for neuronal regeneration and functional recovery in rodent model of spinal cord injury: a systematic review." **36**(3): 174-190.

Kuerzi, J., E. Brown, A. Shum-Siu, A. Siu, D. Burke, J. Morehouse, R. Smith and D. Magnuson (2010). "Task-specificity vs. ceiling effect: step-training in shallow water after spinal cord injury." Experimental neurology **224**(1): 178-187.

Kusik, B. W., D. R. Hammond and A. J. Udvardia (2010). "Transcriptional regulatory regions of gap43 needed in developing and regenerating retinal ganglion cells." Dev Dyn **239**(2): 482-495.

Lee, J. Y., C. A. Bashur, A. S. Goldstein and C. E. Schmidt (2009). "Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications." Biomaterials **30**(26): 4325-4335.

Lee-Liu, D., M. Moreno, L. I. Almonacid, V. S. Tapia, R. Muñoz, J. Von Marées, M. Gaete, F. Melo and J. J. N. D. Larraín (2014). "Genome-wide expression profile of the response to spinal cord injury in *Xenopus laevis* reveals extensive differences between regenerative and non-regenerative stages." **9**(1): 1-20.

Lin, B., Y. Xu, B. Zhang, Y. He, Y. Yan, M. C. J. E. He and t. medicine (2014). "MEK inhibition reduces glial scar formation and promotes the recovery of sensorimotor function in rats following spinal cord injury." **7**(1): 66-72.

Liu, G., B. E. Keeler, V. Zhukareva and J. D. Houle (2010). "Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats." Exp Neurol **226**(1): 200-206.

Longo, D., A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, J. Jameson and J. Loscalzo (2011). Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition, McGraw-Hill Education.

Lu, P., A. Blesch and M. H. J. J. o. C. N. Tuszynski (2001). "Neurotrophism without neurotropism: BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons." **436**(4): 456-470.

Ludueña, R. F. and A. Banerjee (2008). The isotypes of tubulin. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology, Springer: 123-175.

Ludueña, R. F. J. M. B. o. t. C. (1993). "Are tubulin isotypes functionally significant." **4**(5): 445-457.

Luna, L. M., R. D. J. A. MENDOZA and Y. M. OROPEZA (2017). "EPIDEMIOLOGÍA DEL TRAUMA DE COLUMNA VERTEBRAL EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS." Coluna/Columna **16**(2).

Magnuson, D. S., R. R. Smith, E. H. Brown, G. Enzmann, C. Angeli, P. M. Quesada and D. Burke (2009). "Swimming as a model of task-specific locomotor retraining after spinal cord injury in the rat." Neurorehabilitation and neural repair.

Mahar, M. and V. J. N. R. N. Cavalli (2018). "Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration." **19**(6): 323-337.

Maldonado Bouchard, S. and M. A. Hook (2014). "Psychological Stress as a Modulator of Functional Recovery Following Spinal Cord Injury." Frontiers in Neurology **5**(44).

Marinho-Buzelli, A. R., A. J. Zaluski, A. Mansfield, A. M. Bonnyman and K. E. Musselman (2019). "The use of aquatic therapy among rehabilitation professionals for individuals with spinal cord injury or disorder." The Journal of Spinal Cord Medicine **42**(sup1): 158-165.

Martini, F., W. C. Ober, J. L. Nath, K. F. Petti and E. F. Bartholomew (2017). Visual Anatomy & Physiology, Pearson.

Martini, F., M. J. Timmons and R. B. Tallitsch (2012). Human Anatomy, Pearson Benjamin Cummings.

Mattucci, S., J. Speidel, J. Liu, B. K. Kwon, W. Tetzlaff and T. R. J. C. b. Oxland (2019). "Basic biomechanics of spinal cord injury—How injuries happen in people and how animal models have informed our understanding." **64**: 58-68.

McCrea, D. A. and I. A. Rybak (2008). "Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation." Brain research reviews **57**(1): 134-146.

McTigue, D. M. J. P. R. (2008). "Potential Therapeutic Targets for PPAR " PPAR Research.

Medicine, I. o. (2005). Spinal Cord Injury: Progress, Promise, and Priorities. Washington, DC, The National Academies Press.

Medicine, N. L. o. (2020, 07 Mayo 2020). "Clinical Trials. gov." Retrieved 19 Junio 2020, 2020, from <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>.

Meletis, K., F. Barnabe-Heider, M. Carlen, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov and J. Frisen (2008). "Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells." PLoS Biol **6**(7): e182.

Mendonça, M. C. P., E. S. Soares, M. B. de Jesus, H. J. Ceragioli, Â. G. Batista, Á. Nyúl-Tóth, J. Molnár, I. Wilhelm, M. R. Marostica Jr and I. J. M. p. Krizbai (2016). "PEGylation of reduced graphene oxide induces toxicity in cells of the blood–brain barrier: an in vitro and in vivo study." **13**(11): 3913-3924.

Miranda, T. A. B., J. M. Y. Vicente, R. M. Marcon, A. F. Cristante, E. Morya and A. C. d. Valle (2012). "Time-related effects of general functional training in spinal cord-injured rats." Clinics **67**(7): 799-804.

Mohammed, A. H., S. W. Zhu, S. Darmopil, J. Hjerling-Leffler, P. Ernfors, B. Winblad, M. C. Diamond, P. S. Eriksson and N. Bogdanovic (2002). Environmental enrichment and the brain. Progress in Brain Research, Elsevier. **138**: 109-133.

Mondragon-Lozano, R., C. Rios, E. Roldan-Valadez, G. J. Cruz, M. G. Olayo, R. Olayo, H. Salgado-Ceballos, J. Morales, M. Mendez-Armenta, L. Alvarez-Mejia, O. Fabela, A. Morales-Guadarrama, S. Sanchez-Torres and A. Diaz-Ruiz (2017). "Delayed injection of polypyrrole doped with iodine particle suspension after spinal cord injury in rats improves functional recovery and decreased tissue damage evaluated by 3.0 Tesla in vivo magnetic resonance imaging." Spine J **17**(4): 562-573.

Morales Corona, J., E. Pérez Tejada, R. Montiel Campos, H. Vázquez Torres, R. Olayo, L. Gómez Quiróz, M. Gutiérrez Ruiz, M. Olayo González and G. J. L. F. B. e. M. T. S. Cruz Cruz (2008). "Modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales." **2**: 195-205.

Moroder, P., M. B. Runge, H. Wang, T. Ruesink, L. Lu, R. J. Spinner, A. J. Windebank and M. J. Yaszemski (2011). "Material properties and electrical stimulation regimens of polycaprolactone fumarate–polypyrrole scaffolds as potential conductive nerve conduits." Acta biomaterialia **7**(3): 944-953.

Mortazavi, M. M., K. Verma, O. A. Harmon, C. J. Griessenauer, N. Adeeb, N. Theodore and R. S. Tubbs (2015). "The microanatomy of spinal cord injury: a review." Clin Anat **28**(1): 27-36.

Muir, G. D. and J. D. Steeves (1995). "Phasic cutaneous input facilitates locomotor recovery after incomplete spinal injury in the chick." Journal of Neurophysiology **74**(1): 358-368.

Nakhjavan-Shahraki, B., M. Yousefifard, V. Rahimi-Movaghar, M. Baikpour, F. Nasirinezhad, S. Safari, M. Yaseri, A. M. Jafari, P. Ghelichkhani and A. J. S. r. Tafakhori (2018). "Transplantation of olfactory

ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis." **8**(1): 1-12.

Nas, K., L. Yazmalar, V. Şah, A. Aydın and K. J. W. j. o. o. Öneş (2015). "Rehabilitation of spinal cord injuries." **6**(1): 8.

National Spinal Cord Injury Statistical Center J Birmingham, A. U. o. A. a. B. (2019). "Facts and Figures at a Glance." 1-2.

Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." Nat Rev Neurosci **7**(9): 697-709.

Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." Nature Reviews Neuroscience **7**: 697.

NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. G. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Estados Unidos Mexicanos, Diario Oficial de la Federación. **NOM-033-SAG/ZOO-2014**. : 1-41.

NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales. . G. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Estados Unidos Mexicanos., Diario Oficial de la Federación. **NOM-033-ZOO-1995**: 1-17.

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. . P. y. A. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Desarrollo Rural. Estados Unidos Mexicanos, Diario Oficial de la Federación. **NOM-062-ZOO-1999**. : 1-57.

Officer, A., T. Shakespeare, P. von Groote and J. Bickenbach (2014). "Lesiones de la médula espinal: perspectivas internacionales, resumen."

Okada, S., M. Hara, K. Kobayakawa, Y. Matsumoto and Y. Nakashima (2018). "Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury." Neurosci Res **126**: 39-43.

Olayo, R., C. Ríos, H. Salgado-Ceballos, G. J. Cruz, J. Morales, M. G. Olayo, M. Alcaraz-Zubeldia, A. L. Alvarez, R. Mondragon, A. Morales and A. Diaz-Ruiz (2008). "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(2): 817-826.

Onifer, S. M., G. M. Smith and K. J. N. Fouad (2011). "Plasticity after spinal cord injury: relevance to recovery and approaches to facilitate it." **8**(2): 283-293.

Organización Mundial de la Salud, T. I. S. C. S. (2014). Lesiones de la médula espinal: perspectivas internacionales: 12.

Orozco, Q. E. C. (2007). Síntesis de Polímeros Biocompatibles por Plasma, UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA.

Oyinbo, C. A. J. A. N. E. (2011). "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade." **71**(2): 281-299.

Paker, N., D. Soy, N. Kesiktas, A. N. Bardak, M. Erbil, S. Ersoy and H. J. I. J. o. R. R. Ylmaz (2006). "Reasons for rehospitalization in patients with spinal cord injury: 5 years' experience." **29**(1): 71-76.

Patel, V., G. Joseph, A. Patel, S. Patel, D. Bustin, D. Mawson, L. M. Tuesta, R. Puentes, M. Ghosh and D. D. J. J. o. n. Pearse (2010). "Suspension matrices for improved Schwann-cell survival after implantation into the injured rat spinal cord." **27**(5): 789-801.

Pérez, G., Pardini, Ibarra, Renan. (1998). "Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal de 1993 a 1997." Secretaría de Salud.

Pérez, R., S. Martín del Campo, S. Renán and S. Durán (2008). "Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación." Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación **20**(3-4): 74-82.

Piao, C.-S., B. A. Stoica, J. Wu, B. Sabirzhanov, Z. Zhao, R. Cabatbat, D. J. Loane and A. I. Faden (2013). "Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury." Neurobiology of disease **54**: 252-263.

Plaza, V. B., B. M. Pacheco, C. M. Aguilar, J. F. Valenzuela and J. J. Z. Pérez (2012). "Lesión de la médula espinal. actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial." Coluna/columna **11**(1): 73-76.

Pointillart, V., D. Gense, C. Gross, A. Bidabé, A. Gin, J. Rivel, J. Caille and J. J. J. o. n. Sénégas (1993). "Effects of nimodipine on posttraumatic spinal cord ischemia in baboons." **10**(2): 201-213.

Poli, G. (2000). Free Radicals in Brain Pathophysiology, Taylor & Francis.

Post, M. and C. Van Leeuwen (2012). "Psychosocial issues in spinal cord injury: a review." Spinal Cord **50**(5): 382.

Prados, C. R. (2016). IMPLICACIÓN DE LAS NADPH OXIDASAS EN LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.

Purves, D., D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A. S. Lamantia, J. O. McNamara, S. M. Williams and G. J. Augustine (2000). Neuroscience, Sinauer Associates.

Qiu, J., D. Cai and M. T. Filbin (2000). "Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS." Glia **29**(2): 166-174.

Quadrato, G. and S. Di Giovanni (2013). "Waking up the sleepers: shared transcriptional pathways in axonal regeneration and neurogenesis." Cellular and Molecular Life Sciences **70**(6): 993-1007.

Quadri, S. A., M. Farooqui, A. Ikram, A. Zafar, M. A. Khan, S. S. Suriya, C. F. Claus, B. Fiani, M. Rahman, A. Ramachandran, I. I. T. Armstrong, M. A. Taqi and M. M. Mortazavi (2020). "Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury." Neurosurg Rev **43**(2): 425-441.

Quraishe, S., L. H. Forbes and M. R. Andrews (2018). "The Extracellular Environment of the CNS: Influence on Plasticity, Sprouting, and Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury." Neural Plast **2018**: 2952386.

Rathore, F. (2010). Spinal Cord Injuries in the Developing World.

Ren, S., Z. Liu, C. Y. Kim, K. Fu, Q. Wu, L. Hou, L. Sun, J. Zhang, Q. Miao and J. J. S. n. i. Kim (2019). "Reconstruction of the spinal cord of spinal transected dogs with polyethylene glycol." **10**.

Ríos, C., S. Orozco-Suarez, H. Salgado-Ceballos, M. Mendez-Armenta, C. Nava-Ruiz, I. Santander, V. Barón-Flores, N. Caram-Salas and A. J. N. r. Diaz-Ruiz (2015). "Anti-apoptotic effects of dapsone after spinal cord injury in rats." **40**(6): 1243-1251.

Rocha, L. A., R. A. Sousa, D. Learmonth and A. J. J. F. i. p. Salgado (2018). "The role of biomaterials as angiogenic modulators of spinal cord injury: mimetics of the spinal cord, cell and angiogenic factor delivery agents." **9**: 164.

Rodríguez-Meza, M., M. Paredes-Cruz, I. Grijalva and D. J. S. c. Rojano-Mejía (2016). "Clinical and demographic profile of traumatic spinal cord injury: a mexican hospital-based study." **54**(4): 266-269.

Rodriguez-Meza, M. V., M. Paredes-Cruz, I. Grijalva and D. Rojano-Mejia (2016). "Clinical and demographic profile of traumatic spinal cord injury: a Mexican hospital-based study." Spinal Cord **54**(4): 266-269.

Rossignol, S. and A. Frigon (2011). "Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms." Annual review of neuroscience **34**: 413-440.

Rossignol, S. and A. J. A. r. o. n. Frigon (2011). "Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms." **34**: 413-440.

Rusanescu, G. (2016). "Adult spinal cord neurogenesis: A regulator of nociception." Neurogenesis **3**(1): e1256853.

Sagbas, B. (2016). "Argon/oxygen plasma surface modification of biopolymers for improvement of wettability and wear resistance." age **7**(3): 46.

Samadikuchaksaraei, A. J. J. o. N. and Rehabilitation (2007). "An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries." **4**(1): 15.

Sampaio-Baptista, C., A. Vallès, A. A. Khrapitchev, G. Akkermans, A. M. Winkler, S. Foxley, N. R. Sibson, M. Roberts, K. Miller and M. E. J. B. Diamond (2019). "Experience alterations in white matter structure and myelin-related gene expression in adult rats." 532572.

Sandler, A. N. and C. H. J. J. o. n. Tator (1976). "Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord." **45**(6): 638-646.

Sandrow-Feinberg, H. R. and J. D. Houlé (2015). "Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation." Brain Res **1619**: 12-21.

Sartori, A. M., A.-S. Hofer and M. E. J. C. O. i. P. Schwab (2020). "Recovery after spinal cord injury is enhanced by anti-Nogo-A antibody therapy—from animal models to clinical trials." **14**: 1-6.

Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Meth **9**(7): 676-682.

Schmidt, C. E., V. R. Shastri, J. P. Vacanti and R. J. P. o. t. N. A. o. S. Langer (1997). "Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer." **94**(17): 8948-8953.

Šedý, J., L. Urdžíková, P. Jendelová and E. Syková (2008). "Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **32**(3): 550-580.

Shah, M., C. Peterson, E. Yilmaz, D. R. Halalmeh and M. J. S. N. I. Moisi (2020). "Current advancements in the management of spinal cord injury: A comprehensive review of literature." **10**.

Silva, N. A., N. Sousa, R. L. Reis and A. J. Salgado (2014). "From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury." Progress in neurobiology **114**: 25-57.

Silva, N. A., N. Sousa, R. L. Reis and A. J. J. P. i. n. Salgado (2014). "From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury." **114**: 25-57.

Singh, A., S. Balasubramanian, M. Murray, M. Lemay and J. J. J. o. n. Houle (2011). "Role of spared pathways in locomotor recovery after body-weight-supported treadmill training in contused rats." **28**(12): 2405-2416.

Smith, R. R., E. H. Brown, A. Shum-Siu, A. Whelan, D. A. Burke, R. L. Benton and D. S. K. Magnuson (2009). "Swim Training Initiated Acutely after Spinal Cord Injury Is Ineffective and Induces Extravasation In and Around the Epicenter." Journal of neurotrauma **26**(7): 10.1089/neu.2008-0829.

Smith, R. R., D. A. Burke, A. D. Baldini, A. Shum-Siu, R. Baltzley, M. Bungler and D. S. K. Magnuson (2006). "The Louisville Swim Scale: A Novel Assessment of Hindlimb Function following Spinal Cord Injury in Adult Rats." Journal of neurotrauma **23**(11): 1654-1670.

Smith, R. R., A. Shum-Siu, R. Baltzley, M. Bungler, A. Baldini, D. A. Burke and D. S. K. Magnuson (2006). "Effects of Swimming on Functional Recovery after Incomplete Spinal Cord Injury in Rats." Journal of neurotrauma **23**(6): 908-919.

Smith, R. R., A. Shum-Siu, R. Baltzley, M. Bungler, A. Baldini, D. A. Burke and D. S. K. Magnuson (2006a). "Effects of Swimming on Functional Recovery after Incomplete Spinal Cord Injury in Rats." Journal of neurotrauma **23**(6): 908-919.

Snell, R. S. (2007). Neuroanatomía clínica, Editorial Médica Panamericana.

Spine, Z. B. (2018). "Anatomy of The Neck: Causes of Neck Pain and How to Manage the Pain." Retrieved 15062020, 2020, from <https://www.cervicaldisc.com/about-your-neck/degenerative-c-spine>.

Spira, M. E., D. Benbassat and A. J. J. o. n. Dormann (1993). "Resealing of the proximal and distal cut ends of transected axons: electrophysiological and ultrastructural analysis." **24**(3): 300-316.

Starkey, M. L., C. Bleul, H. Kasper, A. C. Mosberger, B. Zörner, S. Giger, M. Gullo, F. Buschmann and M. E. Schwab (2014). "High-impact, self-motivated training within an enriched environment with single animal tracking dose-dependently promotes motor skill acquisition and functional recovery." Neurorehabilitation and neural repair **28**(6): 594-605.

Steeves, J., J. Fawcett, M. Tuszynski, D. Lammertse, A. Curt, J. Ditunno, P. Ellaway, M. Fehlings, J. Guest and N. J. V. Kleitman, BC: International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis (2007). "Experimental Treatments for Spinal Cord Injury: What you should know if you are considering participation in a clinical trial."

Steeves, J. D., J. W. F. , M. H. T. , D. P. L. , A. , Curte, M. G. F. , J. D. G. , N. K. , A. R. B. , , D. J. Brownj, M. H. , H. S. C. and H. O. , Li Jianju (2012). Experimental treatments for spinal cord injury: What you should know (Version 2): 37.

Storer, P. D. and J. D. Houle (2003). "betall-tubulin and GAP 43 mRNA expression in chronically injured neurons of the red nucleus after a second spinal cord injury." Exp Neurol **183**(2): 537-547.

Sullivan, K. F. and D. W. J. P. o. t. N. A. o. S. Cleveland (1986). "Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes." **83**(12): 4327-4331.

Suzuki, H., T. Kanchiku, Y. Imajo, Y. Yoshida, N. Nishida, T. Gondo, S. Yoshii and T. J. M. m. m. Taguchi (2015). "Artificial collagen-filament scaffold promotes axon regeneration and long tract reconstruction in a rat model of spinal cord transection." **48**(4): 214-224.

Takahashi, H., M. Yamazaki, A. Okawa, T. Sakuma, K. Kato, M. Hashimoto, K. Hayashi, T. Furuya, T. Fujiyoshi and J. J. E. S. J. Kawabe (2012). "Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial." **21**(12): 2580-2587.

Tator, C. H. and M. G. Fehlings (1991). "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms." J Neurosurg **75**(1): 15-26.

Thompson, B. C., S. E. Moulton, R. T. Richardson and G. G. Wallace (2011). "Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein." Biomaterials **32**(15): 3822-3831.

Thompson, J. H. and W. R. Richter (1960). "Hematoxylin-eosin staining adapted to automatic tissue processing." Stain technology **35**(3): 145-148.

Thonhoff, J. R., D. I. Lou, P. M. Jordan, X. Zhao and P. J. B. r. Wu (2008). "Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro." **1187**: 42-51.

Thuret, S., L. D. Moon and F. H. J. N. R. N. Gage (2006). "Therapeutic interventions after spinal cord injury." **7**(8): 628-643.

Tischfield, M. A., H. N. Baris, C. Wu, G. Rudolph, L. Van Maldergem, W. He, W. M. Chan, C. Andrews, J. L. Demer, R. L. Robertson, D. A. Mackey, J. B. Ruddle, T. D. Bird, I. Gottlob, C. Pieh, E. I. Traboulsi, S. L. Pomeroy, D. G. Hunter, J. S. Soul, A. Newlin, L. J. Sabol, E. J. Doherty, C. E. de Uzcátegui, N. de Uzcátegui, M. L. Collins, E. C. Sener, B. Wabbels, H. Hellebrand, T. Meitinger, T. de Bernardinis, A. Magli, C. Schiavi, M. Pastore-Trossello, F. Koc, A. M. Wong, A. V. Levin, M. T. Geraghty, M. Descartes, M. Flaherty, R. V. Jamieson, H. U. Møller, I. Meuthen, D. F. Callen, J. Kerwin, S. Lindsay, A. Meindl, M. L. Gupta, Jr., D. Pellman and E. C. Engle (2010). "Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance." Cell **140**(1): 74-87.

Tom, V. J., M. P. Steinmetz, J. H. Miller, C. M. Doller and J. J. J. o. N. Silver (2004). "Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury." **24**(29): 6531-6539.

Tran, A. P., P. M. Warren and J. J. P. R. Silver (2018). "The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury." **98**(2): 881-917.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci **1**(3): 191-198.

Van Praag, H., G. Kempermann and F. H. J. N. n. Gage (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." **2**(3): 266-270.

Vialle, L., L. R. Grochocki and P. Nohama (2007). NYU device: automation of the Weight-drop rod. World congress on medical physics and biomedical engineering 2006, Springer.

Wang, H., G. Song, H. Chuang, C. Chiu, A. Abdelmaksoud, Y. Ye and L. Zhao (2018). "Portrait of glial scar in neurological diseases." Int J Immunopathol Pharmacol **31**: 2058738418801406.

Wang, M., P. Favi, X. Cheng, N. H. Golshan, K. S. Ziemer, M. Keidar and T. J. Webster (2016). "Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration." Acta biomaterialia **46**: 256-265.

Wang, Z., Z. Wang, W. W. Lu, W. Zhen, D. Yang and S. J. N. A. M. Peng (2017). "Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications." **9**(10): e435-e435.

Watson, C., G. Paxinos and G. Kayalioglu (2009). The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas, Elsevier Science.

Weaver, L. J. A. d. and p. a. s. a. c.-c. i. o. t. r. s. c. J. Neurotrauma (2001). "Verghese P, Bruce JC, Fehlings MG, Krenz NR, Marsh DR." **18**: 1107-1119.

Wen, Y., S. Yu, Y. Wu, R. Ju, H. Wang, Y. Liu, Y. Wang, Q. J. C. Xu and t. research (2016). "Spinal cord injury repair by implantation of structured hyaluronic acid scaffold with PLGA microspheres in the rat." **364**(1): 17-28.

White, N.-H. and N.-H. Black (2016). "Spinal Cord Injury (SCI) Facts and Figures at a Glance."

Wiese, S. and A. J. E. n. Faissner (2015). "The role of extracellular matrix in spinal cord development." **274**: 90-99.

Wiese, S., M. Karus and A. J. F. i. p. Faissner (2012). "Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines." **3**: 120.

Will, B. E., M. R. Rosenzweig, E. L. Bennett, M. Hebert and H. Morimoto (1977). "Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats." Journal of comparative and physiological psychology **91**(1): 33.

Williamson, L. L., A. Chao and S. D. Bilbo (2012). "Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus." Brain Behav Immun **26**(3): 500-510.

Woerly, S., V. D. Doan, N. Sosa, J. de Vellis and A. Espinosa-Jeffrey (2004). "Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel™ allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord." Journal of neuroscience research **75**(2): 262-272.

Woerly, S., V. D. Doan, N. Sosa, J. de Vellis and A. J. J. o. n. r. Espinosa-Jeffrey (2004). "Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel™ allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord." **75**(2): 262-272.

Yang, Y., L. D. Laporte, M. L. Zelivyanskaya, K. J. Whittlesey, A. J. Anderson, B. J. Cummings and L. D. J. T. E. P. A. Shea (2009). "Multiple channel bridges for spinal cord injury: cellular characterization of host response." **15**(11): 3283-3295.

Youngstrom, M. J. J. A. J. o. O. T. (2002). "The Occupational Therapy Practice Framework: the evolution of our professional language." **56**(6): 607-608.

Yu, D., W. L. Neeley, C. D. Pritchard, J. R. Slotkin, E. J. Woodard, R. Langer and Y. D. J. S. C. Teng (2009). "Blockade of peroxynitrite-induced neural stem cell death in the acutely injured spinal cord by drug-releasing polymer." **27**(5): 1212-1222.

Zhou, L., L. Fan, X. Yi, Z. Zhou, C. Liu, R. Fu, C. Dai, Z. Wang, X. Chen and P. J. A. n. Yu (2018). "Soft conducting polymer hydrogels cross-linked and doped by tannic acid for spinal cord injury repair." **12**(11): 10957-10967.

ANEXOS

Anexo 1. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.

La Ley General de Salud ha establecido los lineamientos y principios generales a los cuales deberá someterse la investigación científica y tecnológica destinada a la salud, y depende de la Secretaría de Salud orientar su desarrollo.

TÍTULO SÉPTIMO

De la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación.

CAPÍTULO ÚNICO

ARTÍCULO 121.- En las investigaciones experimentales con animales, referidas a la salud humana, se deberán llenar los requisitos que establezcan las normas de las propias instituciones de salud, autorizadas por la Secretaría y satisfacer lo señalado en este Capítulo.

ARTÍCULO 122.- Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

ARTÍCULO 123.- Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

ARTÍCULO 124.- Los bioterios deberán estar de acuerdo con la especie, conformación corporal, hábitos, preferencias posturales y características locomotoras de los animales, para proporcionarles comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.

ARTÍCULO 125.- Los bioterios de producción o mantenimiento crónico serán supervisados por profesionales calificado y competente en la materia y deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

ARTÍCULO 126.- El titular de la institución de salud en donde se realice investigación a la que se refiere este Capítulo, deberá establecer y vigilar el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesarias para la protección del personal ocupacionalmente expuesto.

Anexo 2. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales.

4.5.3. Salud animal.

- b) Las cajas y jaulas se mantendrán limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables.
- c) Todos los días se observarán los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.
- d) El agua suministrada a los animales debe ser potable y a libre acceso.

4.6. Identificación y registro.

IDENTIFICACION		
ANIMAL	TIPO DE IDENTIFICACION	ZONA DE APLICACION
Rata y ratón	Colorantes Perforaciones y muescas Tatuaje	Pelaje y cola Oreja(s) Parte superior interna de la oreja Cola

4.7. Alimento.

El alimento para todas las especies debe cumplir con las siguientes características:

- a) Debe estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes.
- b) Debe estar dentro de su periodo de caducidad.
- c) Almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.

5.1.1. Confinamiento o encierro primario.

- a) Satisfacer las necesidades fisiológicas (alimentación, defecación, micción u otros) y conductuales de los animales, y que permita los movimientos normales y ajustes posturales característicos de la especie.

- b)** Cuando esté indicado, deberá favorecer la reproducción y la crianza.
- c)** Permitir las interacciones sociales entre los individuos de la especie, el establecimiento de jerarquías y las conductas de escape.
- d)** Brindar una ventilación e iluminación adecuadas.
- e)** Favorecer que los animales se mantengan limpios y secos.
- f)** Ser seguras, que impidan el escape de los animales o el entrapamiento de sus extremidades.

5.1.3.1. Alimentación y provisión de agua.

- a)** El alimento debe proporcionarse a libre acceso o en forma restringida según las necesidades de la cepa y de los procedimientos experimentales.
- b)** El agua debe ser potable y suministrarse a libre acceso durante toda la vida del animal.

5.1.4. Cama y nido.

Los roedores alojados en cajas con piso sólido deben tener el material de cama suficiente que garantice la absorción de su orina, excremento y desperdicio de agua, favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido.

6.1.4.1. Temperatura.

Las instalaciones de animales de laboratorio ya sean para reproducción o experimentación, deben mantener una temperatura estable dentro de los cuartos.

RANGOS DE TEMPERATURA (°C) Y HUMEDAD RELATIVA (%)

Animal	°C	%
Ratón, rata, hámster, jerbo, cobayo	18-26	40-70

8.1. Analgesia y anestesia.

Cualquier procedimiento que cause mayor dolor o molestia en los animales, que la producida por inyección o marcaje en orejas, requerirá el uso de tranquilizantes, analgésicos o

anestésicos. Si es necesario efectuar un procedimiento doloroso sin el uso de anestesia, analgésico o tranquilizante porque su uso afectaría los resultados o propósitos del experimento, éste debe ser aprobado por el Comité.

9. Eutanasia

Este capítulo tiene por objeto describir los procedimientos empleados para inducir de manera humanitaria la muerte de los animales (eutanasia) empleados en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento; para lograrlo cualquier técnica aplicada debe causar en el animal: rápida inconsciencia, paro cardiaco y/o respiratorio y pérdida de la función cerebral.

Además, debe reducir al mínimo la perturbación emocional, la incomodidad y/o el sufrimiento experimentado por la persona que lleve a cabo el procedimiento.

APLICACION DE LOS AGENTES Y METODOS DE EUTANASIA

ANIMALES	METODOS RECOMENDADOS	METODOS ACEPTADOS CONDICIONALMENTE
Roedores y otros animales pequeños	Anestésicos inhalables, CO ₂ , Ar, N ₂ irradiación con microondas, barbitúricos	N ₂ , Ar, dislocación cervical, decapitación

Anexo 3. Carta de aprobación del Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

MEXICO

Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

01 de julio del 2015

Ref. 09-B5-61-2800/201500/ 1887

Dr. Salgado Ceballos Hermelinda
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas Siglo XXI
Nivel Central

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **EFFECTO DEL IMPLANTE DE POLIPIRROL/YODO Y DE LA REHABILITACIÓN FÍSICA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEGENERACIÓN, REGENERACIÓN Y PLASTICIDAD NERVIOSA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATAS.**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2015-785-060.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación a la Comisión de Ética en Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,



Dr. Fabio Salazar García
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

MMA/ iah. F-CNIC-2015-20

IMSS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

de 1

01/07/2015 01:06 p.m.

Anexo 4. Carta de Re-aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

MÉXICO
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud
Comisión Nacional de Investigación Científica
Comité de Ética en Investigación



"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la
Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Oficio No. 09 B5 61 61 2800/2017/ 001862

Ciudad de México, a 26 de junio de 2017.

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Investigador Principal
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas
UMAE Hospital de Especialidades, C.M.N. Siglo XXI
PRESENTE

En relación al protocolo "Efecto del implante de polipirrol/Yodo y de la rehabilitación física sobre la expresión de genes relacionados con la degeneración, regeneración y plasticidad nerviosa en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en ratas" con número de registro 2015-785-060, el Comité de Ética en Investigación **CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601**, revisó y aprobó la solicitud de reaprobación anual por el periodo del 14 de junio de 2017 al 13 de junio de 2018.

Sin otro particular, le envío un saludo.

Atentamente

DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ

Representante Legal
Coordinación de Investigación en Salud
Centro Médico Nacional Siglo XXI
No. Registro COFEPRIS CI: 13 CI 09 015 213
No. Registro COFEPRIS CB: 13 CB 09 015 214

DR. MARCOS GUTIÉRREZ DE LA BARRERA

Presidente
Comité de Ética en Investigación
Coordinación de Investigación en Salud
Centro Médico Nacional Siglo XXI

SNN/BBB
ykgm/
F-CNIC-2015-20

Anexo 5. Escala de evaluación locomotora de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).

0	No se observa movimiento de las extremidades posteriores
1	Ligero movimiento de una o dos articulaciones , usualmente la cadera y/o rodilla
2	Movimiento extenso de una articulación o movimiento extenso de una y ligero de la otra articulación
3	Movimiento extenso de dos articulaciones
4	Ligero movimiento de las tres articulaciones de las extremidades posteriores
5	Movimiento ligero de dos articulaciones y extenso de la tercera
6	Movimiento extenso de dos articulaciones y ligero de la tercera
7	Movimiento extenso de las tres articulaciones de las extremidades posteriores
8	Barrido sin soporte de peso o colocación plantar de la pata sin soporte de peso corporal
9	Colocación plantar de la pata con soporte de peso en reposo solamente (es decir, cuando está parado) o escalonado dorsal sostenido, frecuente o constante soportado en peso y sin escalonamiento plantar
10	Soporte de peso corporal ocasional con pasos plantares , sin coordinación entre las extremidades posteriores y anteriores
11	Soporte de peso corporal con pasos plantares de frecuente a consistente y sin coordinación entre las extremidades posteriores y anteriores
12	Soporte de peso corporal con pasos plantares de frecuente a consistente y coordinación ocasional entre extremidades posteriores y anteriores
13	Pasos plantares con soporte de peso corporal de frecuente a consistente y coordinación frecuente entre extremidades posteriores y anteriores
14	Soporte de peso corporal con pasos plantares consistente. Coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores. La posición de la pata se encuentra rotada durante la locomoción (interna o externamente) cuando hace contacto inicial con la superficie así como, justo antes de levantarla al final de la postura o escalonamiento plantar frecuente , coordinación entre extremidades anteriores y posteriores consistente y escalonado dorsal ocasional
15	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores; no hay apertura libre de los dedos de las patas traseras u ocasional durante el avance de las extremidades delanteras; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial
16	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores durante la marcha; y la separación de los dedos de las patas se produce con frecuencia durante el avance del miembro delantero; la posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y girada en el despegue
17	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores durante la marcha y la separación de los dedos de las patas se produce con frecuencia durante el avance del miembro delantero; la posición predominante de la pata es paralela al contacto inicial y al levantamiento
18	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores durante la marcha y la separación de los dedos de las patas se produce con consistente durante el avance de la extremidad anterior; la posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y rotada en el levantamiento
19	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores durante la marcha y la separación de los dedos de las patas se produce con consistente durante el avance de la extremidad anterior; la posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y en el levantamiento; y la cola se encuentra abajo todo el tiempo
20	Escalonamiento plantar y coordinación consistente entre extremidades posteriores y anteriores durante la marcha y separación de los dedos de las patas consistente. La posición de la pata es paralela en el contacto inicial y en el levantamiento y la cola se encuentra constantemente hacia arriba y presenta estabilidad del tronco .
21	Escalonamiento plantar y coordinación durante la marcha consistente, apertura de los dedos de las patas consistente. Predominante posición de la pata en paralelo a lo largo de la postura, estabilidad constante del tronco y la cola constantemente hacia arriba

Anexo 6. Escala de evaluación Lousville (LSS):

A, Parámetros a evaluar. B, Intensidad de movimiento y alternancia observada de las extremidades posteriores (EP); y porcentaje de dependencia con las extremidades anteriores (EA). C, Intensidad de la estabilidad del tronco observada y ángulo de inclinación del cuerpo con respecto a la superficie del agua. D, Categorías de puntuación.

A.

Movimiento EP		Alternancia EP		Dependencia EA		Estabilidad del tronco		Ángulo del cuerpo	
0	N	0	N/R	4	N	4	N o R(L)	2	N/L
1	R	1	O	3	R	3	O(L) o R(M)	1	M
2	O	2	F	2	O	2	F/C(L) o O(M) o R(S)	0	S
3	F	3	C	1	F	1	F/C(M) o O(S)		
4	C			0	C	0	F/C(S)		

B.

Movimiento EP/Alternancia, dependencia EA y estabilidad del tronco	
N-Ninguno	0%
R-Raramente	1-5%
O-Ocasional	6-50%
F-Frecuentemente	51-95%
C-Consistente	96-100%

C.

Estabilidad del tronco/Ángulo del cuerpo	
N-Ninguno	0°
L-Leve	1-20°
M-Moderado	21 a 45°
S-Severo	46° y más

D.

Categorías de puntuación	
12 a 17	<u>Buenas nadadoras.</u> Movimiento de las EP de F/C. Alternancia de las EP de O a C. Dependencia de las EA. Estabilidad del tronco N a R (M). Ángulo del cuerpo de N/M.
6 a 11	<u>Nadadoras intermedias.</u> Movimiento de las EP de O/F. Alternancia de las EP de O/F. Dependencia de las EA de F/O. Estabilidad del tronco de O(L) a C(M). Ángulo del cuerpo M
0 a 5	<u>Pobres nadadoras.</u> Movimiento de las EP de N/R. Alternancia de las EP de N/R. Dependencia de las EA de F/C. Estabilidad del tronco de C(M) a C(R). Ángulo del cuerpo M/S

Anexo 7. Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

1. Objetivo y campo de aplicación.

1.1. Esta norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para personas físicas y morales encargadas de establecimientos públicos o privados, en donde se le dé muerte a uno o varios animales con fines de abasto, investigación, pruebas de constatación, enseñanza, aprovechamiento cinegético, peletería o cualquier otro tipo de aprovechamiento, Centros de Atención Canina y felina y similares, bioterios, zoológicos o predios o instalaciones que manejan vida silvestre en forma confinada fuera de su hábitat natural (PIMVS), granjas educativas, comercializadoras, tiendas de animales, criaderos, centros de rehabilitación, circos, colecciones particulares, centros de espectáculo, unidades de manejo para la conservación de vida silvestre (UMA), centros de decomiso o acopio, entre otros; y tiene por objeto establecer los métodos para dar muerte a los animales garantizando buenos niveles de bienestar y con el propósito de disminuir al máximo el dolor, sufrimiento, ansiedad y estrés.

4.1. A ningún animal se le dará muerte por envenenamiento, drogas curariformes, paralizantes musculares, asfixia, inmersión en agua, por golpes o por cualquier otro procedimiento que les cause sufrimiento, dolor, ansiedad o que prolongue su agonía. Los únicos métodos de eutanasia o matanza que se pueden aplicar, son los determinados en esta Norma u otros que autorice la Secretaría.

6.4. Conejos y roedores.

Los métodos eutanasia de conejos y roedores de compañía, deben estar basados en la utilización de tranquilizantes, sedantes y anestésicos bajo los criterios de las disposiciones aplicables vigentes.

6.4.1. Manejo previo a la muerte.

Previo a la matanza y eutanasia de conejos y roedores de compañía, se debe inmovilizar al animal e inducir la sedación 5 a 10 minutos antes de la aplicación del anestésico, inyectando xilacina por vía intramuscular a una dosis de 1.5 - 2 mg/kg de peso.

6.4.2. Métodos eutanasia.

6.4.2.1. Sobredosis de anestésicos.

El uso de sobredosis de anestésicos es el método de elección para la matanza y eutanasia de conejos y roedores de compañía.

6.4.2.1.1. Anestésicos inyectables.

6.4.2.1.1.1. Anestésico derivado del ácido barbitúrico (pentobarbital).

Para la eutanasia de conejos y roedores de compañía se debe emplear una sobredosis de pentobarbital sódico de 90 - 120 mg/kg de peso. En el caso de los conejos, el pentobarbital debe ser administrado por la vena marginal de la oreja, por la vena cefálica o yugular. La vía intraperitoneal sólo se usará cuando sea imposible utilizar la vía intravenosa, previa dilución con solución salina a una dosis de 150 mg/kg de peso.

Para la eutanasia de roedores la vía de elección es la intraperitoneal, previa dilución del pentobarbital con solución salina.

La vía intracardiaca sólo se permite si el animal está anestesiado o inconsciente.

Para individuos de talla pequeña se deben administrar los sedantes o anestésicos mediante una inyección intrahepática. El barbitúrico debe ser diluido en solución salina.

6.4.2.1.1.2. Otros anestésicos.

Cuando no se cuente con barbitúricos, se pueden emplear anestésicos como la ketamina a una dosis de 60 - 100 mg/kg de peso vía intramuscular en combinación con xilacina. También se puede utilizar una combinación de tiletamina con zolazepam, cuya dosis dependerá de la especie y de la recomendación del fabricante.

6.4.2.1.2. Anestésicos inhalables.

Tanto para los conejos como para los roedores puede emplearse isoflurano o fluorano que induce una anestesia rápida. Durante el periodo de inducción se les debe suministrar aire u oxígeno y contar con un vaporizador y una mascarilla para que el animal inhale el vapor del anestésico.

Como en todas las especies, debe verificarse la muerte clínica del animal. El paso del anestésico inhalable se debe mantener por lo menos 3 minutos después de que el animal esté clínicamente muerto.

Anexo 8. Artículo científico

Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2020)31:58
https://doi.org/10.1007/s10856-020-06395-5

CLINICAL APPLICATIONS OF BIOMATERIALS

Original Research



Recovery of motor function after traumatic spinal cord injury by using plasma-synthesized polypyrrole/iodine application in combination with a mixed rehabilitation scheme

Stephanie Sánchez-Torres^{1,2,3} · Araceli Díaz-Ruiz⁴ · Camilo Ríos⁴ · María G. Olayo⁵ · Guillermo J. Cruz⁵ · Roberto Olayo⁶ · Juan Morales⁶ · Rodrigo Mondragón-Lozano^{3,7} · Omar Fabela-Sánchez^{3,8,9} · Carlos Orozco-Barrios^{3,7} · Angélica Coyoy-Salgado^{3,7} · Sandra Orozco-Suárez¹ · Cristian González-Ruiz^{4,10} · Laura Álvarez-Mejía^{1,3} · Axayacatl Morales-Guadarrama⁵ · Vinnitsa Buzoianu-Anguiano¹ · Pablo Damián-Matsumura² · Hermelinda Salgado-Ceballos^{1,3}

Received: 19 December 2019 / Accepted: 15 June 2020

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Traumatic spinal cord injury (TSCI) can cause paralysis and permanent disability. Rehabilitation (RB) is currently the only accepted treatment, although its beneficial effect is limited. The development of biomaterials has provided therapeutic possibilities for TSCI, where our research group previously showed that the plasma-synthesized polypyrrole/iodine (PPy/I), a biopolymer with different physicochemical characteristics than those of the PPy synthesized by conventional methods, promotes recovery of motor function after TSCI. The present study evaluated if the plasma-synthesized PPy/I applied in combination with RB could increase its beneficial effects and the mechanisms involved. Adult rats with TSCI were divided into no treatment (control); biopolymer (PPy/I); mixed RB by swimming and enriched environment (SW/EE); and combined treatment (PPy/I + SW/EE) groups. Eight weeks after TSCI, the general health of the animals that received any of the treatments was better than the control animals. Functional recovery evaluated by two scales was better and was achieved in less time with the PPy/I + SW/EE combination. All treatments significantly increased β III-tubulin (nerve plasticity) expression, but only PPy/I increased GAP-43 (nerve regeneration) and MBP (myelination) expression when were analyzed by immunohistochemistry. The expression of GFAP (glial scar) decreased in treated groups when determined by histochemistry, while morphometric analysis showed that tissue was better preserved when PPy/I and PPy/I + SW/EE were administered. The application of PPy/I + SW/EE, promotes the preservation of nervous tissue, and the expression of molecules related to plasticity as β III-tubulin, reduces the glial scar, improves general health and allows the recovery of motor function after TSCI.

✉ Hermelinda Salgado-Ceballos
melisalce@yahoo.com

¹ Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México City, CP 06720, México

² Doctorate in Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, Itapalapa, Mexico City, CP 09340, Mexico

³ Proyecto Camina A.C. Research Center, Mexico City, CP 14050, Mexico

⁴ Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez S.S.A, Mexico city, CP 14269, Mexico

⁵ Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera Mexico-Toluca, km 36.5, Ocoyoacac,

State of Mexico, CP 52750, Mexico

⁶ Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, CP 09340, Mexico

⁷ CONACyT-Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico

⁸ Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana, San Rafael Atlixco 186, 09340 Itapalapa, CDMX, México

⁹ Catedrático CONACyT-Centro de Investigación en Química Aplicada, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cementos, Saltillo, Coahuila 25294, México

¹⁰ Escuela Superior de Medicina-Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Published online: 30 June 2020

Springer

Efecto del implante de polipirrol/iodo sintetizado por plasma, combinado con rehabilitación física, sobre la recuperación de la función motora y la regeneración y plasticidad nerviosa en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en ratas.



STEPHANIE MARICELA SANCHEZ TORRES
 ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
 DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 7 del mes de septiembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATEMURA
 DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
 DRA. KIKO KUBI GUZMAN RAMOS
 DR. ANTONIO BUENO NAVA
 DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

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

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
 DE: STEPHANIE MARICELA SANCHEZ TORRES.

y de acuerdo con el artículo 76 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

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

PRESIDENTE

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

VOCAL

DRA. KIKO KUBI GUZMAN RAMOS

VOCAL

DR. ANTONIO BUENO NAVA

SECRETARIA

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda– del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen– son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella.