



**Casa abierta al tiempo**  
**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**  
**Unidad-Iztapalapa**  
**Departamento de Ingeniería Eléctrica**  
**Área de Ingeniería Biomédica**

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

**Influencia del campo magnético sobre la  
regeneración axonal después de un implante de  
polímero semiconductor en un modelo de lesión  
por sección completa de la médula espinal**

Presenta:

**Ana Laura Alvarez Mejía**

Agosto de 2008



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad-Iztapalapa**

**Departamento de Ingeniería Eléctrica**

**Área de Ingeniería Biomédica**

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

**Influencia del campo magnético sobre la regeneración  
axonal después de un implante de polímero semiconductor  
en un modelo de lesión por sección completa  
de la médula espinal**

Presenta:

**Ana Laura Alvarez Mejía**

Asesores:

**Dr. Juan Morales Corona  
Dra. Hermelinda Salgado Ceballos  
M. en C. Rafael Godínez Fernández**

Sinodales:

---

**Dr. Juan Azorín Nieto  
Presidente**

---

**M. en C. Rafael Godínez Fernández  
Secretario**

---

**Dra. Sandra Orozco Suárez  
Vocal**

Agosto de 2008

## **Dedico esta tesis**

A mis padres Ana María y Miguel,  
con mucho cariño y respeto

A Armando, con cariño, por su  
apoyo, paciencia, comprensión y por  
todo lo que representa para mí

A la Dra. Hermelinda Salgado  
Ceballos, Dr. Juan Morales Corona y  
M. en C. Rafael Godínez Fernández  
por la asesoría, apoyo y el tiempo  
dedicado a la realización de esta  
tesis.

A mis inseparables amigos Rodrigo,  
Axayacatl, Aldo, Mario y Fausto

A toda aquella persona que hizo  
posible la realización de esta tesis

# Agradecimientos

---

Por su apoyo y colaboración



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana  
UAM-Iztapalapa**

Dr. Juan Morales Corona  
Dr. Roberto Olayo González  
M. en C. Rafael Godínez Fernández  
Ing. Rodrigo Mondragón Lozano  
Ing. Axayacatl Morales Guadarrama  
Ing. Aldo Escalona Delgado



**Proyecto Camina A.C.**

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos



**Instituto Mexicano del Seguro Social  
IMSS**

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos  
Beca de Investigación I No. 99092359



**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
INNN**

Dr. Camilo Ríos Castañeda  
Dra. Araceli Díaz Ruiz



**Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares  
ININ**

Dra. Guadalupe Olayo González  
Dr. Guillermo Cruz Cruz



**Universidad Nacional Autónoma de México  
UNAM**

Dra. Leticia Verdugo Díaz



**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
CONACYT**

Beca de proyecto SEP-2004-C0147467  
Beca para estudios de posgrado No. 199021

# Índice

---

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>   | <b>V</b>    |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>1. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....  | 1           |
| 1.1.1. La médula espinal.....   | 4           |
| 1.1.2. Columna vertebral.....   | 5           |
| 1.2. FISIOLÓGÍA DE LA MÉDULA ESPINAL.....   | 6           |
| 1.2.1. Potencial de membrana y potencial de acción.....   | 6           |
| 1.2.2. Membrana celular como capacitor eléctrico.....   | 7           |
| 1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA<br>MÉDULA ESPINAL.....            | 10          |
| 1.3.1. Epidemiología.....   | 10          |
| 1.3.2. Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.....                             | 11          |
| 1.4. ESTRATEGIAS PARA RESTABLECER LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA.....                                       | 16          |
| 1.4.1. Estrategias de neuroprotección.....  | 16          |
| 1.4.2. Estrategias para favorecer la regeneración nerviosa.....                                     | 17          |
| 1.5. POLÍMEROS SEMICONDUCTORES Y SÍNTESIS.....  | 20          |
| 1.5.1. Polímeros semiconductores.....   | 20          |
| 1.5.2. Métodos de síntesis de polímeros semiconductores.....  | 23          |
| 1.5.2.1. Método químico.....  | 23          |
| 1.5.2.2. Método electroquímico.....   | 23          |
| 1.5.2.3. Método de polimerización por plasma.....   | 23          |
| 1.6. POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....   | 24          |
| 1.6.1. Ventajas de la polimerización por plasma.....  | 24          |
| 1.7. POLÍMEROS SEMICONDUCTORES EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.....                                      | 25          |
| 1.8. CAMPOS MAGNÉTICOS EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....  | 27          |
| 1.8.1. Espectro de radiación electromagnética.....  | 27          |
| 1.8.2. Bioelectromagnetismo.....  | 28          |
| 1.8.3. Campo electromagnético.....  | 28          |
| 1.8.3.1. Ondas electromagnéticas.....   | 30          |
| 1.8.4. Interacción del campo magnético con los sistemas biológicos.....                             | 31          |
| 1.8.5. Dosimetría.....  | 31          |
| 1.8.6. Efectos térmicos y no térmicos.....  | 32          |
| 1.8.6.1. Efectos térmicos.....  | 32          |
| 1.8.6.2. Efectos no térmicos.....   | 32          |
| 1.8.8. Efecto del campo electromagnético sobre las células y las biomoléculas <i>in vitro</i> ..... | 33          |
| 1.8.9. Efecto del campo electromagnético sobre el sistema nervioso <i>in vivo</i> .....             | 34          |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>  | <b>37</b>   |
| <b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>38</b>   |
| 3.1. HIPÓTESIS.....   | 38          |
| 3.2. OBJETIVOS.....   | 38          |
| <b>4. VARIABLES.....</b>  | <b>40</b>   |
| 4.1. VARIABLES DEPENDIENTES.....  | 40          |
| 4.2. VARIABLES INDEPENDIENTES.....  | 40          |
| <b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>41</b>   |
| 5.1. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS SEMICONDUCTORES Y FABRICACIÓN DEL<br>IMPLANTE.....                   | 41          |
| 5.1.1. Síntesis de los materiales y parámetros de operación del reactor.....                        | 41          |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1.2. Fabricación de los implantes.....   | 42        |
| 5.1.3. Caracterización de los materiales.....  | 42        |
| 5.1.3.1. Análisis IR.....  | 42        |
| 5.1.3.2. Análisis de difracción de rayos-X.....  | 44        |
| 5.1.3.3. Características eléctricas bajo condiciones de humedad.....   | 44        |
| 5.1.3.4. Morfología.....   | 46        |
| 5.2. GRUPOS EXPERIMENTALES.....  | 48        |
| 5.3. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....   | 48        |
| 5.3.1. Método de anestesia.....  | 49        |
| 5.3.2. Lesión por sección completa de la médula espinal.....   | 49        |
| 5.3.3. Implante de los polímeros.....  | 49        |
| 5.4. ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA DE BAJA FRECUENCIA.....  | 50        |
| 5.5. EVALUACIÓN FUNCIONAL.....   | 51        |
| 5.6. ESTUDIO HISTOLÓGICO Y BIOQUÍMICO.....   | 51        |
| 5.6.1. Sacrificio por perfusión vía intracardiaca y estudio histológico.....   | 51        |
| 5.6.2. Sacrificio por decapitación para cuantificación de calcio.....  | 52        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>  | <b>53</b> |
| 6.1. MORBI-MORTALIDAD.....   | 53        |
| 6.2. EVALUACIÓN FUNCIONAL.....   | 53        |
| 6.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....  | 61        |
| 6.4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL SITIO DE LESIÓN E IMPLANTE.....   | 66        |
| 6.5. MEDICIÓN DE CALCIO.....   | 67        |
| <b>7. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>68</b> |
| 7.1. EFECTO DE DIFERENTES IMPLANTES POLIMÉRICOS EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL.....   | 68        |
| 7.1.1. Evaluación funcional y estudio histológico.....   | 68        |
| 7.1.2. Polímeros sintetizados por plasma.....  | 70        |
| 7.2. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA DE BAJA FRECUENCIA Y EL IMPLANTE DE POLIMEROS DERIVADOS DEL PIRROL EN LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL..... | 71        |
| 7.2.1. Evaluación funcional y estudio histológico.....   | 71        |
| 7.2.2. Efecto de la estimulación magnética de baja frecuencia en lesión por sección completa de la médula espinal.....   | 72        |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>APÉNDICE A. ECUACIÓN DE NERST.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>APÉNDICE B. REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>APÉNDICE C. PROCEDIMIENTO DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE HARRIS.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>APÉNDICE D. ESCALA BBB.....</b>   | <b>87</b> |

# Índice de figuras

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| FIGURA 1   | LAS MENINGES: PIAMADRE, ARACNOIDES Y DURAMADRE, ENVOLVIENDO LA MÉDULA ESPINAL  | 2  |
| FIGURA 2.  | ESQUEMA DE LA NEURONA DONDE SE MUESTRAN SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES   | 3  |
| FIGURA 3.  | IMAGEN DE CORTE TRANSVERSAL DE LAS PRINCIPALES VÍAS LARGAS DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA MÉDULA ESPINAL                        | 5  |
| FIGURA 4.  | ESQUEMA DE LA COLUMNA VERTEBRAL  | 5  |
| FIGURA 5.  | ESQUEMA DE LAS VÉRTEBRAS ESPINALES DONDE SE MUESTRAN SUS COMPONENTES PRINCIPALES   | 6  |
| FIGURA 6.  | POTENCIAL DE ACCIÓN REGISTRADO EN UN NERVIO  | 8  |
| FIGURA 7.  | LA CONDUCCIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN REQUIERE FLUJO ACTIVO Y PASIVO DE CORRIENTE  | 9  |
| FIGURA 8.  | CONDUCCIÓN POR SALTOS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN A LO LARGO DE UN AXÓN MIELÍNICO  | 10 |
| FIGURA 9.  | CAUSAS DE LESIONES TRAUMÁTICAS DE MÉDULA ESPINAL   | 11 |
| FIGURA 10. | ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LOS MECANISMOS SECUNDARIOS DE LESIÓN   | 15 |
| FIGURA 11. | GRAFICO COMPARATIVO DE CONDUCTIVIDADES DE DIFERENTES MATERIALES  | 22 |
| FIGURA 12. | ESQUEMA DEL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN POR PLASMA   | 24 |
| FIGURA 13. | ESPECTRO DE RADIACIÓN ELECTROMAGNETICA   | 27 |
| FIGURA 14. | ARREGLOS DEL CAMPO MAGNÉTICO PERPENDICULARES AL TRONCO NERVIOSO  | 35 |
| FIGURA 15. | AREGLO DEL CAMPO MAGNETICO PARALELO AL TRONCO NERVIOSO   | 36 |
| FIGURA 16. | ESQUEMA DEL REACTOR DE POLIMERIZACIÓN POR PLASMA   | 41 |
| FIGURA 17  | EPECTROS DE IR DE LOS MATERIALES POLIMÉRICOS.  | 43 |
| FIGURA 18  | ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X  | 44 |
| FIGURA 19  | DISPOSITIVO EXPERIMENTAL PARA LAS MEDICIONES DE CONDUCTIVIDAD  | 45 |
| FIGURA 20  | MICROGRAFIAS POR ESCANEAMIENTO ELECTRONICO DE LOS MATERIALES (A)PPY, (B)PPY/I Y (C)PPY/PEG A AMPLIFICACIÓN DE 500X Y 3000X | 47 |
| FIGURA 21  | ARREGLO DE BOBINAS HELMHOLTZ CON DIRECCIÓN DEL CAMPO PERPENDICULAR E INDUCCIÓN DE CORRIENTE PARALELA AL TRONCO NERVIOSO    | 50 |
| FIGURA 22. | ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCIÓN ATOMICA PEKIN ELMER AANALYST 100  | 52 |
| FIGURA 23  | RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL GRUPO I   | 54 |
| FIGURA 24  | RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL GRUPO II  | 54 |
| FIGURA 25  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL Y EL SUBGRUPO PPY                              | 55 |
| FIGURA 26  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL Y EL SUBGRUPO PPY/I                            | 56 |
| FIGURA 27  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL Y EL SUBGRUPO PPY/PEG                          | 56 |
| FIGURA 28  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL+EMBF Y EL SUBGRUPO PPY+EMBF                    | 57 |
| FIGURA 29  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL+EMBF Y EL SUBGRUPO PPY/I+EMBF                  | 58 |
| FIGURA 30  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL+EMBF Y EL SUBGRUPO PPY/PEG+EMBF                | 58 |
| FIGURA 31  | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO CONTROL Y EL SUBGRUPO CONTROL+EMBF                     | 59 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| FIGURA 32 | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO PPY Y EL SUBGRUPO PPY+EMBF   | <b>60</b> |
| FIGURA 33 | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO PPY/I Y EL SUBGRUPO PPY/I+EMBF   | <b>60</b> |
| FIGURA 34 | COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN LA ESCALA BBB DEL SUBGRUPO PPY/PEG Y EL SUBGRUPO PPY/PEG+EMBF   | <b>61</b> |
| FIGURA 35 | CORTES LONGITUDINALES DE LA MEDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESION TEÑIDOS POR HEMATOXILINA Y ESOSINA DE HARRIS DEL SUBGRUPO CONTROL CON EMBF O SIN EMBF      | <b>62</b> |
| FIGURA 36 | CORTES LONGITUDINALES DE LA MEDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESION TEÑIDOS POR HEMATOXILINA Y ESOSINA DE HARRIS DEL SUBGRUPO PPY CON EMBF O SIN EMBF          | <b>63</b> |
| FIGURA 37 | CORTES LONGITUDINALES DE LA MEDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESION TEÑIDOS POR HEMATOXILINA Y ESOSINA DE HARRIS DEL SUBGRUPO PPY/I CON EMBF O SIN EMBF        | <b>64</b> |
| FIGURA 38 | CORTES LONGITUDINALES DE LA MEDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESION TEÑIDOS POR HEMATOXILINA Y ESOSINA DE HARRIS DEL SUBGRUPO PPY/PEG CON EMBF O SIN EMBF      | <b>65</b> |
| FIGURA 39 | CORTES LONGITUDINALES DE LA MEDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESION TEÑIDOS POR HEMATOXILINA Y ESOSINA DE HARRIS DEL SUBGRUPO PPY/PEG ES PROCESOS DE ABSORCIÓN | <b>65</b> |



# Índice de tablas

---

|          |  |    |
|----------|--|----|
| TABLA 1. | FASES DE LA SECUENCIA TEMPORAL DE LOS CAMBIOS ANATOMOPATOLÓGICOS DESPUÉS DE UNA LTME                                   | 13 |
| TABLA 2. | TRATAMIENTOS DE NEUROPROTECCIÓN POSTERIORES A UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL                               | 16 |
| TABLA 3. | TRATAMIENTOS PARA FAVORECER EL PROCESO DE NEUROREGENERACIÓN POSTERIORES A UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL   | 19 |
| TABLA 4. | COMPARACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES DE LOS MATERIALES ELECTRONICOS INORGANICOS Y LOS POLIMEROS CONJUGADOS                | 21 |
| TABLA 5. | DIFERENTES IMPLANTES MÉDICOS GENERADOS Y/O TRATADOS POR PLASMA   | 26 |
| TABLA 6. | ÁREAS DE INVESTIGACIÓN Y APLICACIÓN DE BIOMATERIALES TRATADOS POR PLASMA   | 26 |
| TABLA 7. | RESISTENCIA, RESISTIVIDAD Y CONDUCTIVIDAD DE LOS POLIMEROS A DIFERENTES CONDICIONES DE HUMEDAD RELATIVA                | 45 |
| TABLA 8. | ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL SITIO DE LESIÓN POR SECCIÓN COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL E IMPLANTE DE DIFERENTES POLÍMEROS | 66 |
|          | CONCENTRACIONES DE CALCIO  | 67 |

# Abreviaturas

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| AMPA                          | $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol     |
| ATP                           | Adenosintrifosfato                               |
| BBB                           | Basso, Beattie y Bresnahan                       |
| Ca <sup>++</sup>              | Calcio   |
| CCC                           | Cultivos de Células Cromafines                   |
| CEM                           | Campo Electromagnético                           |
| CEM's                         | Campos Electromagnéticos                         |
| CM                            | Campo magnético                                  |
| CM's                          | Campos Magnéticos                                |
| e <sup>-</sup>                | Electrones                                       |
| EMBF                          | Estimulación Magnética de Baja Frecuencia        |
| EMRT                          | Estimulación Magnética Repetitiva Transcraneal   |
| ERO                           | Especies Reactivas de Oxígeno                    |
| Fe <sup>++</sup>              | Fierro   |
| H <sup>+</sup>                | Hidrógeno  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrógeno                            |
| I                             | Iodo   |
| K <sup>+</sup>                | Potasio  |
| KA                            | Kainato  |
| LPSCME                        | Lesión por Sección Completa de la Médula Espinal |
| LTME                          | Lesión traumática de la Médula Espinal           |
| Lts                           | Leucotrienos                                     |
| Mg <sup>++</sup>              | Magnesio   |
| mGluR                         | Metabotrópicos                                   |
| Na <sup>+</sup>               | Sodio  |
| NCu                           | Núcleo Cuneatus o de Burdash                     |
| NGr                           | Núcleo Gracilis o de Goll                        |
| NMDA                          | N-Methyl-D-aspartato                             |
| NR                            | Núcleo Rojo                                      |
| O <sub>2</sub>                | Oxígeno  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Anión Súperoxido                                 |
| OH <sup>-</sup>               | Radical Hidroxilo                                |
| PGs                           | Prostaglandinsintasa                             |
| PPy                           | Polipirrol                                       |
| PPy/I                         | Polipirrol/Yodo                                  |
| PPy/PEG                       | Polipirrol/Polietilenglicol                      |
| SN                            | Sistema Nervioso                                 |
| SNC                           | Sistema Nervioso Central                         |
| SNP                           | Sistema Nervioso Periférico                      |
| TXA <sub>2</sub>              | Tromboxanos A <sub>2</sub>                       |
| Zn <sup>++</sup>              | Zinc   |
| $\epsilon$                    | Permeabilidad Eléctrica                          |
| $\delta$                      | Conducción Eléctrica                             |
| $\mu$                         | Permeabilidad Magnética                          |
| $\mu\text{gCa}$               | Microgramos de calcio por mililitro              |

# Resumen

---

En la actualidad no existe una estrategia terapéutica efectiva para reestablecer la función neurológica después de una lesión traumática de la médula espinal (LTME), debido a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario y a la baja capacidad de regeneración espontánea del sistema nervioso central.

En fechas recientes se ha explorado el área de materiales con el fin de obtener materiales que por sus características físico-químicas sirvan como implantes que permitan la regeneración y/o la recuperación de la función del tejido nervioso después de una lesión por sección completa de la médula espinal (LPSCME).

En esta área, un estudio previo mostró que los implantes de Polipirrol/Iodo (PPy/I) y Polipirrol/Polietilenglicol (PPy/PEG) sintetizados por plasma después de una LPSCME, promueven la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional en las ratas implantadas. Con el objetivo de incrementar estos resultados benéficos se decidió combinar dicha estrategia terapéutica con alguna otra que mejorara su efecto, para lo cual se optó por la estimulación magnética de baja frecuencia (EMBF) ya que se ha comprobado que esta promueve la regeneración celular y la recuperación del tejido nervioso.

Por lo anterior, el diseño experimental del presente estudio incluyó ratas con LPSCME que fueron o no implantadas con polímeros derivados del pirrol sintetizados por plasma: Polipirrol (PPy), PPy/I o PPy/PEG y que recibieron o no EMBF (0.7mT, 60Hz). Para evaluar la recuperación motora (marcha) en las extremidades posteriores se utilizó la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan) aplicándose una vez por semana durante 2 meses. Al término de este periodo se realizaron los estudios morfológicos y morfométricos, para evaluar la cantidad de tejido preservado y la integración del implante a la médula espinal.

Los resultados histológicos indican que los animales que recibieron cualquiera de los tres implantes presentaron menor destrucción del tejido nervioso en comparación a los animales que solamente fueron sometidos a la LPSCME, observándose una adecuada integración de los implantes al tejido medular.

Por otro lado la recuperación funcional indica que el tratamiento combinado de un implante de PPy más la EMBF incrementa la recuperación motora en comparación del uso de los tratamientos por separado. Sin embargo, la combinación con PPy/I no fue favorable. Los resultados indican que el efecto negativo al aplicar EMBF puede deberse a la entrada masiva de calcio ( $Ca^{++}$ ) al interior de la célula tanto por los propios mecanismos secundarios de lesión como por la EMBF combinada con las propiedades físicas del PPy/I, lo cual

pudo incrementar el proceso exitotóxico en las células neuronales que finalmente las llevó a la muerte.

Lo anterior indica que los implantes poliméricos derivados del PPy y sintetizados por plasma favorecen la protección del tejido nervioso y la recuperación funcional. Por otro lado, al hacer uso de tratamientos combinados con implantes poliméricos derivados del pirrol sintetizados por plasma no tienen efecto sinérgico sobre la recuperación funcional. Sin embargo, demostraron reducción en la presencia de células inflamatorias del sistema inmunológico con o sin implante.

# 1. Antecedentes

---

## 1.1. Anatomía y fisiología del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso (SN) es el encargado de coordinar las funciones más especializadas del organismo y se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

El SNC, está ubicado en un plano profundo del organismo, rodeado y protegido por el hueso. Está conformado por el encéfalo ubicado dentro del cráneo y por la médula espinal que se extiende a lo largo del conducto vertebral, hasta aproximadamente la primera y segunda vértebras lumbares.

El cerebro es el área de integración del SN y efectúa funciones relacionadas con los procesos mentales y con el complejo control de nuestro cuerpo [1]; mientras que la médula espinal tiene la función de servir como conducto de muchas vías nerviosas que van hacia el cerebro y provienen del mismo y sirve como área de integración para coordinar y regular la actividad sensorial y motora de los músculos esqueléticos.

El SNC está protegido contra las lesiones, pues se halla suspendido en un baño de líquido cefalorraquídeo y está envuelto por membranas protectoras o meninges: duramadre, piamadre y aracnoides. La aracnoides y la piamadre son delicadas membranas internas vascularizadas, finas y delgadas como el papel de seda y la duramadre es una capa fibrosa externa y resistente. La aracnoides se sitúa entre la duramadre y la piamadre de la que se encuentra separada solamente por el espacio subdural virtual que contiene un volumen pequeño de líquido. La aracnoides y la piamadre están unidas íntimamente por abundantes bridas delgadas de tejido conjuntivo, pero en muchos sitios las separa ampliamente el espacio subaracnoideo, ocupado por líquido cefalorraquídeo. El espacio extradural separa a la duramadre del conducto raquídeo; está ocupado de tejido adiposo que contiene abundantes vasos sanguíneos de grueso calibre y pared delgada; lo que en conjunto proporciona protección adicional al funcionar como parachoques [2] (Figura 1).

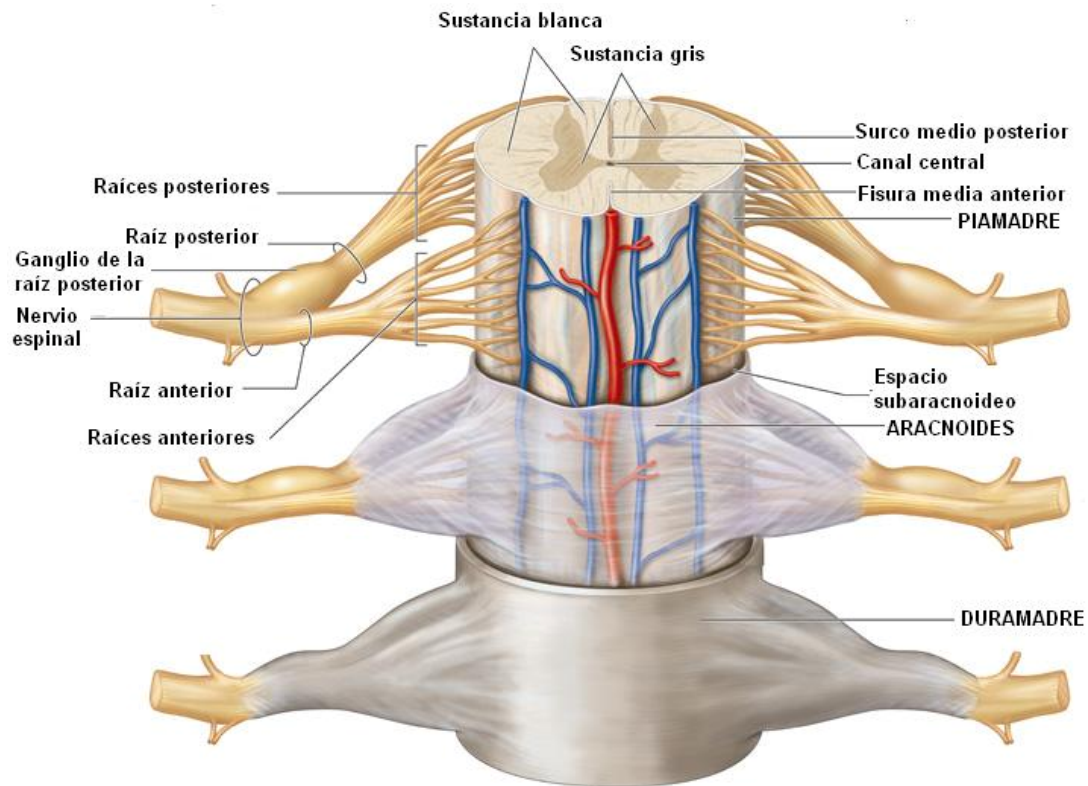


Figura 1. Las meninges: piamadre, aracnoides y duramadre, envolviendo la médula espinal.

El tejido nervioso contiene 2 tipos básicos de células: las neuronas y las células de sostén.

Las **neuronas**, realizan todas las funciones especializadas atribuidas al SN; como recibir e integrar en forma simultánea estímulos provenientes de varias fuentes, traducir el estímulo en una diferencia de carga eléctrica entre las superficies de sus membranas, propagar esta diferencia, traducir la señal eléctrica en mensajeros químicos y llevar a estos mensajeros a células blanco [3] [4].

I. La neurona está constituida principalmente por:

1. **Cuerpo celular o soma.** A partir de este nacen múltiples prolongaciones ramificadas que constituyen las principales áreas receptoras de las neuronas. Además brinda gran parte de la nutrición que se requiere para conservar la vida de la neurona [1].
2. **Dendritas.** Son ramificaciones del soma y son las partes receptoras principales de la neurona [1].

3. **Axón.** Es la parte de la neurona llamada fibra nerviosa. Estos transmiten las señales nerviosas a otras células [1][3][4] como se ilustra en la Figura 2.

Cada neurona constituye una entidad separada y distinta. Las terminaciones axonales de cada neurona al tener contacto con las dendritas y los cuerpos celulares de otras neuronas forman una **sinapsis**, la cual tiene la función de transmitir el impulso nervioso de una neurona a otra formando vías nerviosas cortas o largas. Las sinapsis pueden ser químicas si la comunicación está mediada por neurotransmisores o eléctricas si esta mediada por iones y las membranas están acopladas eléctricamente.

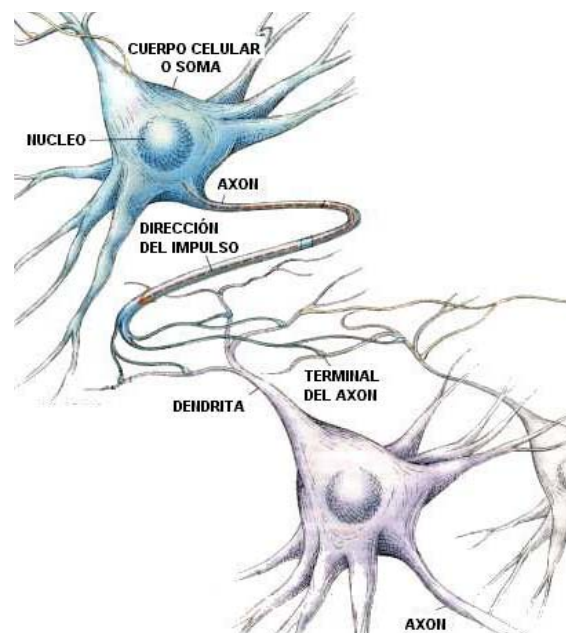


Figura 2. Esquema de la neurona donde se muestran sus principales constituyentes

II. Las **células de sostén y aislamiento**, sostienen a las neuronas en su sitio e impiden que se extiendan las señales entre las células y sus estructuras intracelulares que de manera colectiva se llaman **neuroglia** [1].

Las células de la neuroglia se llaman **células gliales**, en el SNC se dividen en:

1. **Oligodendrocitos;** Son células de tamaño intermedio, se encuentran en íntima relación con los axones y los somas neuronales, tienen un citoplasma denso, rico en ribosomas y en cisternas de retículo endoplasmático rugoso, un gran aparato de Golgi y abundantes mitocondrias.

Los oligodendrocitos desempeñan un papel importante en la formación y mantenimiento de la vaina de **mielina** de las fibras nerviosas del SNC [3][4].

2. **Astroglia (astrocitos)**. Son las células más grandes del tejido glial, tienen forma de estrella, poseen gliofibrillas y abundantes granulos de glucógeno. Están involucradas en el metabolismo neuronal y nutrición de las neuronas, colaboran en la neurotransmisión, y se encargan de la regulación de diversos sustratos y precursores para síntesis de citocinas [3][4].

Los astrocitos participan junto con la microglia en actividades fagocíticas, eliminando restos de tejido nervioso en degeneración.

3. **Microglia**. Son células de origen mesodérmico y son las células más pequeñas de la glia. Se distribuyen por todo el SNC y su función es responder como células inflamatorias cuando existe un estímulo traumático o infeccioso sintetizando citocinas [3][4].

La microglia secreta al menos 2 sustancias: el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento nervioso, el cual favorece la maduración de las neuronas y la supervivencia de la glia.

En el SNC los grupos de cuerpos neuronales (con sus dendritas y porciones proximales de sus axones) constituyen la sustancia gris mientras que los grupos de los axones, en su mayor parte mielinizados, conforman la sustancia blanca.

### 1.1.1. La médula espinal

En una sección transversal se puede observar que la médula espinal está compuesta por 2 partes principales: la sustancia gris en forma de H constituida por los cuerpos neuronales, localizada en la parte central de la médula espinal y la sustancia blanca conformada por las fibras nerviosas o axones, los cuales rodean a la sustancia gris. La sustancia gris está constituida por 2 mitades simétricas unidas en la línea media por una conexión transversal (comisura) a través de la cual corre un pequeño conducto central. La columna gris anterior o asta anterior contiene las células que dan origen a las fibras de las raíces ventrales o motoras; la columna lateral contiene células preganglionares del sistema nervioso autónomo y la columna gris posterior o asta posterior recibe las raíces dorsales o sensitivas.



La forma, cantidad y aspecto de la sustancia gris varía a diferentes niveles dividiéndose en 2 componentes: el motor y el receptor. La parte motora comprende las columnas anterior y lateral y da origen a las raíces anteriores que contienen motoneuronas que inervan a la musculatura estriada voluntaria. Las células de la columna lateral dan origen a fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo, torácico y lumbosacro las cuales abandonan la médula espinal con las raíces anteriores [5]. (Figura 3)

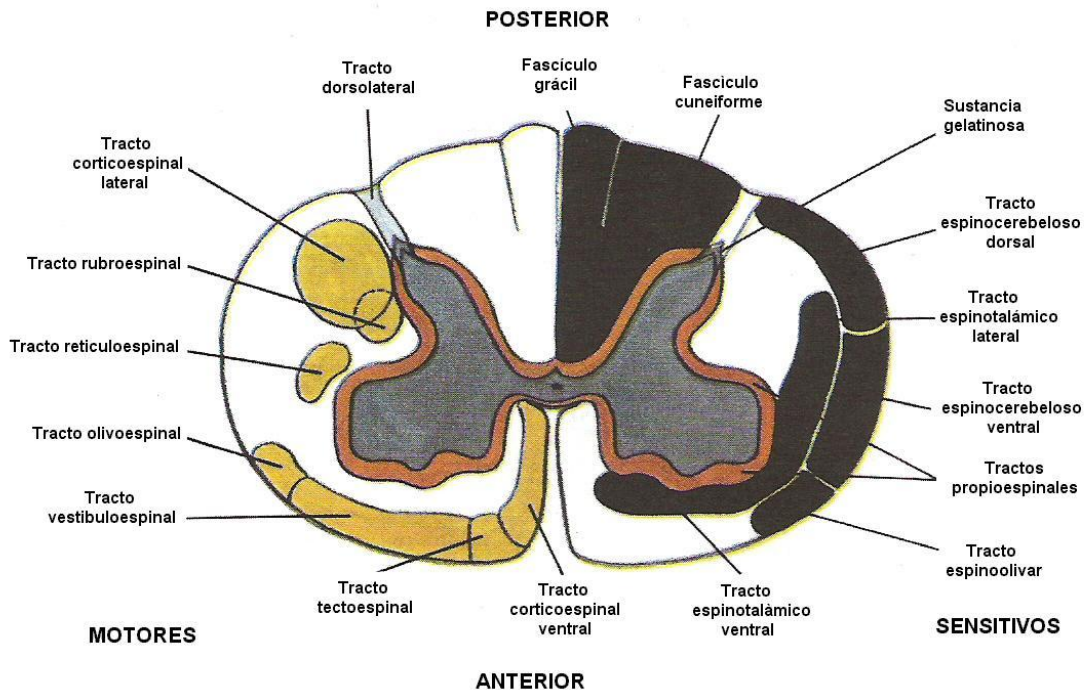


Figura 3. Imagen de corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal

### 1.1.2. Columna vertebral

La columna vertebral, donde se encuentra contenida la médula espinal consta de 33 vértebras: 7 cervicales, 12 dorsales, 5 lumbares, 5 sacras y 4 coccígeas; unidas por ligamentos y cartílagos. (Figura 4). Las ratas tienen 34 vértebras; a diferencia de los humanos estas poseen 13 vértebras dorsales.

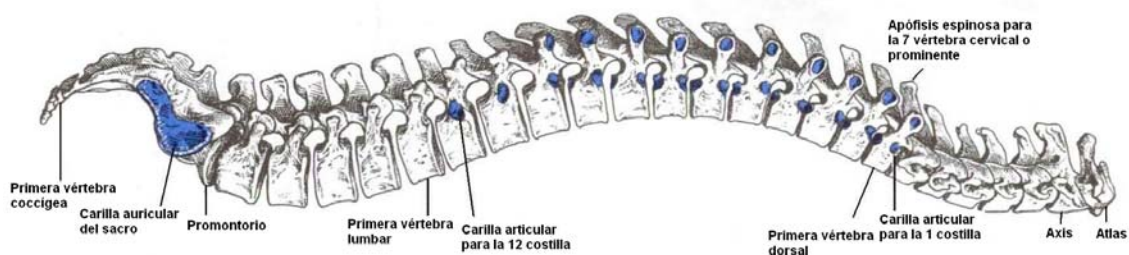


Figura 4. Esquema de la columna vertebral

Las vértebras difieren en tamaño y forma, pero, en general, su estructura es parecida. Vistas desde arriba, constan de un cuerpo del cual salen 2 prolongaciones cortas y gruesas llamadas pediculos dirigidos hacia atrás, uno de cada lado, hasta unirse con las láminas que se unen posteriormente y forman el arco vertebral o neural. Este arco cierra el agujero espinal o vertebral. Cada vértebra tiene 7 apófisis: 4 articulares, 2 para hacer la conexión con el hueso de arriba y 2 para hacerla con la de abajo; 2 transversas; 1 de cada lado donde se unen la lamina, el péndulo y 1 apófisis espinosa.

De las distintas partes que forman las vértebras solo los pediculos carecen de ligamentos. Las laminas están unidas por los ligamentos amarillos los cuales estas separados parcialmente por los vasos que unen los plexos venosos intrarraquideo y extrarraquideo [2]. (Figura 5).

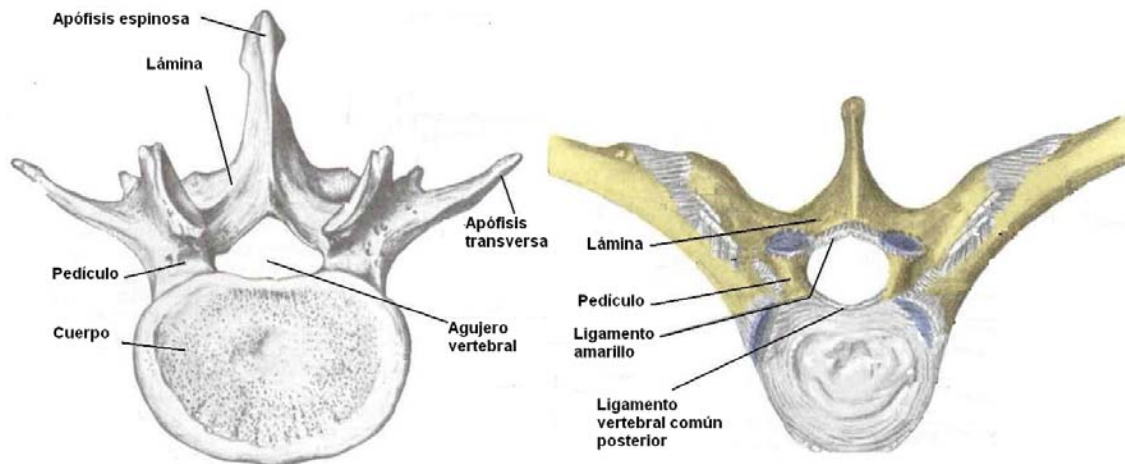


Figura 5. Esquema de las vértebras espinales donde se muestran sus componentes principales.

## 1.2. Fisiología de la médula espinal

### 1.2.1. Potencial de membrana y potencial de acción

La transmisión de señales nerviosas es una de las funciones básicas del SN, estas señales son transmitidas por **potenciales de acción**, que son cambios rápidos en el **potencial de membrana**, que se relaciona con el transporte de iones a través de la membrana celular y por ende con la generación de potenciales eléctricos [6].

En esencia existen potenciales de membrana en todas las células del organismo; algunas, como las células nerviosas y musculares, son capaces de autogenerar impulsos electroquímicos en sus membranas que pueden ser empleados para transmitir señales a lo largo de estas membranas.

### 1.2.2. Membrana celular como capacitor eléctrico

Cargas iónicas positivas y negativas originan el potencial de membrana, aparecen alineadas contra la membrana, en otras partes excepto junto a las superficies de la membrana celular, las cargas negativas y positivas son exactamente iguales lo que se denomina principio de neutralidad eléctrica, o sea que para cada *ion* positivo existe uno negativo en las cercanías para neutralizarlo.

Esto crea una capa bipolar de cargas positivas y negativas entre el exterior y el interior de la membrana, pero, aún sigue habiendo igual número de cargas negativas y positivas en cualquier otro lugar de la membrana. Es el mismo efecto que ocurre cuando las placas de un capacitor eléctrico se cargan eléctricamente; es decir, con cargas negativas y positivas alineadas en lados opuestos de la membrana dieléctrica del capacitor. Por consiguiente, la bicapa lipídica de la membrana celular funciona como un dieléctrico de un capacitor. Todos los iones que quedan dentro de la fibra nerviosa, pueden ser tanto positivos como negativos. Un número pequeño de iones necesita ser transferido a través de la membrana para establecer el potencial normal de  $-90\text{mV}$  en el interior de la fibra nerviosa: solo alrededor de  $1/5'000,000$  a  $1/100'000,000$  del total de cargas positivas en el interior de la fibra deben de ser transferidas así. Además, un número igualmente pequeño de iones positivos que se mueven desde el exterior al interior de la fibra pueden revertir el potencial de  $-90\text{mV}$  hasta  $+35\text{mV}$  en un tiempo de  $0.1\text{ms}$  [6]. (Ver apéndice A)

Las señales nerviosas son transmitidas por potenciales de acción, que son cambios rápidos en el potencial de membrana. Cada potencial de acción comienza con un cambio brusco del potencial de reposo negativo a un potencial de membrana positivo; luego termina con un cambio de casi igual velocidad, de nuevo hacia un potencial negativo. Para conducir una señal nerviosa el potencial de acción se mueve a lo largo de la fibra hasta llegar al extremo de ésta.

En la Figura 6 se muestran los cambios que ocurren en la membrana durante el potencial de acción, con transferencia de cargas positivas al interior de la fibra durante la despolarización y retorno de las cargas positivas al exterior en la repolarización.

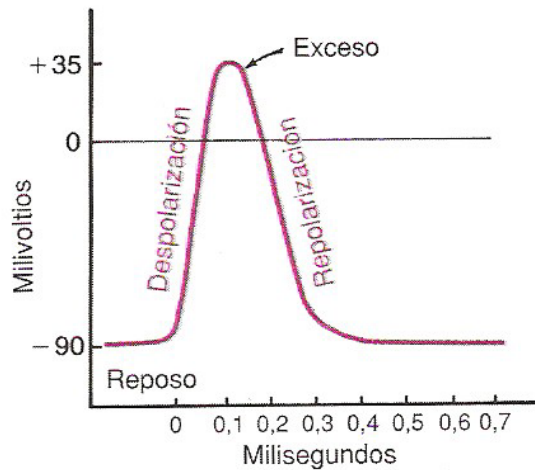


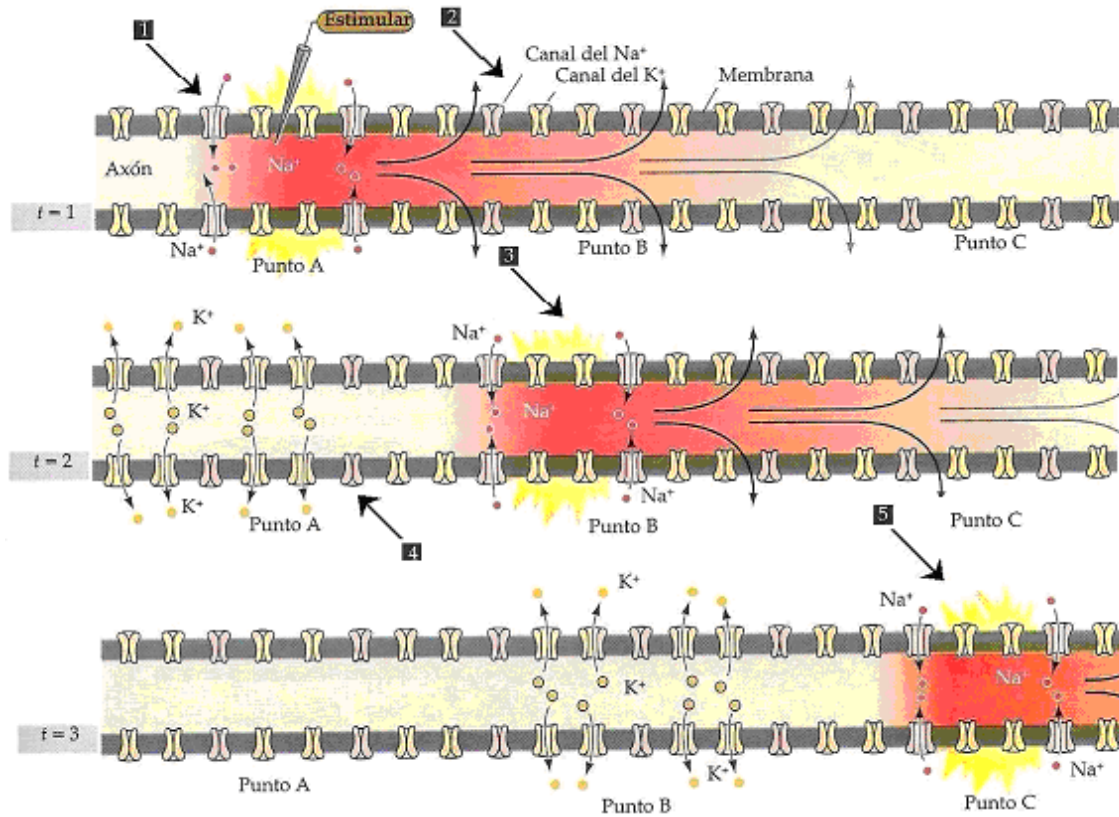
Figura 6. Potencial de acción registrado en un nervio.

En la Figura 7 se muestra el potencial de acción a lo largo del axón.

La propagación del potencial de acción requiere la acción coordinada de dos formas del flujo de carga: una corriente iónica a través de la membrana celular y otra a lo largo del axoplasmal. La corriente de membrana se produce por la apertura de los canales dependientes de voltaje. Una manera de mejorar el flujo pasivo de carga es aumentar el diámetro de un axón, lo cual disminuye la resistencia interna al flujo pasivo de carga con el aumento consiguiente en la velocidad de conducción del potencial de acción [7].

Otra estrategia para mejorar el flujo pasivo de corriente eléctrica es aislar la membrana axónica, lo que reduce la fuga de corriente a través de la membrana, aumentando así la distancia que recorre la corriente interna a lo largo del axón y así puede despolarizar sitios mas alejados como los nodos de Ranvier. Esta estrategia constituye la principal función de la mielinización, proceso por el cual los oligodendrocitos en el SNC y las células de Schwann en el SNP envuelven el axón formando la vaina de mielina [8].

La corriente local en respuesta a la iniciación de un potencial de acción en un sitio particular fluye localmente. Sin embargo, la presencia de mielina impide que la corriente local escape a través de la membrana internodal; por lo tanto, fluye más allá a lo largo del axón de lo que lo haría en ausencia de mielina. Más aún, los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje sólo están presentes en los nodos de Ranvier. Esta disposición indica que la generación de corrientes locales produce potenciales de acción únicamente en las regiones amielinicas como los nodos de Ranvier. El resultado es el aumento de la velocidad de conducción del potencial de acción. (Figura 8)



**Figura 7.** La conducción del potencial de acción requiere flujo pasivo de carga. La despolarización en un punto a lo largo de un axón abre los canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ) localmente (1) y produce un potencial de acción en esta región **A** del axón ( $t=1$ ). La corriente resultante hacia el interior fluye pasivamente a lo largo del axón (2), despolarizando la región adyacente **B** del axón. En un momento posterior ( $t=2$ ), la despolarización de la membrana adyacente ha abierto los canales del  $\text{Na}^+$  en la región **B**, dando como resultado la iniciación del potencial de acción en este sitio y la corriente adicional hacia el interior que de nuevo se propaga en forma pasiva hasta una región adyacente **C** más alejada a lo largo del axón (3). Un momento después ( $t=3$ ), el potencial de acción se propaga aún más lejos. Este ciclo continúa a lo largo de todo el axón (5). A medida que el potencial de acción se propaga el potencial de membrana se repolariza debido a la apertura de los canales de potasio ( $\text{K}^+$ ) y la inactivación de los canales del  $\text{Na}^+$ , dejando un periodo refractario por detrás del potencial de acción que impide la propagación retrógrada (4)

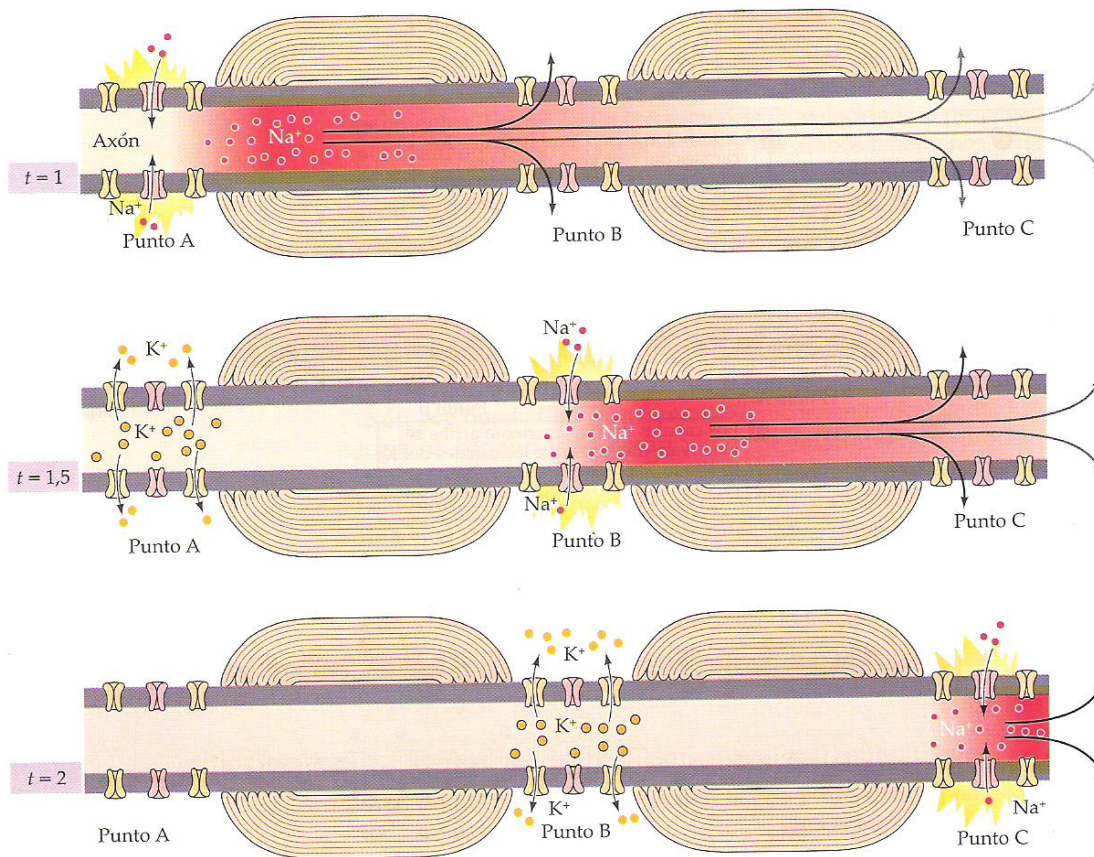


Figura 8. Conducción por saltos del potencial de acción a la largo de un axón mielínico

## 1.3. Epidemiología y fisiopatología de la lesión traumática de la medula espinal

### 1.3.1. Epidemiología

La lesión traumática de médula espinal (LTME) es un problema de salud pública que afecta principalmente a la población económicamente activa. En el Distrito Federal se presentan alrededor de 18.1 casos por millón de habitantes [9], mientras que en los Estados Unidos se estima que existen 40 casos por millón de habitantes, o aproximadamente 11,000 nuevos casos por año sin incluir aquellos que mueren en el accidente [10].

La mayoría de los casos de LTME ocurre en jóvenes adultos de entre los 16 y 38 años de edad, donde el 77.8% son varones [10].

Las principales causas de la LTME son los accidentes automovilísticos (46.9%), las caídas (23.7%), los sucesos violentos (13.7%), y los accidentes deportivos (8.7%) entre otros (7%) [10]. (Figura 9)

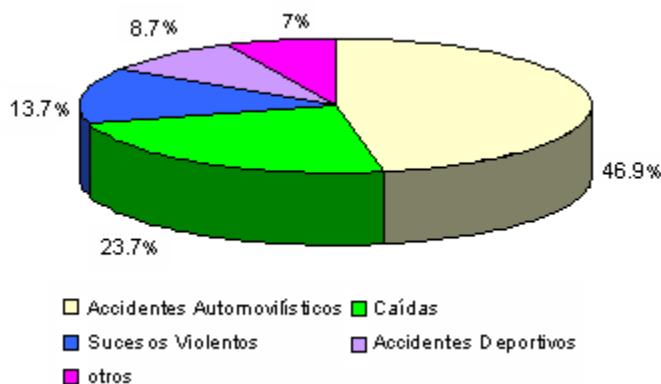


Figura 9. Causas de lesiones traumáticas de médula espinal

### 1.3.2. Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.

Cuando hay una lesión en el SNC ya sea por contusión, compresión, laceración o sección completa se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos denominados mecanismos secundarios de lesión (Ver figura 10). El daño inicial se ubica en el epicentro, induce un proceso de isquemia e inflamación que provoca la muerte neuronal primaria, debido a la presencia de radicales libres de oxígeno. Con el tiempo, la lesión se extiende y se produce la muerte neuronal secundaria, que acaba con más neuronas que en la fase primaria [11].

Son muchos los obstáculos que impiden la regeneración en el SNC debido al proceso de destrucción continuo del tejido nervioso, por la incapacidad para regenerarse espontáneamente y la formación de una cicatriz fibroglial alrededor del sitio de la lesión. La secuencia temporal de los cambios anatomopatológicos después de una LTME (mecanismos secundarios de lesión) se divide en tres fases: aguda, subaguda y crónica ) [11] [12] [13]. (Tabla1 y Figura 10)

#### ■ Fase aguda (minutos, horas, días)

Durante la fase aguda el trauma en la médula espinal destruye la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales inmediatamente, ocasionando una alteración en la microvasculatura de la sustancia gris, induciendo hemorragias petequiales. Las células

sanguíneas y las proteínas del suero invaden el área lesionada, que presenta edema. La destrucción de los capilares causa isquemia, así como anoxia e hipoglucemia. La necrosis así como la degeneración de la mielina de los axones dañados sigue 8-24 horas más tarde y después de 48 horas los fagocitos sanguíneos se acumulan localmente para eliminar la mielina degenerada y otros residuos celulares [14].

Los cambios en el flujo sanguíneo y la hipoperfusión postraumática afecta principalmente a la sustancia gris e induce la muerte neuronal primaria [15]. (Figura 10)

#### ● Fase subaguda (días, semanas)

En la fase subaguda, sobreviene la reactividad de las células gliales como consecuencia de la necrosis, la hemorragia e isquemia local posteriores al trauma medular. El tejido neural (neuronas y glia) cercano al área lesionada o conectado a ella, presenta actividad eléctrica y funcional deprimidas y se forman zonas de penumbra isquémicas en las que tendrá lugar la muerte neuronal secundaria la cual es responsable de la pérdida de la función neuronal [16]

La glía reactiva representa el intento del SN por aislarse de las influencias incontroladas del resto del organismo, reconstituyendo una nueva glía limitante o cicatriz glial y constituye el mayor obstáculo para la restitución de las conexiones lesionadas [17].

Además en esta fase ocurre infiltración de células inflamatorias que invaden la lesión e inducen neurofagia [18] [19] y astrofagia [20] que fagocitan el tejido muerto [21].

#### ● Fase crónica (semanas, meses)

Durante la fase crónica, el proceso degenerativo de la medula espinal continua y se extiende a lo largo del sitio de lesión primaria [14].

Después de la conformación de las zonas de penumbra isquémica en las que se da la muerte neuronal secundaria se forman cavidades y quistes en esta fase. Además las células inflamatorias que fagocitan el tejido nervioso extienden este proceso del epicentro de la lesión hacia la sustancia gris y blanca adyacente [15] las cuales pueden persistir por semanas dentro de las cavidades [22]; al desaparecer las células inflamatorias del área lesionada también contribuyen para dejar una cavidades o quistes, carentes de células, llenas de fluido cerebro espinal rodeadas de glía reactiva [23], dejando a los axones sin protección de mielina [24] causando un déficit neurológico permanente.



**Tabla1.** Fases de la secuencia temporal de los cambios anatomopatológicos después de una LTME.

| <b>Fase aguda<br/>(minutos-días)</b>                   | <b>Fase subaguda<br/>(días-semanas)</b>                 | <b>Fase crónica<br/>(semanas-meses)</b>                            |
|--|---|--|
| Destrucción de la barrera hematoencefalica             | Necrosis  | Perdida del diametro axonal  |
| Destrucción de los vasos sanguíneos locales            | Reactividad de las células gliales                      | Cicatriz glial   |
| Alteración en la microvasculatura de la sustancia gris | Se minimiza la actividad eléctrica del tejido neural    | Fagocitosis  |
| Hemorragias petequiales                                | Se minimiza la actividad funcional del tejido neural    | Incremento de la formación de cavidades y quistes por fagocitosis. |
| Edema  | Formación por cavidades o quistes por reactividad glial | Deficit neurologico permanente                                     |
| Isquemia   | Cicatriz glial  |  |
| Anoxia   | Infiltración de células inflamatorias                   |  |
| Hipoglucemia   | Necrofagia  |  |
| Necrosis y degeneración de la mielina                  | Astrofagia  |  |
| Acumulación de fagocitos                               | Fagocitosis   |  |
| Muerte neuronal primaria                               | Muerte neuronal secundaria                              |  |

A continuación se describen detalladamente los mecanismos secundarios mas importantes después de una lesión de la medula espinal (Ver figura 10) los cuales como antes se menciona son causantes de una gradual degeneración del tejido nervioso [25] imposibilitando la regeneración axonal y recuperación funcional.

Inmediatamente después de la LTME se produce una desregulación iónica, que incrementa la concentración de los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelulares y disminuye la concentración de los iones de potasio ( $\text{K}^+$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ); esto lleva a una despolarización de la membrana neuronal y al acarreo de moléculas de agua asociadas con los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  lo que produce edema [26][27].

La despolarización iónica de las neuronas sobrevivientes genera que los canales de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) dependientes de voltaje se abran, e ingresen grandes cantidades del ión a la célula; activando diferentes enzimas como: proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal [28], endonucleasas que rompen el ADN disparando los procesos apoptóticos o de muerte celular programada [5] y lipasas (principalmente fosfolipasas). Las proteasas y fosfolipasas destruyen los componentes celulares, entre ellos la mielina, con lo cual se favorece el proceso de desmielinización [29] y con ello la falla en la conducción del impulso nervioso.

Las fosfolipasas actúan sobre el ácido araquidónico; el cual a través de la activación de prostaglandinsintasa se metaboliza en sustancias vasoactivas como prostaglandinas (PGs), tromboxanos  $A_2$  ( $TXA_2$ ) y leucotrienos (Lts); las cuales tienen un efecto vasoconstrictor que incrementa la isquemia en la sustancia gris por la falta de oxígeno y glucosa. En este proceso, el oxígeno ( $O_2$ ) es reducido hasta  $H_2O$ . El  $O_2$  acepta electrones ( $e^-$ ) uno a la vez, en un evento secuencial, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) como anión súperoxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^-$ ) además de  $H_2O$ . En condiciones normales la formación de ERO es menor al 5% pero la producción aumenta cuando la concentración de  $Ca^{++}$  aumenta súbitamente en respuesta a un evento excitotóxico [30].

Por esta falla energética el lactato no entra al ciclo de Krebs provocando acidosis láctica, baja producción de adenosintrifosfato (ATP) e incremento en la producción de ERO y por ende peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica es un factor muy importante, porque, el SNC es susceptible al daño producido por ERO; debido a que las membranas celulares del SN son ricas en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, especialmente las vainas de mielina cuya composición lipídica es aproximadamente del 80%, constituyéndose en blanco de las ERO [31].

Por otro lado, el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante que se encuentra en el SNC y juega un papel predominante en la transmisión sináptica del cerebro; se une a tres clases de receptores: los metabotrópicos (mGluR), los activados por el agonista N-Methyl-D-aspartato (NMDA) altamente regulados por más de seis ligandos endógenos (glutamato, glicina, poliaminas,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , e  $H^+$ ) y los activados por el ácido propiónico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA)/kainato (KA) [28].

Después de una LTME las neuronas que mueren vierten su contenido de glutamato al espacio extracelular en grandes cantidades generando un estado excitotóxico, que lleva a una excesiva estimulación de los receptores NMDA y AMPA, y como consecuencia el incremento de las concentraciones de  $Ca^{++}$  intracelular aumentando la peroxidación lipídica [32].

Aunado a lo anterior, después de una LTME se producen hemorragias y por lo tanto liberación de hemoglobina y hierro ( $Fe^{++}$ ), el cual, en presencia de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton genera altas concentraciones de  $OH^-$ , considerado como el más potente oxidante en los sistemas biológicos, por su alta reactividad.

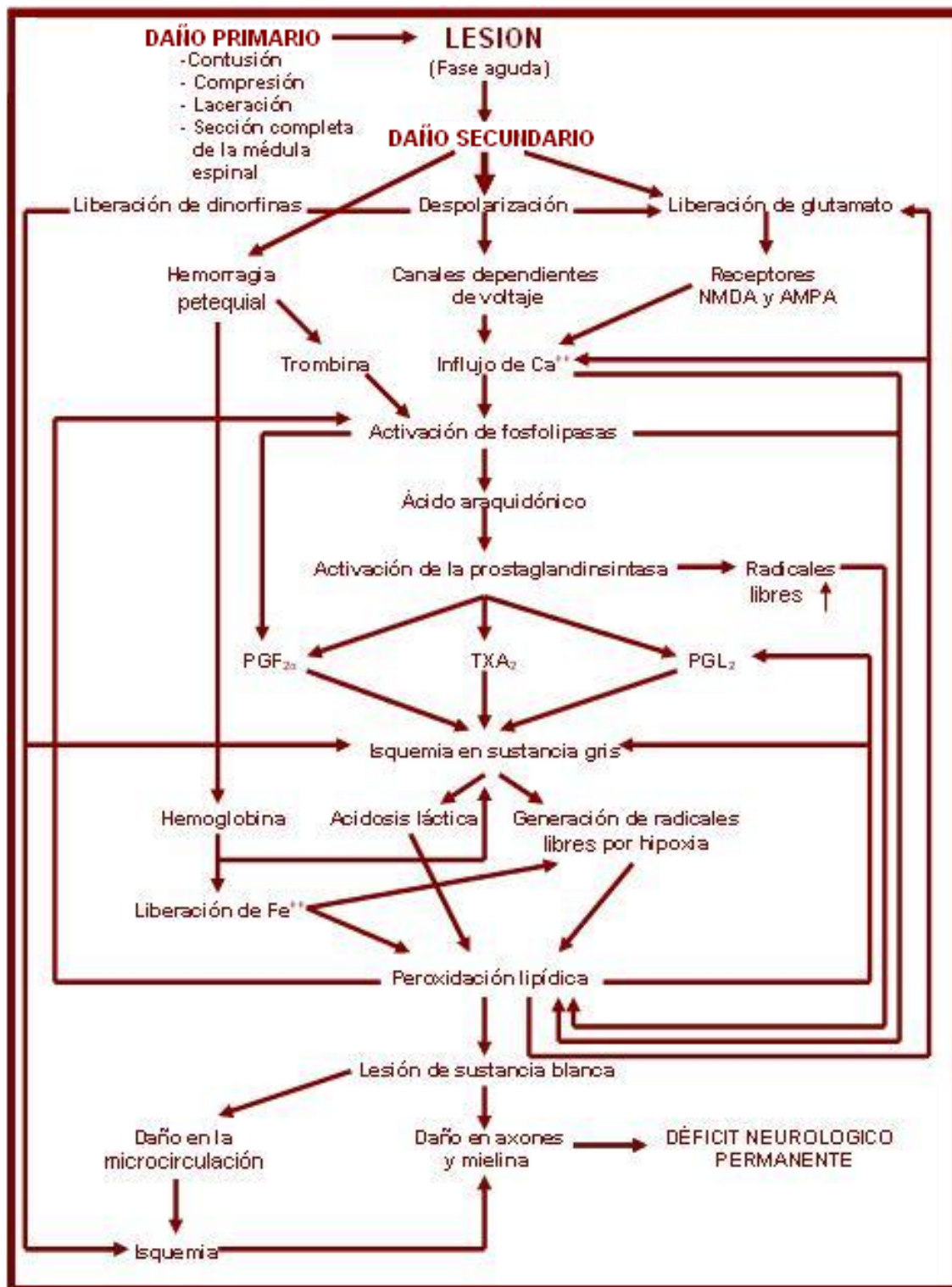


Figura 10. Esquema simplificado de los mecanismos secundarios de lesión.

## 1.4. Estrategias para restablecer la función neurológica.

En la actualidad no se cuenta con algún tratamiento eficaz para restablecer la función neurológica debido a la baja capacidad de regeneración espontánea del SNC y a la dificultad para regular los complejos mecanismos de daño secundario, por lo que se está realizando un arduo trabajo de investigación en este rubro.

Las estrategias terapéuticas existentes hasta el momento se pueden dividir en aquellas encaminadas a proteger a las neuronas sobrevivientes en etapas tempranas posteriores a la LTME (neuroprotección) y en las que tienen por objetivo recuperar las células perdidas (neuroregeneración).

### 1.4.1. Estrategias de neuroprotección

Las estrategias de neuroprotección son aquellas enfocadas a detener y/o evitar los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan después de una LTME. En este contexto, los fármacos son los principalmente empleados para detener el proceso de autodestrucción del SNC. La tabla 2 muestra diferentes tratamientos enfocados a proteger las células neuronales sobrevivientes posterior a una lesión medular.

**Tabla 2.** Tratamientos de neuroprotección posteriores a una Lesión Traumática de Médula Espinal.

| Agente   | Efecto   | Referencia  |
|--|--|---|
| Corticosteroides (metilprednisolona)                               | Antiinflamatorio, reduce la formación de edema, antioxidante, inhibición de la fosfolipasa A <sup>2</sup> . Tratamiento en controversia.                 | Bracken et al., 1998 [33]<br>Pointillart y col./2000 [34] |
| 21-aminosteroide (lazaroides) U-74006F mesilato de tirilazad       | Antioxidante (inhibe la peroxidación). Mantiene los niveles de vitamina E. Previene la disminución del flujo sanguíneo.                                  | Braugher y col.,1998 [35]                                 |
| Antagonistas de receptores opioides (naloxona)                     | En pacientes no tiene efectos benéficos. En modelos animales favorece la recuperación funcional y disminuye la producción de superóxido en la microglia. | Xiao et al.,1998 [36]<br>Chang y col.,2000 [37]           |
| Gangliósidos [monosialotetrahexosilgangliósido (gangliósido GM-1)] | Incrementa la velocidad de crecimiento neurítico. Estimula la regeneración axonal. Atenúa la liberación de aminoácidos excitatorios.                     | Hukuda S y col.,1996 [38]                                 |
| Regulación de los canales de calcio (nimodipina)                   | Bloquea los canales de calcio, reduce la isquemia postraumática. Tratamiento no benéfico.  | Fehlings y col.,1989 [39]<br>Pointillart et al./2000 [34] |

|  |   |   |
|--|---|---|
| Antagonistas de receptores NMDA y no-NMDA [(Dizocilpina (MK-801) NBQX, riluzol)]   | Inhibe la excitotoxicidad originada después de una lesión traumática de médula espinal (LTME)   | Wada y col.,1999 [40]<br>Lang-Landunzki et al.,1999 [41]        |
| Moduladores de la respuesta inflamatoria e inmunosupresores [Naloxona, iloprost, mesilato de gabexate, ciclosporina-A, tacrolimus (FK-506)]                | Disminuye la respuesta inflamatoria. Inhibe la activación de leucocitos. Disminuye la lipoperoxidación. Se incrementa la velocidad de regeneración. | Diaz Ruiz col.,1999 [42] y 2000 [43]<br>Bavetta et al.1999 [43] |
| Antioxidantes (mexilatin, OPC-14117, estobadin de pirudoindol)   | Disminuye la lipoperoxidación. Preserva a las motoneuronas. Previene la oxidación de grupos SH.   | Kaptanoglu y col., 1999 [44]                                    |
| Inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (SON) [N(G)-monometil-L-arginina(L-NMMA)NG-nitro arginina metilester (L-NAME), aminoguanidina, 7-nitroindasol] | Acelera la recuperación motora  | Hu y col.,1999 [45]   |
| Clembuterol  | Agonista de receptores $\beta_2$ -adrenérgicos. Estimula la síntesis de diversos factores tróficos.   | Zeman y col.,1999 [46]  |
| Clometiazol  | Incrementa la actividad de los receptores GABAérgicos, mejor recuperación motora.   | Farooque col.,1999 [47]   |
| Sulfato de magnesio  | Disminuye la lipoxidación. Mejora la transmisión eléctrica somatosensorial.   | Suzer y col.,1999 [48]  |
| 4-aminopiridina  | Inhibe los canales de potasio. Favorece la recuperación neurológica.  | Segal y col.,1999 [49]  |
| Hibernación  | Regula el metabolismo. Mantiene los gradientes iónicos.   | Zhou y col.,2001 [50]   |
| Inhibición del metabolismo energético  | Daño en la función celular. Disminución de excitotoxicidad por el desacoplamiento parcial o transitorio   | Maragos y col., 2004 [51]                                       |

## 1.4.2. Estrategias para favorecer la regeneración nerviosa

Cuando los métodos de neuroprotección no son lo suficientemente efectivos se recurre a las estrategias para favorecer la regeneración nerviosa. A continuación y en la tabla 3 se muestran las diferentes técnicas empleadas para recuperar las células neuronales perdidas después de una lesión de la médula espinal.

Los biomateriales actualmente utilizados como estrategia para favorecer la regeneración nerviosa incluyen la ingeniería de tejidos y la liberación de drogas para reparar el daño medular. En este contexto los polímeros se han empleado como canales, guía o vehículos de liberación; además se han usado como estrategia de neuroregeneración y neuroregeneración [52] [53] [54].

Para la regeneración de la médula espinal es importante la regeneración de los axones para reparar el daño medular [52] para lo cual; se ha hecho uso de:

a) Biomateriales degradables:

- Colágeno: los implantes de colágeno en modelos de LPSCME han demostrado vascularización en el implante, inducción del recrecimiento de pocos axones mielinizados [55] [56] y recuperación funcional. Sin embargo, la muerte de los animales a las 12 semanas después de la colocación del implante fue del mas del 40%, lo cual sugiere la posibilidad de citotoxicidad [57].
- Fibronectina: A pesar de que la fibronectina contiene factores neurotróficos (proteínas con múltiples funciones que permiten la supervivencia neuronal, proliferación, migración y diferenciación, crecimiento axonal y plasticidad sináptica), los implantes de esta no han estimulado el crecimiento axonal en lesiones medulares, por lo tanto; el uso de esta estrategia no es prometedor en LTME [58].
- Agarosa. Las esponjas o geles de agarosa han demostrado actuar como guía en axones amputados y han reducido la producción de astrocitos [59] [60]. Sin embargo, uno de lo mayores problemas con la agarosa comercial son las impurezas mitogenicas (mitogenic) y citotóxicas, por lo que requiere de un proceso de ultra purificación antes de su uso [61].
- Acido Hialuronico. Los trasplantes de cultivos embrionicos (embrionarios) de tejido de la medula espinal fijados en acido hialuronico han mostrado una ligera recuperación funcional en modelos de LPCME [62].
- Polietilenglicol (PEG). Los implantes de PEG han demostrado propiedades de neuroprotección caracterizada por detener el daño en la membrana celular, por la supresión del estrés oxidativo [63] y una ligera recuperación funcional después de una lesión medular [53] [54] [64] [65].

b) Biomateriales no degradables.

- Poly (2-hidroxietil metacrilato) o poli (2- hidroxietil metacrilato-co- metil metacrilato) (PHEMA/PHEMA-MMA). Los implantes del hidrogel PHEMA-MMA en combinación con diferentes neurotrofinas (neurotrofin-3 o FGF-1) y matrices (fibrina, colágeno o metil celulosa) en lesiones completa de la médula espinal han demostrado mejoría en la regeneración axonal en modelos de LPSCME [66].

- Poly/ [N-(2-hidroxipropil) metacrilamida] (PHPMA). El tratamiento con implantes del hidrogel PHPMA han demostrado inducción en la mielinización de axones caracterizada por la migración de células de Schwann en el sitio de lesión, reducción de astrocitos y crecimiento axonal [67] [68].

No obstante la amplia gama de posibilidades terapéuticas diseñadas para promover el proceso de neuroregeneración después de una LTME, los resultados hasta el momento no han sido del todo satisfactorios, por lo que en la actualidad se continúan haciendo propuestas con diferentes tipos celulares con modificaciones genéticas específicas, empleando células precursoras o más aún, otro tipo de materiales como los polímeros semiconductores sintetizados por plasma, con los que se han obtenido respuestas neuroregeneradoras importantes pero parciales [78] [79] por lo que la mejor opción terapéutica podría ser el uso de estrategias combinadas. Dadas sus características particulares, una opción interesante, que hasta la fecha no ha sido explorada, podría ser el empleo de polímeros semiconductores sintetizados por plasma y la aplicación de EMBF.

**Tabla 3.** Tratamientos para favorecer el proceso de neuroregeneración posteriores a una Lesión Traumática de la Médula Espinal

| Tratamiento   | Efecto   | Referencia   |
|---|--|--|
| Transplante de células gliales:<br>a) Oligodendrocitos<br>b) Astrocitos<br>c) Microglia               | a) Favorecen la remielinización axonal. Expresan moléculas inhibitorias afectando la regeneración axonal.<br>b) Incrementa la remielinización y se reduce la formación de cicatriz glial en la zona de lesión.<br>El transplante de astrocitos inmaduros estimula la regeneración.<br>c) Producción y secreción de moléculas citotóxicas que incrementan el daño medular y secreción de citocinas benéficas y factores de crecimiento. | Tessier-Lavigne y col., 2000 [69]<br>Jeffery et al., 1999 [70]<br>Robchevsky y col., 1998 [71] |
| Transplante de células embrionarias de los núcleos del Rafe   | Regulan la función gabaérgica manteniendo los niveles normales del neurotransmisor.  | Dumouli y col., 2000 [72]  |
| Transplante de neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas derivadas del tallo cerebral de embriones. | Reinervación y sinapsis  | Gimenez y col., 1998 [73]  |
| Tejido fetal de médula espinal  | Crecimiento axonal tanto en la interfase rostral como en la caudal.  | Bamber y col., 2000 [74]   |
| Transplante de nervio periférico  | Remielinización axonal y regeneración de la medula espinal.  | Salgado-Ceballos y col., 1998 [75]<br>Menei y col., 1998 [76]                                  |
| Células progenitoras multipotenciales (stem cells)  | Las células transplantadas migran alrededor de la lesión y se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.<br>Recuperación funcional  | McDonal y col., 1999 [77]  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| Fibroblastos modificados genéticamente        | Proliferación de oligodendrocitos<br>Remielinización axonal                          | McTigue y col.,1998 [78]                                 |
| 4-Aminopiridina                               | Favorece la conducción de los impulsos nerviosos en los axones sobrevivientes        | Grijalva y col.,2003 [79]                                |
| Implantes poliméricos sintetizados por plasma | Favorecen la protección del tejido nervioso.<br>Favorecen la recuperación funcional. | Olayo R y col.,2007 [53]<br>Alvarez AL y col., 2004 [54] |
| Campos magnéticos                             | Favorecen la recuperación motora   | Poirrier AL y col.,2004 [80]                             |

## 1.5. Polímeros semiconductores y síntesis.

Los polímeros semiconductores son aquellos materiales orgánicos formados por largas cadenas de hidrocarburos con dobles enlaces alternos o conjugados que permiten el paso de un flujo de electrones; tienen propiedades similares a las de los plásticos, metales y/o semiconductores, reemplazado a una gran cantidad de materiales en un sin número de aplicaciones tecnológicas que involucran el transporte de cargas eléctricas.

### 1.5.1. Polímeros semiconductores

Los polímeros semiconductores fueron descubiertos por accidente a principios de la década de los años 70, por Hideki Shirakawa estudiante del Instituto Tecnológico de Tokio, confundió las cantidades requeridas en la fórmula para obtener poliacetileno y añadió mil veces más catalizador que el requerido. El producto que obtuvo fue una película lustrosa con apariencia de aluminio y al mismo tiempo plegadiza como plástico para envoltura; dicho producto presentaba, además, una conductividad inusualmente elevada. En el año 2000 Shirakawa, Heeger y MacDiarmid, fueron distinguidos con el premio Nobel de química por dopar el poliacetileno con vapor de yodo aumentando su conductividad en  $10^8$  de veces [81].

Este aumento en la conductividad se debe principalmente a una técnica denominada **dopado** la cual consiste en agregar átomos con estructura y propiedades diferentes [82].

Aunque no se conozcan aún con precisión los mecanismos físicos que convierten los polímeros en semiconductores, la pureza y la organización de las cadenas poliméricas parecen tener mucha importancia [82]. Sin embargo, se conocen algunos factores que afectan la conductividad: la organización estructural del polímero, el porcentaje de dopado, la asimetría del polímero, etc.



Los metales y los semiconductores inorgánicos son diferentes a los polímeros semiconductores debido a que estos provienen de un conjunto de átomos más o menos ordenado en tres dimensiones. En cambio, los polímeros semiconductores son moléculas cuya disposición atómica no puede cambiar sin que la molécula altere profundamente sus propiedades. De hecho, las aplicaciones tecnológicas de estos materiales se basan en propiedades derivadas y no en la conductividad intrínseca, que aun hoy es menor que la de los metales. En ello se cumple una regla permanente de la tecnología de materiales según la cual no existen reemplazos de materiales sino un rediseño de la dupla material-sistema. Otro factor que diferencia a los polímeros semiconductores de los materiales inorgánicos es que están constituidos por carbono, con pocos elementos adicionales (Nitrógeno, Oxígeno, Hidrógeno, Azufre). Como consecuencia de ello, su disponibilidad en la Tierra es casi infinita ya que pueden fabricarse a partir de petróleo, gas, carbón o biomasa. Los metales y semiconductores, con pocas excepciones son materiales escasos y cuya disponibilidad es finita. Además, muchos metales y semiconductores son tóxicos y/o provocan daños ambientales. Por el contrario, los polímeros semiconductores son degradables. Por otra parte, la cantidad de materiales diferentes que pueden producirse a partir de metales y semiconductores inorgánicos esta determinada por la suma de los materiales puros y sus aleaciones. Esta es necesariamente limitada. Contrariamente, la cantidad de compuestos orgánicos diferentes que se pueden sintetizar es técnicamente infinita. En la Tabla 4 se muestra una comparación de las propiedades de materiales inorgánicos (metales, semiconductores) y polímeros semiconductores [83].

**Tabla 4.** Comparación entre las propiedades de los materiales electrónicos inorgánicos y los polímeros conjugados.

| <b>Propiedad</b>     | <b>Material inorgánico<br/>(metales y semiconductores)</b> | <b>Polímeros conjugados<br/>(polímeros semiconductores)</b> |
|----------------------|--|---|
| Conductividad        | Alta   | Baja  |
| Estructura           | Atómica  | Molecular   |
| Resistencia térmica  | Buena  | Pobre   |
| Resistencia química  | Buena  | Pobre   |
| Procesabilidad       | Mala   | Buena   |
| Efectos cuánticos    | Grandes  | Inexistentes  |
| Límites nanométricos | Existen  | No existen  |
| Diversidad           | Limitada   | Infinita  |
| Disponibilidad       | Limitada   | Infinita  |

La Figura 11 muestra un grafico comparativo de las conductividades de diversos materiales, incluyendo polímeros semiconductores. Como se observa, las más altas conductividades de polímeros semiconductores (ca. 10.000 S/cm) son similares a las del aluminio. Sin embargo, estas conductividades se han medido en materiales muy puros y de poca estabilidad química (poliacetileno). Los valores para polímeros estables en condiciones normales son menores (< 1000 S/cm). Esto indica que no se verán cables poliméricos en un futuro cercano. Sin embargo, cuando las dimensiones del conductor son muy pequeñas o se debe compatibilizar el material conductor con una matriz no conductora, estos materiales pueden ser usados [83].

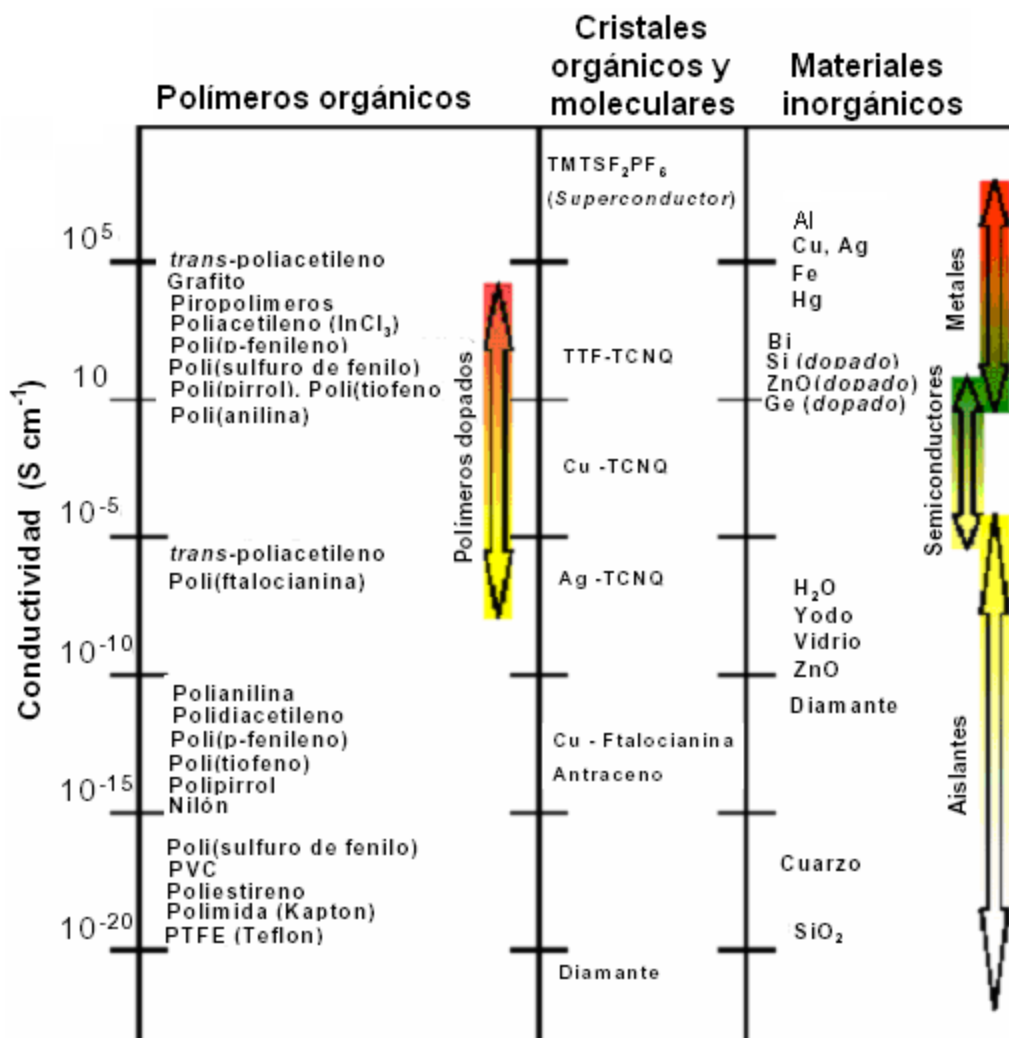


Figura 11. Grafico comparativo de conductividades de diferentes materiales.

Los polímeros semiconductores y los polímeros presentan algunas semejanzas estructurales, ambos se basan en procesos moleculares por lo cual el tamaño de las moléculas es importante; sin embargo, sus propiedades pueden ser muy diferentes, varían con el tipo de monómero, al acomodo de los átomos que constituyen las moléculas y al método de síntesis del monómero orgánico.

## **1.5.2. Métodos de síntesis de polímeros semiconductores.**

Los polímeros semiconductores nos ofrecen múltiples ventajas debido a las formas en las cuales las cargas eléctricas se pueden mover a través de la estructura del material global o localmente y a la variedad de métodos en que pueden ser sintetizados [84] [85].

### **1.5.2.1. Método químico**

El método químico para la síntesis y dopado de polímeros semiconductores, consiste de una solución de un monómero que es oxidado con una molécula cuyo potencial corresponde al potencial de oxidación del monómero, formando un precipitado de polímero semiconductor. La presencia de otras sales mejora las propiedades del polímero al favorecer su oxidación reversible.

### **1.5.2.2. Método electroquímico**

El método electroquímico es análogo a la oxidación química; se genera una película de polímero semiconductor sobre un substrato metálico en una celda electroquímica que contiene el monómero, el solvente y la molécula dopante, la polimerización ocurre por oxidación a través de una corriente eléctrica. La vía electroquímica permite controlar los parámetros de síntesis (corriente eléctrica, concentraciones, electrodos, temperatura, etc) por lo que es posible obtener polímeros con propiedades altamente reproducibles.

### **1.5.2.3. Método de polimerización por plasma**

La polimerización por plasma es método que consiste en la formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado (*plasma*) [86]. El plasma se puede obtener de una señal de radiofrecuencia, por microondas, láser, etc.

## 1.6. Polimerización por plasma

El plasma se compone de toda una serie de partículas altamente reactivas: iones,  $e^-$ , fotones, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras [86][87].

El proceso de polimerización por plasma se lleva a cabo bajo condiciones de vacío en una cámara de reacción donde se introducen los reactivos (monómero y dopante) en estado gaseoso y se ionizan por la influencia de un campo magnético generado por la diferencia de potencial entre dos electrodos. El polímero se forma a partir de las partículas de los reactivos activadas por el plasma. Las partículas ionizadas al interactuar con la superficie de un sustrato la recubren depositando una película delgada de material. Figura 12.



Figura 12. Esquema del proceso de polimerización por plasma.

La polimerización por plasma no requiere de intermediarios químicos para que ocurra la oxidación. La oxidación es promovida por el impacto de los  $e^-$  libres que se encuentran a lo largo del campo eléctrico que colisionan con las moléculas del monómero [88].

### 1.6.1. Ventajas de la polimerización por plasma

- La polimerización por plasma comienza su reacción en fase gaseosa, por lo que no necesita de agentes externos para que ocurra la polimerización [88].
- La generación de especies reactivas es promovida por el impacto de los electrones libres y las moléculas del monómero [88].

- Al sintetizarse el polímero ocurre ramificación y entrecruzamiento con otras cadenas modificando las propiedades químicas y físicas de los materiales [88].
- El polímero se deposita sobre cualquier superficie expuesta al plasma y recubriéndola en su totalidad.
- Debido a que los materiales sintetizados por plasma son sometidos a energías electromagnéticas, bajas presiones y a altas temperaturas electrónicas tanto el material como la superficie expuesta al plasma se esterilizan.
- El espesor de la película y la cantidad de material depositado se controla con el tiempo de reacción
- Las materiales creados y/o tratados por plasma ofrecen atractivas posibilidades en el desarrollo de nuevos biomateriales, y mejoran la multifuncionalidad de dispositivos ya existentes [89][90].
- Los biomateriales sintetizados y/o tratados por plasma son reproducibles, con un tiempo de vida razonable, económicos, etc.

## 1.7. Polímeros semiconductores en aplicaciones biomédicas

Los materiales sintéticos o naturales usados en aplicaciones biomédicas y destinados a interactuar con sistemas biológicos se conocen como **biomateriales**, los cuales han sido exhaustivamente investigados por grupos académicos y por la industria, generando un gran interés para la ciencia [91].

Los biomateriales se implantan con el objetivo de reemplazar y/o restaurar tejidos y sus funciones, lo que implica que están expuestos temporal o permanentemente a fluidos del cuerpo, por lo cual, el éxito de un biomaterial depende de 3 factores principales: 1) **biocompatibilidad**, es decir, que la interfase implante-tejido biológico no sea toxica, que no produzca efectos nocivos como: respuesta inflamatoria crónica y reacción a cuerpos extraños, 2) que efectúe todas la funciones para las que ha sido diseñado y 3) que tenga un tiempo de vida razonable. Por lo tanto, es muy importante diseñar materiales (naturales o sintéticos) con propiedades y características específicas que funcionen adecuadamente en el medio biológico que los rodea; sin embargo su obtención es difícil.

El plasma nos ofrece un método efectivo para la generación de nuevos biomateriales y/o el mejoramiento de los ya existentes [92] [93] (Tabla 4 ). El tratamiento por plasma puede modificar las características de las superficies; los cambios pueden ser químicos, eléctricos, ópticos, biológicos, mecánicos, etc; permitiendo el uso de estos en diferentes áreas de investigación [60]. (Tabla 5)

**Tabla 5.** Diferentes implantes médicos generados y/o tratados por plasma

| <b>Implantes médicos usados en los Estados Unidos</b>         |                               |
|---|-------------------------------|
| <b>Aplicación</b>   | <b>Cantidad usada por año</b> |
| Prótesis vasculares   | 75,000                        |
| Recubrimiento compatible con la sangre                        | 30'455,000                    |
| Lentes intraoculares  | 2'700,000                     |
| Lentes de contacto  | 30,000,000                    |
| Bases para cultivos celulares                                 | No especificado               |
| Electrodos  | No especificado               |
| Oxigenadores de sangre  | No especificado               |
| Hemoperfusión   | No especificado               |
| Catéteres   | 200'000,000                   |
| Modelos superficiales para exploración de sistemas biológicos | No especificado               |
| Injertos vasculares   | 250,000                       |
| Prótesis de cadera y rodilla                                  | 500,000                       |
| Válvulas cardíacas  | 80,000                        |
| Stents cardiovasculares                                       | >1,000,000                    |
| Implantes de pecho  | 192,000                       |
| Implantes dentales  | 300,000                       |
| Marcapasos  | 130,000                       |
| Diálisis Renales  | 16,000,000                    |
| Dispositivos de asistencia ventricular izquierda              | >100,000                      |

**Tabla 6.** Áreas de investigación y aplicación de biomateriales tratados con plasma

| <b>Área de investigación</b>                       | <b>Aplicación de biomateriales tratados con plasma.</b>  |
|--|--|
| Superficies compatibles con sangré                 | Injertos vasculares, catéteres, stents, válvulas, membranas (p.e. para hemodiálisis), filtros (p.e. para separar células sanguíneas), inmovilización de biomoléculas en superficies.   |
| Superficies no contaminantes                       | Intraoculares, lentes de contacto, curación de heridas, catéteres, biosensores, etc  |
| Ingeniería de tejidos y cultivos celulares         | El crecimiento de células, producción de anticuerpos, injertos vasculares, etc.  |
| Esterilización de equipo quirúrgico y dispositivos | Equipo de cirugía con filo, pinzas, etc  |
| Biosensores  | Inmovilizar moléculas en superficies   |
| Dispositivos aislantes y/o intercambio             | Liberación de drogas, membranas de intercambio gaseoso, dispositivos de protección, protección de corrosión, reducción de filtrado (p.e. aditivos, catalizadores, plastificantes, etc) |

## 1.8. Campos magnéticos

En las últimas décadas se ha estudiado la influencia de los campos magnéticos (CM's) en tejidos vivos y en la salud de los organismos, puesto que los CM's forman parte inevitable de nuestra vida cotidiana.

La utilización de CM's tiene la ventaja de que es un procedimiento no invasivo y permite ver los efectos que tienen estos, sobre los sistemas biológicos sin que se le atribuya a otros factores no relacionados a dichos campos.

Los efectos generados por los CM's en los sistemas biológicos dependen de la intensidad del campo, del tiempo de exposición y de la radiación electromagnética aplicada.

### 1.8.1. Espectro de radiación electromagnética

El espectro de radiación electromagnética (Figura 13) comprende, en función de la longitud de onda o de la frecuencia: 1) las radiaciones ionizantes (frecuencias comprendidas entre  $10^{17}$  y  $10^{22}$ Hz) y 2) las radiaciones no-ionizantes (frecuencias 1 a  $10^{17}$ Hz). Esta radiación no-ionizante, por su parte se subdivide en radiaciones ópticas (frecuencias de  $10^{12}$  y  $10^{17}$ Hz) y los llamados campos electromagnéticos (CEM's) (frecuencias de 1 a  $10^{12}$ Hz) [94].

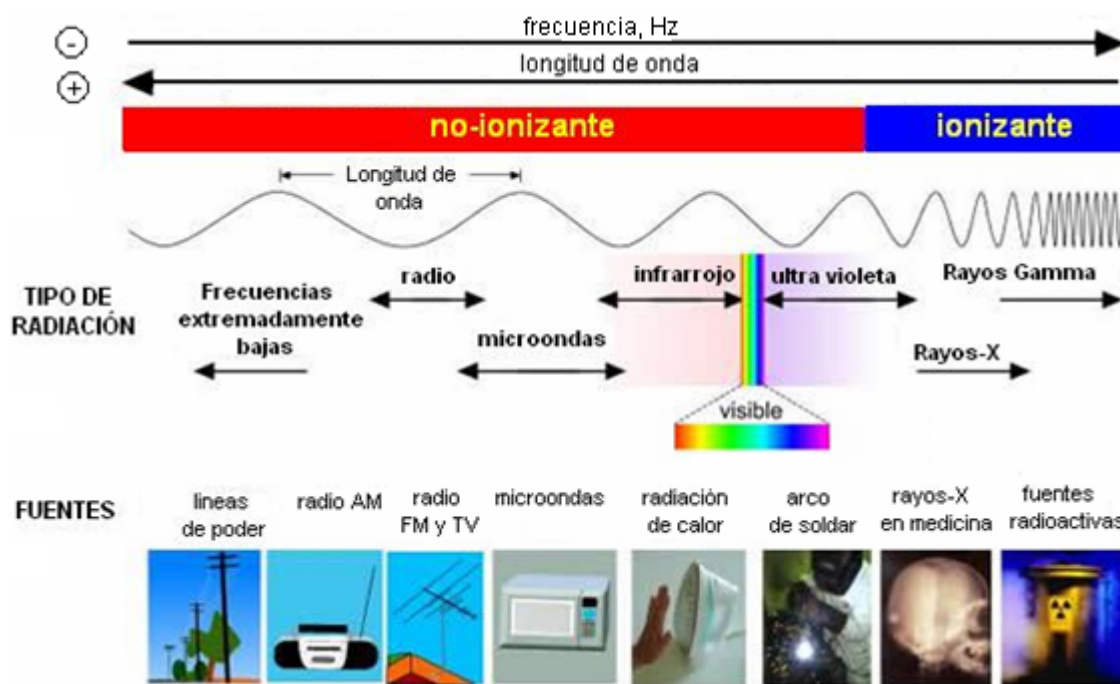


Figura 13. Espectro de radiación electromagnética

La necesidad por saber los efectos generados por las radiaciones no-ionizantes del tipo campo electromagnético (CEM) da lugar a la ciencia denominada bioelectromagnetismo, la cual valora, estudia y profundiza sobre el impacto que tienen estos campos en los seres biológicos.

### 1.8.2. Bioelectromagnetismo

El bioelectromagnetismo es una ciencia interdisciplinaria de moderna aceptación. Etimológicamente esta comprendida dentro de las ciencias biológicas, con grandes aplicaciones en medicina y otras ciencias experimentales [94].

La principal actividad del bioelectromagnetismo, se dirige a realizar investigaciones de carácter básico, sobre los efectos que la estimulación magnética de baja frecuencia (EMBF) tiene sobre determinados tejidos. En el presente trabajo estudiamos el efecto que tienen la EMBF sobre el tejido medular de ratas.

### 1.8.3. Campo Electromagnético

Las ecuaciones de Maxwell describen los fenómenos electromagnéticos. Maxwell reunió en estas ecuaciones las leyes de electricidad y magnetismo, debidas a Gauss, Ampere y Faraday, unificando el campo eléctrico  $\vec{E}$  y magnético  $\vec{B}$  en un solo concepto: el CEM.

La ley de Gauss señala que el flujo eléctrico  $\vec{E} \cdot d\vec{A}$  a través de una superficie cerrada  $S$  que rodea a una carga neta  $Q$  es proporcional a la carga. En otras palabras, el número de líneas de campo eléctrico que salen de la superficie depende sólo de la carga neta dentro de ella. Esta propiedad se basa solo en el hecho de que las líneas de campo eléctrico se originan y terminan en cargas eléctricas.

$$\oint_S \vec{E} \cdot d\vec{A} = \frac{Q}{\epsilon_0}$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad eléctrica del espacio libre.

La situación es diferente para los campos magnéticos, los cuales son continuos y forman circuitos cerrados. En otras palabras las líneas de campo magnético no comienzan o terminan en cualquier punto. Además el número de líneas que entran en una superficie es igual al número que sale de la misma, por lo que el flujo magnético neto es cero.



En base a lo anterior, la ley de Gauss del magnetismo establece que el flujo magnético  $\vec{B} \cdot d\vec{A}$  neto a través de cualquier superficie  $S$  cerrada es siempre cero.

$$\oint_S \vec{B} \cdot d\vec{A} = 0$$

Si bien, las leyes de Gauss describen por separado a los campos magnéticos y eléctricos. Las leyes de Ampere y Faraday nos muestran la interacción que tienen estos campos entre si.

Para calcular los campos magnéticos generados por cargas en movimiento se puede utilizar la ley de Ampere, la cual establece que la integral de línea del campo magnético  $\vec{B} \cdot d\vec{s}$  alrededor de cualquier trayectoria cerrada es igual a  $\mu_0 I$ :

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 I$$

donde  $I$  es la corriente estable total que pasa por cualquier superficie delimitada por la trayectoria cerrada y  $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$  T.m/A es la permeabilidad del espacio libre.

Sin embargo esta ley sólo es válida si el campo eléctrico es constante en el tiempo. Para esto Maxwell modificó la ley de Ampere, para incluir campos eléctricos que varían en el tiempo y se denomina ley de Ampere-Maxwell.

La llamada Ley de Ampere-Maxwell, es la forma generalizada de la ley de Ampere, la cual describe la creación de un campo magnético por campos y corriente eléctricas: la integral de línea del campo magnético  $\vec{B}$  alrededor de cualquier trayectoria cerrada es la suma de  $\mu_0$  por la corriente neta a través de esa trayectoria, y  $\epsilon_0 \mu_0$  por la rapidez de cambio del flujo eléctrico  $\Phi_E$  a través de cualquier superficie delimitada por esa trayectoria.

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 I + \mu_0 \epsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt}$$

Esta ley describe el hecho de que los campos magnéticos son producidos tanto por corrientes de conducción como por campos eléctricos variables.

La ley de inducción de Faraday, la cual describe la creación de un campo eléctrico por un flujo magnético variable. Esta ley establece que la fuerza electromotriz (fem), que es la integral de línea del campo eléctrico  $\vec{E}$  alrededor de cualquier trayectoria cerrada, es igual a la rapidez de cambio del flujo magnético  $\Phi_B$  a través

de cualquier área de la superficie delimitada por esa trayectoria. Una consecuencia de la ley de Faraday es la corriente inducida en una espira conductora situada en un campo magnético que cambia en el tiempo.

$$\oint \vec{E} \cdot d\vec{s} = -\frac{d\Phi_B}{dt}$$

### 1.8.3.1. Ondas electromagnéticas

A excepción de la gravedad, todas las manifestaciones de la vida sobre el planeta tienen su origen en la fuerza electromagnética (electricidad y magnetismo). Como extensión de la materia donde se manifiestan estas fuerzas están los campos eléctricos y magnéticos. Un campo magnético variable genera un campo eléctrico asimismo variable, según la ley de inducción electromagnética de Faraday. Del mismo modo, un campo eléctrico variable da lugar a un campo magnético variable como consecuencia de la ley de Ampere-Maxwell. En ambos casos, los campos correspondientes generados se relacionan con el campo promotor a través del flujo de campo. Estos campos son interdependientes, de tal forma que se suele hablar del CEM único. Las variaciones de campo que se producen en un punto del espacio se transmiten a todo él en forma de onda electromagnética que se propagan por el espacio a la velocidad de la luz en el vacío  $c$  ( $c = 1/\sqrt{\mu_0 \epsilon_0} = 3.00 \times 10^8 \text{ m/s}$ ).

Los CEM's producidos en el organismo humano poseen diversos aspectos de aplicación y son la base del bioelectromagnetismo médico. Se puede afirmar que en el mundo físico esta compuesto de dos entes básicos: objetos materiales (cuerpos sólidos, líquidos y gaseosos) y ondas. Hablando en términos generales, una onda es energía pura en movimiento [94].

Una onda electromagnética es un tipo de radiación en forma de onda que se caracteriza por poseer dos campos: un campo eléctrico y otro magnético, oscilando perpendicularmente entre si.

A diferencias de otras ondas (sonido, sísmicas, etc) las ondas electromagnéticas no necesitan un medio para propagarse, pudiendo correr libremente por el vacío. Las radiaciones electromagnéticas son entes que viajan por el espacio creando un campo eléctrico oscilante asociado a un campo magnético también oscilante. Estas constituyen el también llamado espectro de radiación electromagnética (Figura 13).

### 1.8.4. Interacción del campo magnético con los sistemas biológicos

Cuando un campo electromagnético interactúa con un tejido, una parte de la onda electromagnética es reflejada, una parte absorbida y una parte transmitida. Estas fracciones de energía dependen de la frecuencia del campo electromagnético, de la geometría del objeto biológico, de su permeabilidad eléctrica  $\epsilon$ , de la conductividad eléctrica  $\delta$  y de la permeabilidad magnética  $\mu$  [94].

La  $\epsilon$  y la  $\delta$  de un tejido varían con la frecuencia del CEM aplicado:  $\delta$  aumenta al aumentar la frecuencia mientras que  $\epsilon$  disminuye. Para los tejidos de contenido lipídico la  $\delta$  y  $\epsilon$  son más bajos por el menor contenido de agua y de iones [94].

El fenómeno más importante que sucede en un tejido biológico expuesto a un CEM es que surgen en él corrientes alternas (efectos magnetoeléctricos). A baja frecuencia ( $\nu < 500\text{Hz}$ ) la membrana celular actúa como aislante y las corrientes inducidas por la exposición al CEM pasan al líquido extracelular, esto explica la baja  $\delta$  de los tejidos cuando son sometidos a EMBF. El aumento de la  $\delta$  cuando aumenta la frecuencia se debe a una disminución de la resistencia en la membrana celular, como consecuencia de cambios estructurales por la acción del CEM, este hecho lleva a una implicación del líquido intracelular en la  $\delta$  total del tejido [94].

### 1.8.5. Dosimetría

Una de las cuestiones más delicadas a la hora de valorar los efectos biológicos de los CEM tiene que ver con la definición de dosis.

En términos fisiológicos, una dosis es la cantidad de un agente o producto que se recibe en un tiempo determinado. Esto, está perfectamente definido para los fármacos, pero para los campos magnéticos (CM's) no es tan fácil; ya que no se conoce con certeza que aspecto del campo magnético (CM) produce un efecto sobre la salud de un ser vivo. En realidad no se sabe que es lo que puede ser fundamental: si es el nivel medio de exposición diario, si solo son importantes las exposiciones por encima de cierto valor umbral o si, por el contrario, lo que en verdad hay que tener en cuenta es el número de veces en que se entra o sale de un CEM. O bien, que intensidad de campo es la indicada para producir efectos o de la dirección del campo inducido [94].

## 1.8.6. Efectos térmicos y no térmicos

Los efectos biológicos producidos en los seres vivos por los CEM's dependen de la cantidad de energía absorbida por los organismos. En una primera clasificación se dividen en dos tipos: efectos térmicos y efectos no térmicos [94].

### 1.8.6.1. Efectos térmicos

Al ser muy baja la energía de los CEM's, los fotones absorbidos no tienen suficiente poder energético para ionizar a las moléculas, pero si son capaces de transformarse en energía rotatoria, aumentando la energía cinética molecular y produciendo así calentamiento, este incremento de la temperatura corporal se distribuye irregularmente, dependiendo en gran medida del contenido en agua de cada tejido, y como consecuencia de ello se establecen gradientes térmicos en el interior de los organismos [94].

Si el calor excede la capacidad de disipación del sistema se produce hipertermia, que puede llegar a ocasionar lesiones locales como quemaduras, necrosis y muerte tisular [94].

Al no ser uniforme la absorción de calor, es difícil saber cuantos gradientes térmicos son inducidos en órganos profundos del cuerpo como estímulos que alteren la función normal, tanto del órgano calentado como de otros órganos del sistema, con lo que a partir de una acción primaria de calentamiento se pueden producir otros efectos indirectos en otros órganos distantes.

Para que se produzcan efectos térmicos es necesario que el cuerpo expuesto tenga como mínimo una dimensión que sea la décima parte de la onda incidente; aplicado al cuerpo humano, significa que los efectos térmicos producidos en la banda de frecuencias inferiores a 15MHz (longitudes de onda superiores a 20m) son despreciables [94].

### 1.8.6.2. Efectos no térmicos

Es difícil establecer un límite entre los efectos térmicos y no térmicos, debido a que en los seres vivos todo está relacionado. Los efectos no térmicos son aquellos que son producidos por mecanismos distintos al calor. Dentro de los cuales podemos mencionar: alteraciones en la transmisión genética, alteraciones en el comportamiento, interferencias directas con procesos bioeléctricos en órganos que muestran una actividad eléctrica modulada, etc. [94].

### 1.8.7. Efecto del campo electromagnético sobre las células y las biomoléculas *in vitro*

Los sistemas *in vitro* permiten la investigación de los efectos de los CEM's bajo condiciones experimentales controladas, en donde se considera el flujo magnético y eléctrico, la modulación de la dosis promedio de la tasa de absorción específica, la temperatura y la composición del medio celular sometido a exposición.

Los CEM's disponen de una cantidad de energía por fotón que es insuficiente para provocar la destrucción de células, pero suficiente para provocar cambios en su morfología, metabolismo, reproducción o duración de la vida celular.

El efecto de la EMBF ha sido estudiado en diferentes sistemas y tipos de células, Entre las células estudiadas se encuentran las células cromafines suprarrenales y células PC12 derivadas de feocromocitomas (tumores de la médula suprarrenal). [95][96] De tal forma que al someter a las células a EMBF se inducen cambios morfológicos y bioquímicos [97], similares a los producidos por el factor de crecimiento nervioso (FCN) y otros factores tróficos [98][99]. Las células cromafines y PC12 liberan diferentes neuropéptidos como catecolaminas, serotoninas, etc. Estos neuropéptidos han presentado cambios al estimularlos magnéticamente [100]. Muchas teorías sugieren que los cambios que se presentan por el mecanismo de interacción sistema biológico-EMBF son debido a los cambios generados en el transporte de iones [101] [102] [103]. Debido a la importancia que tiene el  $Ca^{++}$  fisiológicamente y a su relación con los cambios de membrana, el efecto de la EMBF sobre el flujo del  $Ca^{++}$  ha sido estudiado. Morgado-Valle Consuelo, 1998 estudio el papel de los canales de  $Ca^{++}$  en el crecimiento neuronal en cultivos de células cromafines (CCC) y demostró que los cambios de conductividad en el transporte de iones de  $Ca^{++}$  son consecuencia de el efecto de la estimulación sobre las células [97]. Por otro lado se ha demostrado que la EMBF sobre CCC y células PC12 presenta crecimiento neuronal similar al FCN [104][105].

Azanza y col, 1998 aplicaron CEM's (0.3-0.72T) en neuronas de los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa* y observaron una disminución progresiva de la frecuencia de la actividad bioeléctrica neuronal con el incremento de la intensidad del CEM aplicado. Incluso llegó a producirse una inhibición total de esta actividad cuando se aplica un CEM de 0.575T [106]. Al aplicar 0.3T comprobó que el 70% de las neuronas dan una respuesta rápida y específica mediada por el  $Ca^{++}$  y caracterizada por la variación de la frecuencia: de ellas el 50% aparecen inhibidas y el 20% estimuladas bajo la acción del CEM. Por su parte el otro 30% exhibe respuestas de carácter lento e inespecífico (no mediatizadas por el  $Ca^{++}$ ) y caracterizada por la disminución de la amplitud de los potenciales bioeléctricos además de las variaciones de frecuencia [107].

Los CEM's inciden en la alteración de movilización de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico inducida por el campo aplicado, de este modo parece evidente que los CEM's son responsables de un incremento en la concentración citolítica del  $\text{Ca}^{++}$  libre [107].

También se ha propuesto que la EMBF pueden modificar el proceso de recombinación de algunos radicales libres relevantes biológicamente los cuales influyen en varios procesos biológicos [108][109]. Por otro lado, se cree que las señales eléctricas pueden influir en las características morfológicas y en la conectividad funcional durante el desarrollo del sistema nervioso y en eventos neoplásicos, como en la síntesis de neurotransmisores [110][111], expresión de receptores de neurotransmisores [112][113], dirección y tasa de crecimiento neuronal [114][115][116] y formación y patrones de conexiones sinápticas [117][118].

### **1.8.8. Efecto del campo magnético sobre el sistema nervioso *in vivo***

Aunque se sabe que una de las principales causas que dificultan la regeneración de la médula espinal es el bloqueo de células por causa de los mecanismos de daño secundario desarrollados en el sitio de la lesión (Ver 1.3.2.); se han utilizado CM's pulsados para intentar reparar lesiones de médula espinal y para acelerar la regeneración espontánea en lesiones de nervio periférico. Sin embargo no todas las intensidades de CM y la dirección del mismo tienen efecto sobre la regeneración periférica, ni producen cambios en lesiones espinales [119].

Cuando se utilizan CM's sobre la regeneración nerviosa su efecto depende del arreglo de bobinas y de la dirección del campo sobre el sitio de la lesión [119]. Walter et al, 2004 aplicaron un CM pulsante paralelo en lesiones del nervio ciático de ratas y no obtuvieron cambios ni mejoras en el sitio de la lesión y creen que los resultados no fueron exitosos debido al uso de una intensidad de campo inadecuada y a la dirección del campo en paralelo en lugar de perpendicular [120]. (Figura 14 y 15)

Greenebaum et al, 2007 compararon dos direcciones de CM pulsante: perpendicular y paralela (Figura 14 y 15) para acelerar la regeneración espontánea de nervios periféricos lesionados y para reparar LTME. Demostraron que los CM's inducen corrientes en un plano perpendicular a la dirección del campo y que la baja conductividad de la membrana externa protectora de la médula espinal (duramadre) o de la capa miélica de los nervios periféricos pareciera limitar la inducción del campo eléctrico y la corriente a la médula espinal o al nervio [119].

Los CM perpendiculares (Figura 14) al tronco nervioso inducen flujos de corriente paralelos a las fibras nerviosas, que cruzan solamente los extremos de la región del campo o las obstrucciones eléctricas, así como el sitio de lesión. La inducción de corriente es más fuerte fuera de los extremos de la región del campo que dentro de la región; en el centro es cero [121]. En el caso de los CM paralelos al tronco nervioso (Figura 15) con un par de bobinas circundantes al área afectada induce campos eléctricos y corrientes perpendiculares a la dirección de crecimiento deseada. Los campos perpendiculares generados por un par de bobinas Helmholtz inducen corrientes y campos eléctricos en dirección del crecimiento de las fibras nerviosas. Sin embargo, no hay que olvidar los mecanismos que afectan generalmente a la dirección de los iones, enzimas y otros procesos de la membrana en ambos casos.

Marijan Bervar, 2005 aplicó un CM de 0.5mT a 50HZ perpendicular (Figura 14-B) en lesiones por sección y contusión del nervio ciático de rata. Demostró que los animales con estimulación magnética tienen una débil pero mayor recuperación funcional que los grupos control. El modelo por contusión (diferencia estadística significativa  $p=0.0030$ ) tuvo una mejor recuperación que el modelo por sección (diferencia estadística significativa  $p=0.0117$ ) [122].

Por otro lado se ha comprobado que la estimulación magnética repetitiva transcraneal (EMRT) promueven la regeneración axonal in vivo. EMRT fue utilizada en lesiones medulares por compresión a nivel torácico T4 -5 y T10 -11 en ratas adultas. Se demostró que los animales con lesiones torácicas bajas (T10-11) presentan mejor recuperación funcional que el grupo control. Sin embargo aquellas que tiene lesiones torácicas altas (T4-5) tienen menor recuperación que los grupos control [80].

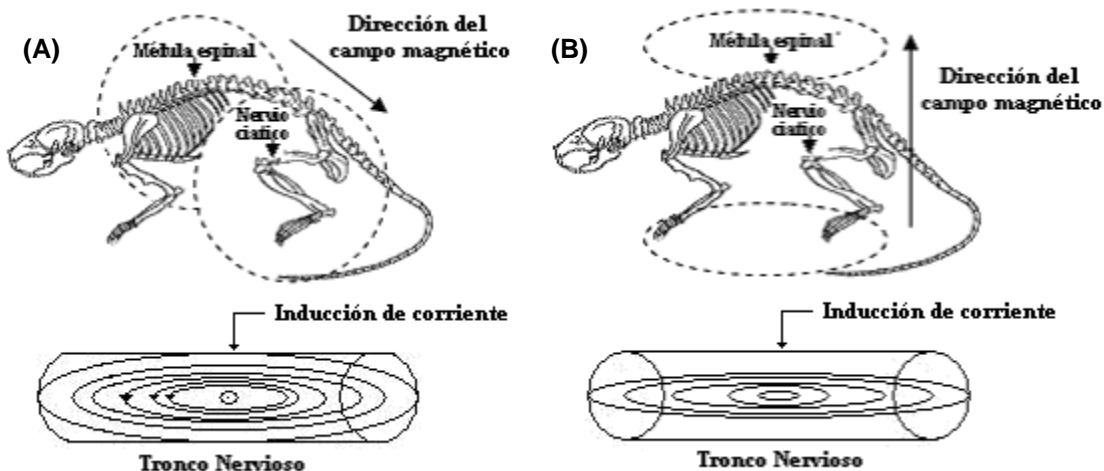


Figura 14. Arreglos del campo magnético perpendiculares al tronco nervioso

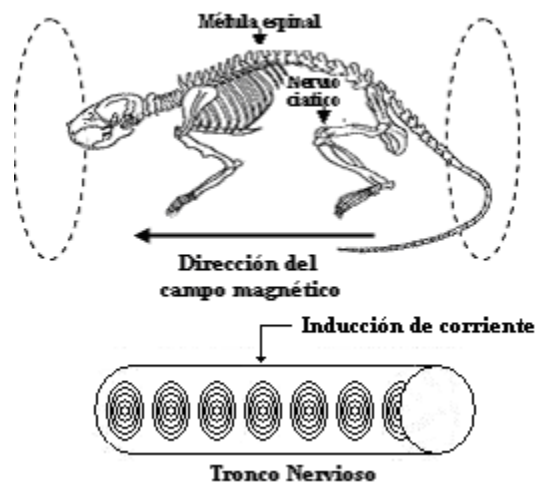


Figura 15. Arreglo del campos magnético paralelo al tronco nervioso



## 2. Justificación

---

Los accidentes automovilísticos, las caídas, los sucesos violentos y la práctica de deportes extremos entre otros son causantes de LTME, presentándose al año alrededor de 40 nuevos casos por millón de habitantes y afectando principalmente a la población económicamente activa (16 - 38 años de edad) con repercusiones físicas, emocionales y económicas.

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para reestablecer la función neurológica; debido a la complejidad para detener la cascada de eventos fisiopatológicos que se presentan después de una LTME. En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas para preservar la función neurológica y otras más para reestablecerla. Entre las estrategias para reestablecer las funciones perdidas destaca el uso de diferentes biomateriales, con los que se han obtenidos ciertos beneficios, pero limitados, debido a las características físico químicas de los materiales empleados. En base a lo anterior, en el presente trabajo proponemos el uso de biomateriales con características diferentes a los utilizados hasta la fecha, puesto que el método de síntesis por plasma utilizado en este trabajo permite obtener materiales libres de impurezas y químicamente estables. Con el fin de incrementar el efecto benéfico obtenido en un estudio previo con dichos biomateriales el presente trabajo propone la utilización simultánea de materiales poliméricos derivados del pirrol y estimulación con campos magnéticos de baja frecuencia ya que tanto en estudios *in vitro* como en otros modelos experimentales han demostrado su capacidad para estimular el crecimiento celular y neuronal.

## 3. Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1. Hipótesis

El tratamiento combinado de un implante de polímero semiconductor y la aplicación de estimulación magnética de baja frecuencia después de una lesión por sección completa de la médula espinal tendrá un efecto sinérgico sobre la regeneración axonal y la recuperación funcional con respecto al uso de estas dos estrategias terapéuticas por separado.

### 3.2. Objetivos

#### General:

- Estudiar si el efecto combinado de diferentes implantes poliméricos derivados del pirrol sintetizados por plasma más la aplicación de EMBF tiene un efecto sinérgico en comparación al uso de los tratamientos por separado en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal.

#### Particulares:

- Evaluar el efecto de diferentes implantes de polímero semiconductor sobre la regeneración axonal y la recuperación funcional después de una lesión por sección completa de la médula espinal.
- Evaluar el efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia sobre la regeneración axonal y la recuperación funcional después de una lesión por sección completa de la médula espinal.

- Evaluar el efecto del tratamiento combinado de diferentes implantes poliméricos derivados del pirrol sintetizados por plasma más la aplicación de campos magnéticos de baja frecuencia sobre la regeneración axonal y la recuperación funcional después de una lesión por sección completa de la médula espinal.

## 4. Variables

---

### 4.1. Variables dependientes

- **Función motora.** Se refiere a la capacidad para mover las extremidades posteriores y se evalúa mediante la escala BBB la cual esta conformada por 22 puntos donde 0 indica la ausencia de movimiento y 21 es una marcha normal.
- **Tejido preservado.** Se refiere a la cantidad de tejido sobreviviente en el epicentro de una lesión después de un tiempo determinado y se evalúa mediante técnicas histológicas y morfométricas utilizando un sistema computarizado.
- **Niveles de calcio.** Se refiere a la concentración de calcio circundante en la sangre y se evalúa mediante espectrofotometría de absorción atómica.

### 4.2. Variables independientes

- **Lesión por sección completa de la médula espinal.** Se refiere a un modelo de estudio característico de lesiones medulares y se produce mediante procedimiento microneuroquirúrgico, cortando la totalidad de los axones a nivel torácico 9.
- **Implante polimérico semiconductor.** Biomaterial utilizado en aplicaciones medicas el cual; se sintetiza mediante el método de polimerización por plasma.
- **Tratamiento con estimulación magnética de baja frecuencia.** Técnica utilizada para estimular la regeneración celular y neuronal la cual se genera mediante un arreglo de bobinas Helmholtz.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Síntesis de los polímeros semiconductores y fabricación del implante

#### 5.1.1. Síntesis de los materiales y parámetros de operación del reactor

Usando la técnica de polimerización por plasma se depositaron en sustratos de vidrio 3 películas delgadas de diferentes polímeros: Polipirrol (PPy), polipirrol/iodo (PPy/I) y polipirrol/polietilenglicol (PPy/PEG). El espesor de cada película fue de: 12.4 $\mu\text{m}$ , 10.1  $\mu\text{m}$  y 14.8  $\mu\text{m}$  respectivamente. La polimerización se llevo a cabo en un reactor tubular de vidrio de 9cm de diámetro externo y 20cm de longitud. Los parámetros de operación del reactor fueron: una radiofrecuencia de 13.5MHz, potencia promedio de 18W, temperatura constante de 365K, a una presión promedio de  $1.5 \times 10^{-2}$  Torr con un potencial de 700V entre los electrodos. (Figura 16)

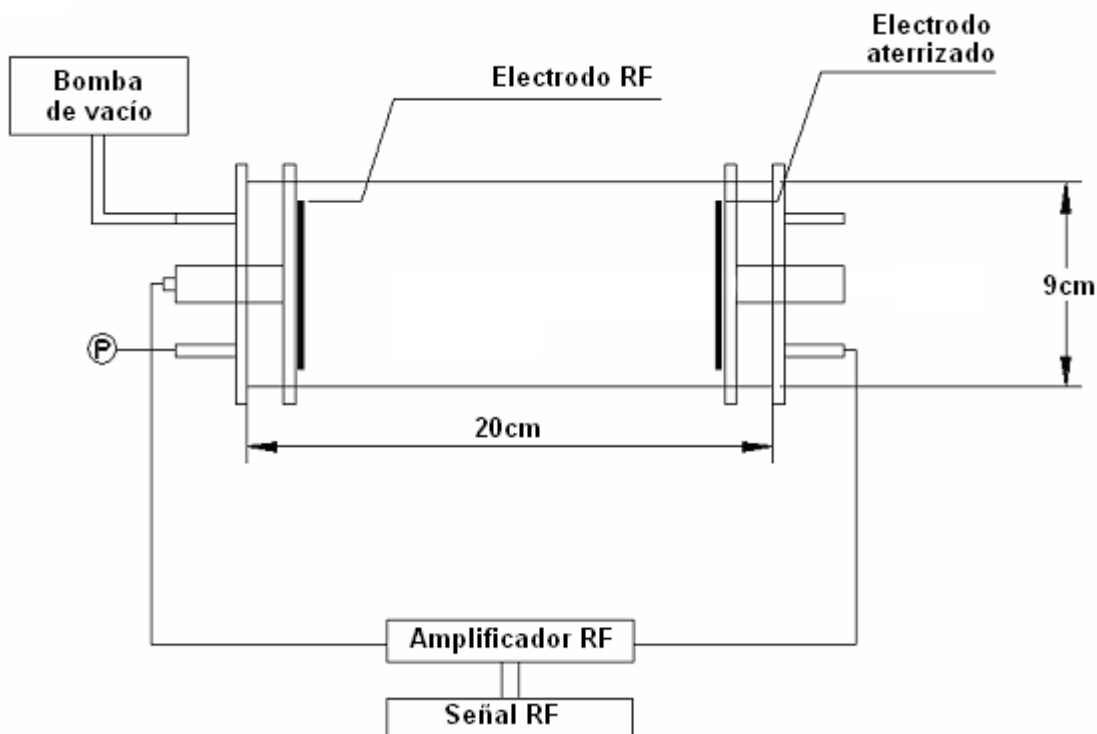


Figura 16. Esquema del reactor de polimerización por plasma

Todas las películas se sintetizaron con los mismos parámetros de operación del reactor. Para sintetizar el polímero semiconductor PPy se utilizó el monómero Pirrol y se dejó fluir libremente dentro del reactor, mientras que para la síntesis del polímero semiconductor PPy/I se empleó el monómero Pirrol y se dopó con yodo en su fase de vapor y para la obtención del PPy/PEG se utilizó el PEG en estado líquido y se copolimerizó con el monómero Pirrol, en ambos casos los monómeros se dejaron fluir libremente dentro del reactor. El tiempo total de síntesis para cada muestra fue de 300min.

### **5.1.2. Fabricación de los implantes**

Las películas se despegaron del sustrato usando acetona grado reactivo y se conservó  $1\text{cm}^2$  de la película para su análisis. Posteriormente cada película se molió en un mortero de ágata y se compactó en una prensa mecánica a una presión de 9 toneladas durante 10min para formar una pastilla (1cm de diámetro y 0.1cm de espesor) similar a las que se usan para espectroscopía de FT-IR (transformada de Fourier infrarrojo). Todo el proceso de compactación se realizó a temperatura ambiente.

El implante que se colocó en la médula espinal de las ratas fue una parte de la pastilla que midió aproximadamente 3mm de diámetro con un peso de  $1\mu\text{g}$ .

### **5.1.3. Caracterización de los materiales**

Para caracterizar los materiales se realizó un análisis por infrarrojo (FTIR), análisis de difracción de rayos-X, mediciones de conductividad bajo condiciones de humedad relativa y análisis morfológico para cada película.

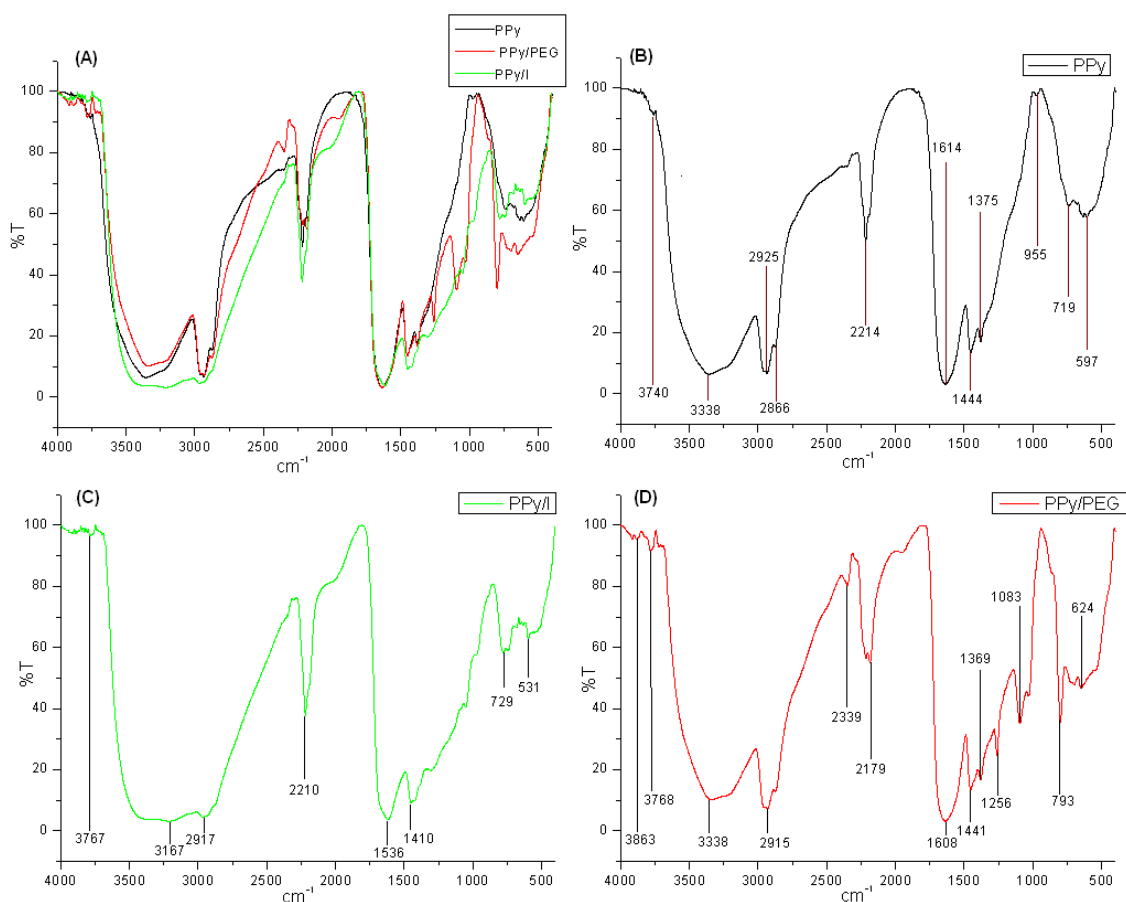
#### **5.1.3.1. Análisis IR**

Los espectros FT-IR de los polímeros se tomaron directamente de las películas con un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR-2000. Los espectros de IR de los polímeros se muestran en la gráfica 17-A.

El espectro de IR del PPy (Figura 17-B) muestra los picos característicos del pirrol. Las aminas están presentes a los  $3338\text{ cm}^{-1}$ . La absorción y la contribución alrededor de los  $1614\text{cm}^{-1}$  lo cual corresponde a las aminas en la estructura del pirrol. El intervalo de picos entre los  $1000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  contienen absorciones correspondientes a los alquenos provenientes de algunos anillos rotos.

La gráfica 17-C muestra el espectro de IR de la película de PPy/I. Aunque los principales picos de las películas de PPy se encuentran presentes en el espectro del PPy/I, existe una diferencia entre el PPy respecto al PPy/I, ya que los picos están presentes entre los 3600 y los 2400  $\text{cm}^{-1}$ . Esta amplia zona comprende muchas absorciones de los enlaces N-H, O-H y C-H en diferentes configuraciones. Las bandas para una absorción específica pueden estar traslapadas en estos picos. Los enlaces alifáticos C-H se localizan en los 2917  $\text{cm}^{-1}$  y los enlaces aromáticos C-H se encuentran en los 3167  $\text{cm}^{-1}$ .

La gráfica 17-D muestra el espectro de IR del PPy/PEG. Al igual que en el PPy/I el espectro del PPy/PEG presenta los picos característicos de la película de PPy. Los picos que se encuentran entre los 400 y los 1200  $\text{cm}^{-1}$  contienen absorciones correspondientes a alquenos provenientes de anillos rotos. El pico de los 2915  $\text{cm}^{-1}$  pertenece a la saturación de cadenas alifáticas C-H.



**Figura 17.** Espectros de IR de los materiales poliméricos. (A) Representación gráfica de los espectros de IR de los polímeros: PPy, PPy/I y PPy/PEG. (B) Análisis de IR del PPy, (C) Análisis de IR del PPy/I y (D) Análisis de IR del PPy/PEG

### 5.1.3.2. Análisis de difracción de rayos-X

Para el análisis de difracción de rayos-X de los polímeros PPy, PPy/I y PPy/PEG sintetizados por plasma se usó un sistema Siemens D5000.

La Figura 18 representa el patrón de dispersión de rayos-X del PPy, PPy/I y PPy/PEG. En las gráficas identificamos dispersión que corresponde a espectros característicos de materiales amorfos donde no se presenta cristalinidad.

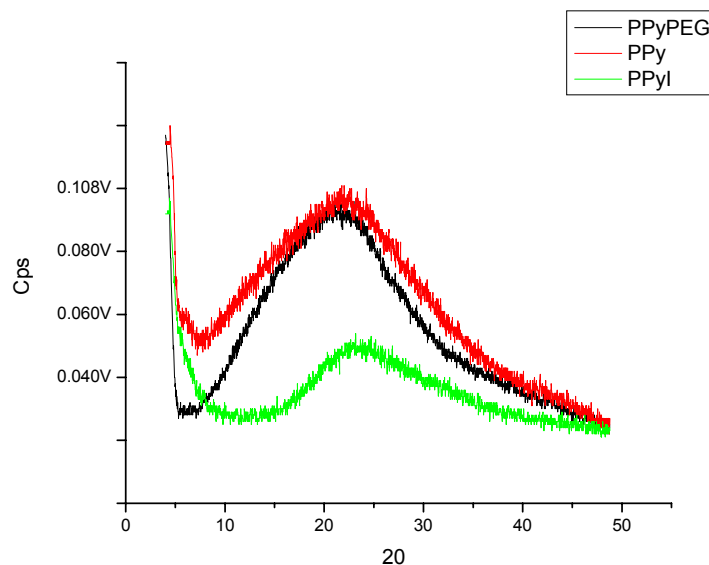


Figura 18. Análisis de difracción de rayos-X

### 5.1.3.3. Características eléctricas bajo condiciones de humedad

Debido a que el estudio de la conductividad en función de la temperatura es una herramienta importante para investigar el transporte de carga en los polímeros semiconductores, dicho análisis se realizó dentro de una cámara sellada de vidrio (Figura 19) en la que se hicieron las medidas de resistencia para conocer la conductividad de los polímeros a diferentes condiciones de humedad relativa (HR) a fin de interpretar su comportamiento al ser implantados.



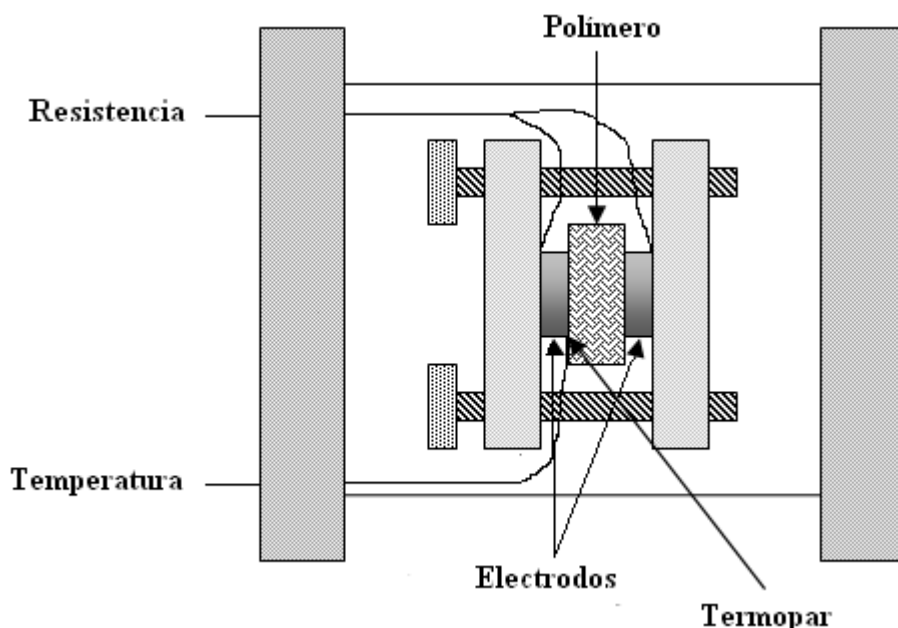


Figura 19. Dispositivo experimental para las medidas de conductividad

Para estimar la resistividad en función de la HR, a la cámara se le vertió agua y se introdujo un higrómetro de pelo de caballo. La cámara se calentó de manera uniforme a temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del agua con el fin de que el material absorbiera el máximo de humedad y se hicieron las mediciones (Tabla 6).

Tabla 6. Resistencia, resistividad y conductividad de los polímeros a diferentes condiciones de humedad relativa

| Polímero | Humedad Relativa | Resistencia | Resistividad | Conductividad |
|----------|------------------|-------------|--------------|---------------|
| PPy      | 50%              | 390MΩ       | 35GΩcm       | 28.57pS/cm    |
| PPy      | 90%              | 16MΩ        | 1.43GΩcm     | 696pS/cm      |
| PPy/I    | 40%              | 2.46MΩ      | 243.36MΩcm   | 4.1nS/cm      |
| PPy/I    | 88%              | 8.5KΩ       | 840.88KΩcm   | 1.189μS/cm    |
| PPy/PEG  | 35%              | GΩ          | -----        | -----         |
| PPy/PEG  | 85%              | GΩ          | -----        | -----         |

El material PPy/PEG a temperatura ambiente al 35% y 85% de HR mostró una resistencia del orden de GΩ, por lo cual no se consideró como polímero semiconductor.

#### 5.1.3.4. Morfología

Las Figura 20 muestra las imágenes obtenidas por microscopía por barrido y la descripción de las películas de PPy (A y B), PPy/I (C y D) y PPy/PEG (E y F). La microscopía se realizó con un microscopio electrónico de barrido Philips XL.

Las Figuras 20-A y 20-B muestran las micrografías por barrido con ampliaciones de 500X y 3000X respectivamente del PPy. La morfología de la película de PPy una ampliación de 3000X muestra una formación por capas acomodadas unas sobre otras, este tipo de crecimiento es característico de las películas delgadas formadas por descargas de resplandor. Se aprecia una estructura homogénea y la superficie tiene apariencia esponjosa. La textura de las películas con una ampliación de 500X y 3000X se observa arrugada debido al efecto del solvente sobre la película cuando esta fue separada del sustrato.

En las Figuras 20-C y 20-D se observan las micrografías SEM de las películas de PPy/I con ampliación de 500X y 5000X respectivamente. La morfología a ampliación de 500X tiene una formación por capas dando la apariencia de hojuelas apiñadas unas sobre otras con apariencia esponjosa característica del PPy, pero no acomodadas de forma continua. La imagen de la superficie a 500X y 5000X se observa lisa, con algunas protuberancias en forma de cordilleras montañosas, producto posible del solvente que se utilizó cuando la película se separó del sustrato.

Las Figuras 20-E y 20-F muestran las micrografías SEM de las películas de PPy/PEG a ampliación de 500X y 2000X respectivamente. En la micrografía a 500X se observa una estructura homogénea y la superficie tiene una apariencia de maíz empalmadas entre ellas dando la apariencia de una estructura esponjosa característica del PPy. La superficie a 2000X muestra pequeños gránulos esféricos diseminados sobre la superficie que van creciendo a partir de pequeños núcleos que se van uniendo conforme incrementa su diámetro

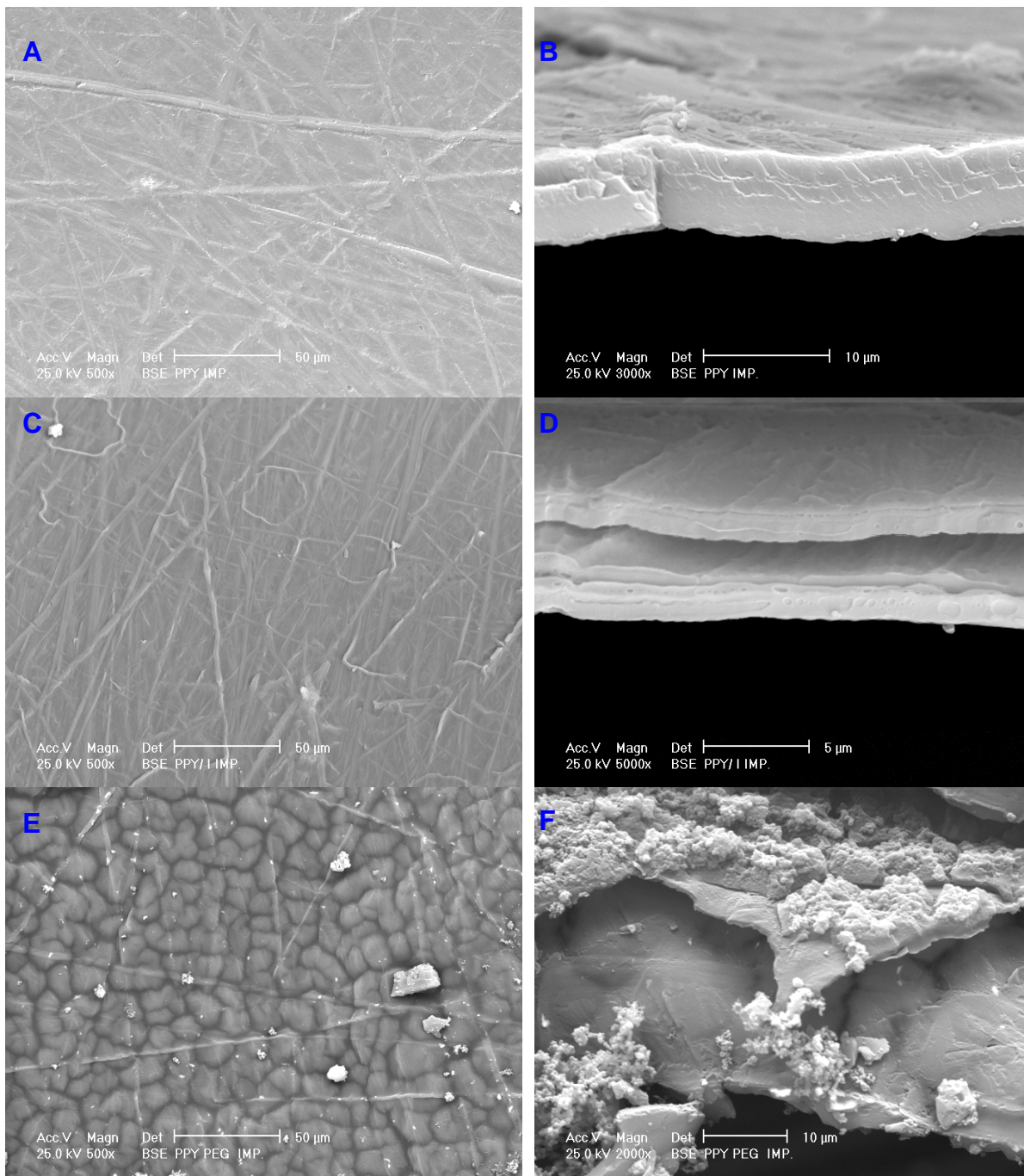


Figura 20. Micrografías por escaneo electrónico de los materiales (A) PPy, (B) PPy/I y (C) PPy/PEG a amplificación de 500X y 3000X

## 5.2. Grupos experimentales

Se utilizaron 80 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas de 8 y 9 semanas de edad, con peso corporal entre 200 y 250g, sanas y sin ningún procedimiento experimental previo. Para su estudio las ratas se dividieron en 2 grupos con 4 subgrupos cada uno:

### ■ Grupo I :

- **Grupo control:** Ratas con LPSCME (N=12).
- **Grupo PPy:** Ratas con LPSCME e implantadas con PPy (N=12).
- **Grupo PPy/I:** Ratas con LPSCME e implantadas con PPy/I. (N=12).
- **Grupo PPy/PEG:** Ratas con LPSCME e implantadas con PPy/PEG (N=12).

### ■ Grupo II:

- **Grupo control+EMBF:** Ratas con LPSCME y con estimulación magnética a baja frecuencia (N=8).
- **Grupo PPy+EMBF:** Ratas con LPSCME, implantadas con PPy y con estimulación magnética a baja frecuencia (N=8).
- **Grupo PPy/I +EMBF:** Ratas con LPSCME, implantadas con PPy/I y con estimulación a baja frecuencia (N=8).
- **Grupo PPy/PEG+ EMBF:** Ratas con LPSCME implantadas con PPy/PEG y con estimulación magnética a baja frecuencia (N=8).

## 5.3. Procedimientos quirúrgicos

El presente trabajo siguió los lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación), publicada en 1990 (Ver apéndice B)

A todas las ratas se les realizó una LPSCME y al término del estudio todas las ratas se sacrificaron por vía intracardiaca para estudio morfológico-morfométrico y los animales seleccionados para medición del calcio fueron sacrificados por decapitación.

### **5.3.1. Método de anestesia**

Antes de cada procedimiento quirúrgico y del sacrificio por vía intracardica, los animales se anestesiaron por vía intramuscular con una mezcla de ketamina (77.5mg por Kg de peso corporal) e hidrocloreuro de xilacina (12.5mg por Kg de peso corporal).

### **5.3.2. Lesión por sección completa de la médula espinal**

Bajo el efecto de anestesia y en condiciones de asepsia y antisepsia, los animales fueron sometidos a una cirugía en la que se les practicó una incisión media sagital en la piel de la región torácica baja. Se separó el tejido vascularizado, se disecaron los músculos paravertebrales, se expusieron las apófisis espinosas de los niveles torácicos 8,9 y 10 (T8, T9 y T10) y se separó el periostio de las láminas vertebrales. Con una gubia se extirpó la apófisis espinosa a nivel T9 y parte de la T10. Posteriormente se realizó una laminectomía en dicho nivel, atravesando para ello el ligamento amarillo con una pinza de puntas finas entre los cuerpos vertebrales. Se dejaron al descubierto la meninges y la porción dorsal de la médula espinal. Se amplió la laminectomía hacia las regiones laterales. Se localizó la arteria dorsal y con un bisturí del número 11 se realizó una incisión longitudinal en las meninges de aproximadamente 5mm de largo. Posteriormente con unas tijeras de microcirugía se hizo un corte transversal completo de la médula espinal, comenzando por los cordones posteriores, bajando hasta llegar a los cordones anteriores y finalmente cortando los cordones laterales. Con un gancho microquirúrgico se verificó que ningún axón hubiera quedado conectado.

### **5.3.3. Implante de los polímeros**

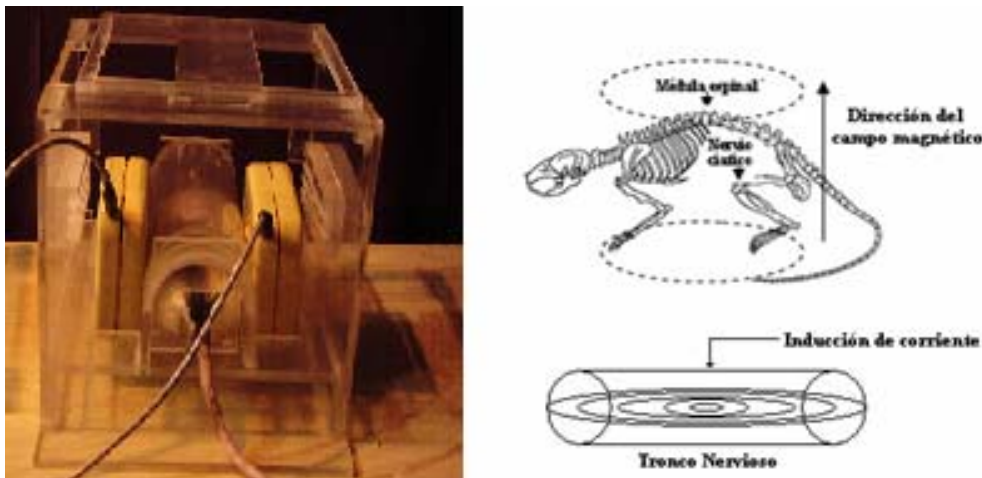
Una vez completada la LPSCME en las ratas, justo en el sitio de sección se introdujo de forma transversal una pastilla de polímero de aproximadamente 3mm de diámetro, según el grupo experimental. Posteriormente se procedió a suturar las meninges con una sutura de 9-0 (polipropileno deknatel) y el músculo y la piel en 2 planos con sutura 5-0 (polipropileno monofilamento).

Después de la cirugía todos los animales recibieron 0.3ml de penicilina benzatínica por vía intramuscular (1,200,000 U.I.) y paracetamol como analgésico disuelto en agua de bebida durante 3 días, posteriormente los animales fueron alimentados “*ad limitum*” hasta el termino del estudio

## 5.4. Estimulación magnética de baja frecuencia

La estimulación magnética se aplicó 2 horas diarias durante un periodo de un mes a los animales seleccionados, iniciando una semana después de la LPSCME. Los animales se estimularon en una cámara de exposición que mantenía a la rata con limitación del movimiento a fin de concentrar el campo magnético en la región torácica donde se localizó la LPSCME con y sin implante del polímero, de modo que la inducción de la corriente fuera paralela a las fibras nerviosas (Figura 21). Los experimentos se realizaron en una habitación con temperatura ambiente de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . La temperatura dentro de la cámara de exposición fue de  $25.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$  y la intensidad de la iluminación calculada fue de 350lx.

El campo magnético se generó dentro de una cámara de exposición con un par de bobinas Helmholtz con un diámetro interno de 7cm compuestas por alambre de cobre del número 18 (350 espiras). Los anillos se conectaron en paralelo para minimizar la impedancia total del alambre. La conexión de los anillos se realizó en un transformador ajustable a 120V (Staco Energy Products, Dayton, OH, USA). Se acopló un osciloscopio (Tektronix, SI03N, USA) al sistema para monitorear la onda sinusoidal de 60Hz. La densidad del flujo magnético fue de 7 Gauss (0.7mTesla) con una corriente de 60mA.



**Figura 21.** Arreglo de bobinas Helmholtz con dirección del campo perpendicular e inducción de corriente paralela al tronco nervioso

## 5.5. Evaluación funcional

La evaluación de la función motora de las extremidades posteriores de los animales se realizó por medio de la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan), la cual evalúa la marcha tomando en consideración las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo a través de 22 grados de recuperación motora; donde el grado 0 representa la ausencia absoluta de movimiento y el grado 21 una marcha normal. (Ver apéndice D)

Las evaluaciones se realizaron 24 horas después de la LPSCME y posteriormente una vez por semana durante 2 meses en cada una de las extremidades del tren posterior. Dicha evaluación fue realizada por 2 investigadores que desconocían las condiciones experimentales de los animales (evaluación doble ciego), a fin de evitar el sesgo en los resultados.

## 5.6. Estudio histológico y bioquímico

### 5.6.1. Sacrificio por perfusión vía intracardiaca y estudio histológico

Cuando se complementó el tiempo estudio, según cada caso y previa anestesia los animales fueron sometidos a una toracotomía amplia para canular la aorta ascendente y profundir vía intracardiaca con una bomba peristáltica con 200ml de solución fisiológica más 1000 U.I. de heparina, seguida de 400ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos. Ambas soluciones se transfundieron a una velocidad de 30ml/min. Al término de la perfusión se extrajo la médula espinal y el cerebro. El fragmento de la médula espinal abarcó 1.5cm a partir de la región del epicentro de la lesión, hacia el segmento caudal y el segmento cefálico y se colocó en el mismo fijador, al igual que el cerebro; ambas se creopreservaron en sacarosa al 30%.

Posteriormente, la médula espinal se deshidrató en alcoholes graduales: alcohol etílico al 50%, 80%, 95% y absoluto (30min en cada uno), posteriormente, se aclaró con 2 baños de xileno (30min en cada uno) y se incluyó en parafina. Se realizaron cortes longitudinales con un micrótomo y se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0.5g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron en laminillas de vidrio para ser teñidas con el procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris. (Ver apéndice C)

### 5.6.2. Sacrificio por decapitación para cuantificación de calcio

A los animales seleccionados para análisis de cuantificación de  $\text{Ca}^{++}$  y que fueron estimulados magnéticamente, fueron sacrificados a lo quince días después de la lesión. La estimulación magnética se aplicó 2 horas diarias durante un periodo de una semana iniciando una semana después de la lesión.

A los animales se les aplicó una dosis de heparina (1000 U.I.) vía intraperitoneal y se les decapitó con una guillotina para extraer la sangre. La sangre se centrifugó a 300rpm para obtener suero y analizarlo con un espectrofotómetro de absorción atómica Pekín Elmer Aanalyst 100 (Figura 22) a una longitud de onda de 422.7m para determinar la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ .



Figura 22. Espectrofotómetro de absorción atómica Pekín Elmer Aanalyst 100



## 6. Resultados

---

### 6.1. Morbi-Mortalidad

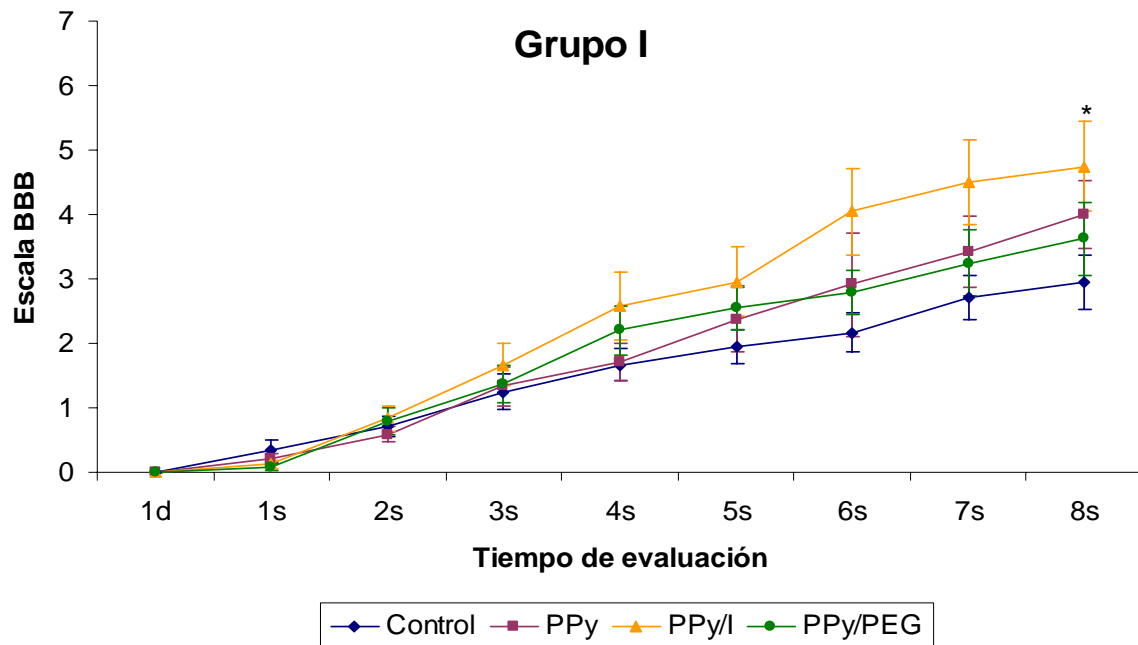
Para la realización del presente estudio se utilizaron un total de 140 ratas, de las cuales, 19 ratas (13%) fueron eliminadas del proyecto por fallas en la técnica de la lesión por sección completa y 26 ratas (19%) se utilizaron para análisis de medición del  $Ca^{++}$ . De los animales restantes, 15 ratas murieron antes de llegar al término del estudio, observándose una mortalidad global del 11%. Entre las principales causas de muerte destacan la autofagia (4%), las infecciones de vías urinarias (2%), la neumonía (1%) y las complicaciones en el postoperatorio inmediato como el paro cardio-respiratorio (1%), mientras que en el 3% de los animales no se pudo establecer la causa del fallecimiento.

### 6.2. Evaluación funcional

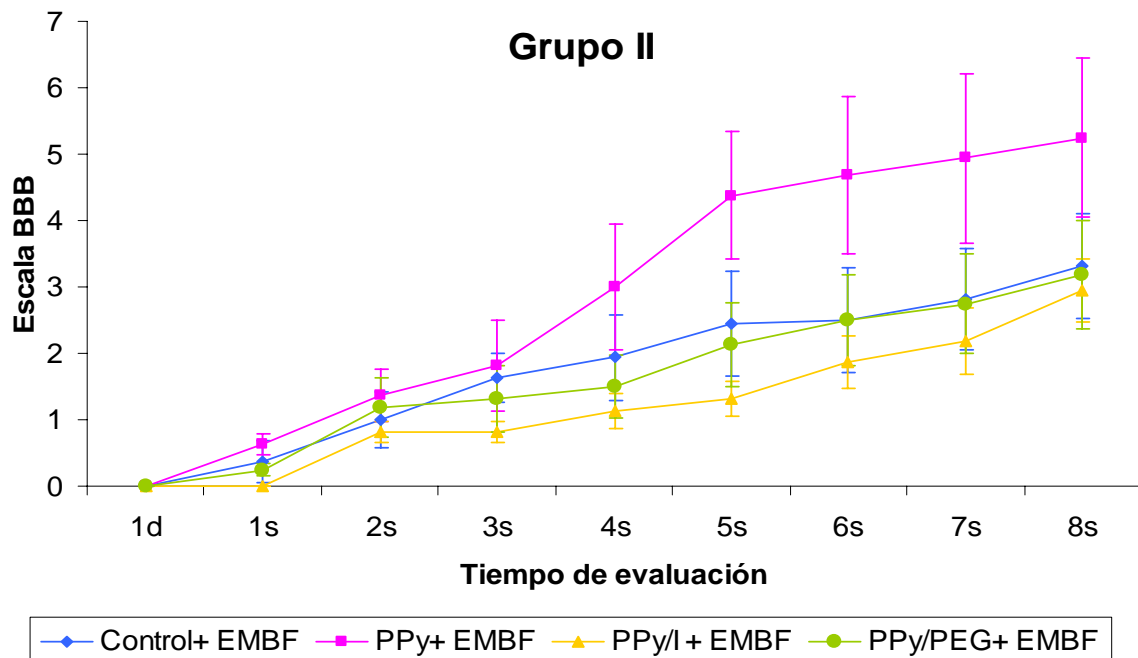
Al término del estudio se hizo un análisis estadístico del total de las evaluaciones realizadas con la escala BBB en ambas extremidades posteriores de cada uno de los animales incluidos tanto en el Grupo I (Figura 23) como en el Grupo II (Figura 24) para determinar su evolución funcional desde el primer día después de la LPSCME y posteriormente desde la primera hasta la octava semana de evaluación a fin de contrastar los subgrupos de cada grupo entre sí y a estos con sus correspondientes en el otro grupo.

Al analizar el Grupo I, se puede observar que tanto el subgrupo que recibió el implante de PPy, como el que recibió el de PPy/I presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al compararlos con el subgrupo control (Figura 24, 26 y 27), lo que funcionalmente representa la diferencia en la capacidad para mover ya sea 2 ó 3 de las articulaciones de las patas traseras (tobillo, rodilla, cadera).

Más aún, al emplear el modelo lineal general seguido de la prueba para evaluar efectos inter-sujetos se muestra que el tratamiento con implante de PPy (Figura 25) presenta una diferencia significativa en relación al grupo control ( $p = 0.041$ ).

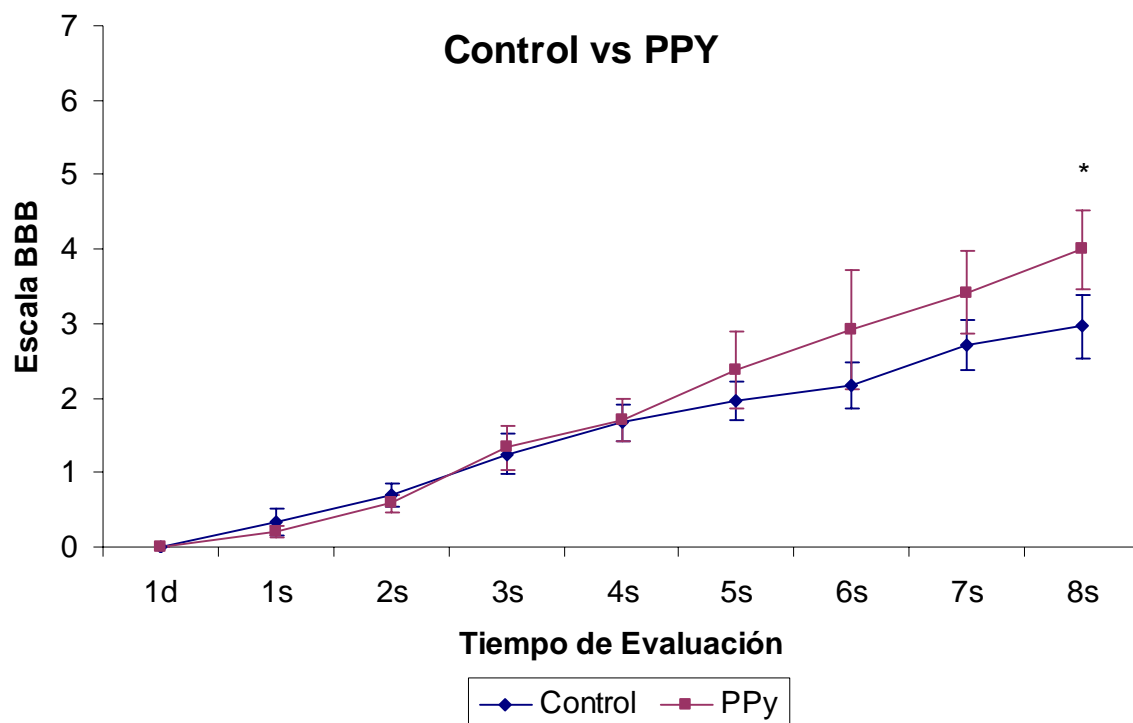


**Figura 23.** Recuperación motora en la escala BBB del Grupo I. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 12 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias significativas de los subgrupos tratados con implantes poliméricos con respecto al subgrupo Control ( $p < 0.05$ ).

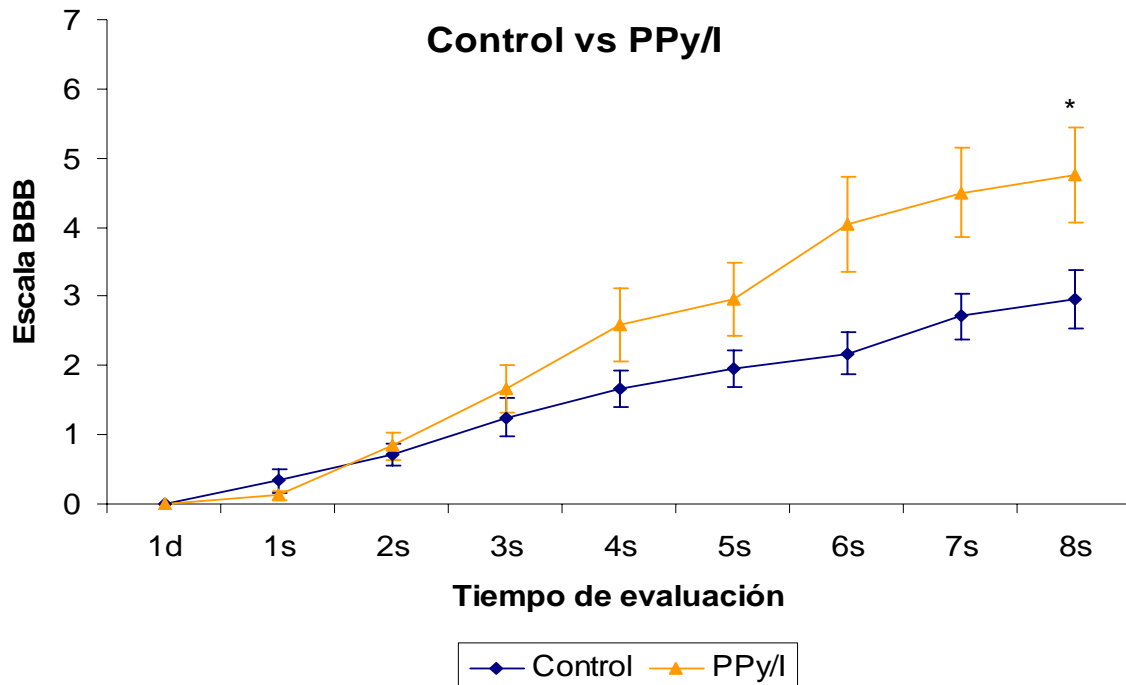


**Figura 24.** Recuperación motora en la escala BBB del Grupo II. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 8 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias significativas de los subgrupos tratados con distintos implantes poliméricos más EMBF con respecto al subgrupo Control más EMBF ( $p < 0.05$ ).

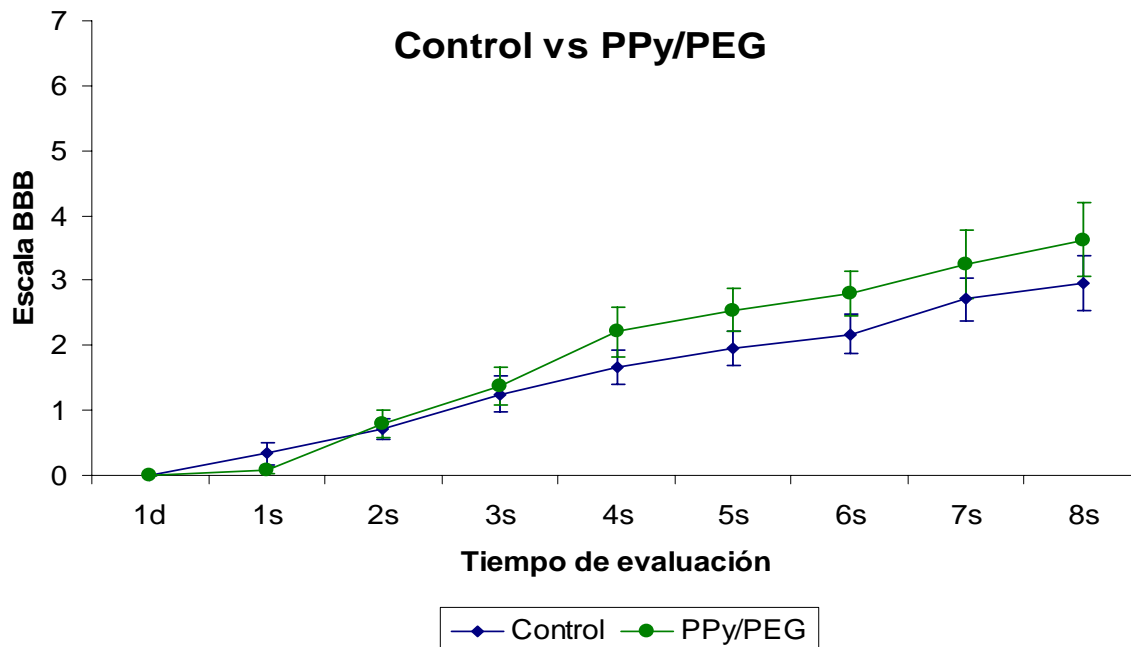
Un hecho a destacar es que específicamente el subgrupo tratado con implante de PPy/l presentó una recuperación funcional mayor en comparación con el subgrupo control, observándose diferencias estadísticas ( $p=0.038$ ) desde la cuarta semana de evolución hasta los dos meses del tratamiento (Figura 26). En contraste, el subgrupo tratado con implantes de PPy/PEG no presentó diferencias significativas con respecto al subgrupo control que solamente fue sometido a la LPSCME (Figura 27).



**Figura 25.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control y el subgrupo PPy. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 12 animales por subgrupo. Modelo lineal general seguido de la prueba inter-sujetos ( $p=0.041$ ). \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy con respecto al subgrupo Control.



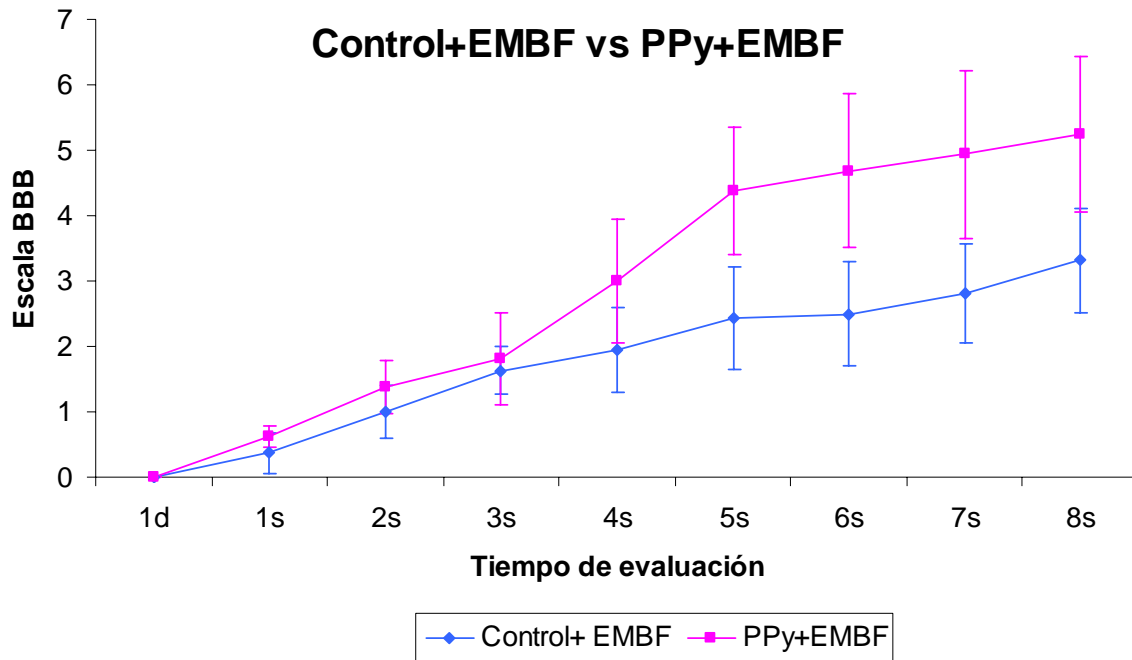
**Figura 26.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control y el subgrupo PPy/I. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 12 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Tukey ( $p=0.038$ ). \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/I con respecto al subgrupo Control.



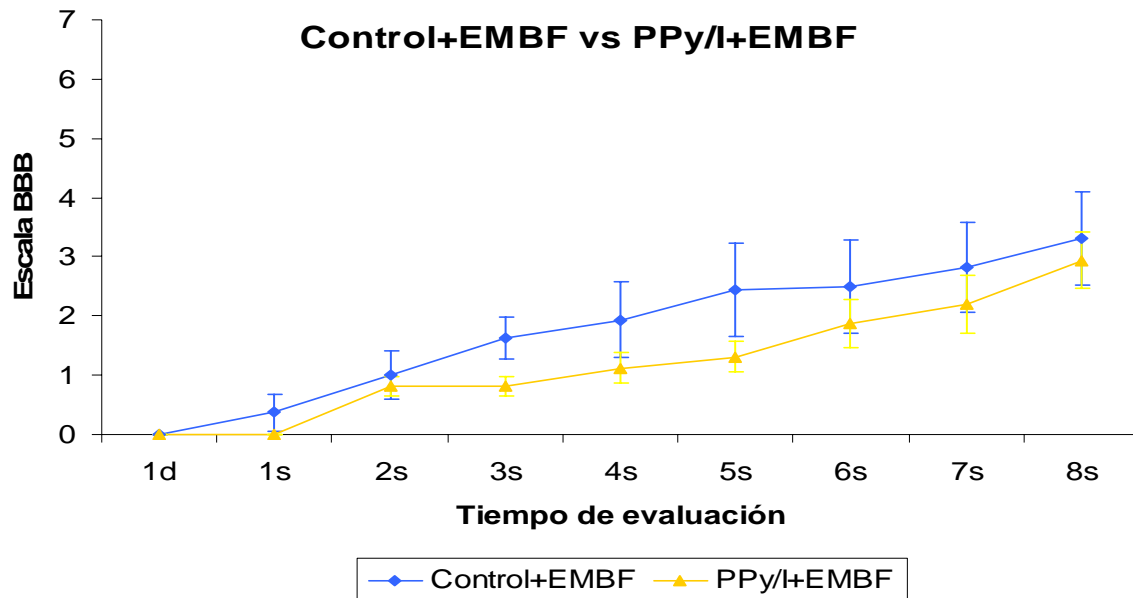
**Figura 27.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control y el subgrupo PPy/PEG. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 12 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/PEG con respecto al subgrupo Control.

En el Grupo II, el cual, además de los implantes poliméricos recibió estimulación magnética de baja frecuencia o EMBF, se observó una mejoría en la recuperación funcional al compararlo con el subgrupo Control+EMBF aunque no se pudo demostrar diferencias estadísticas entre ambos si se observó cierta tendencia (Figura 28).

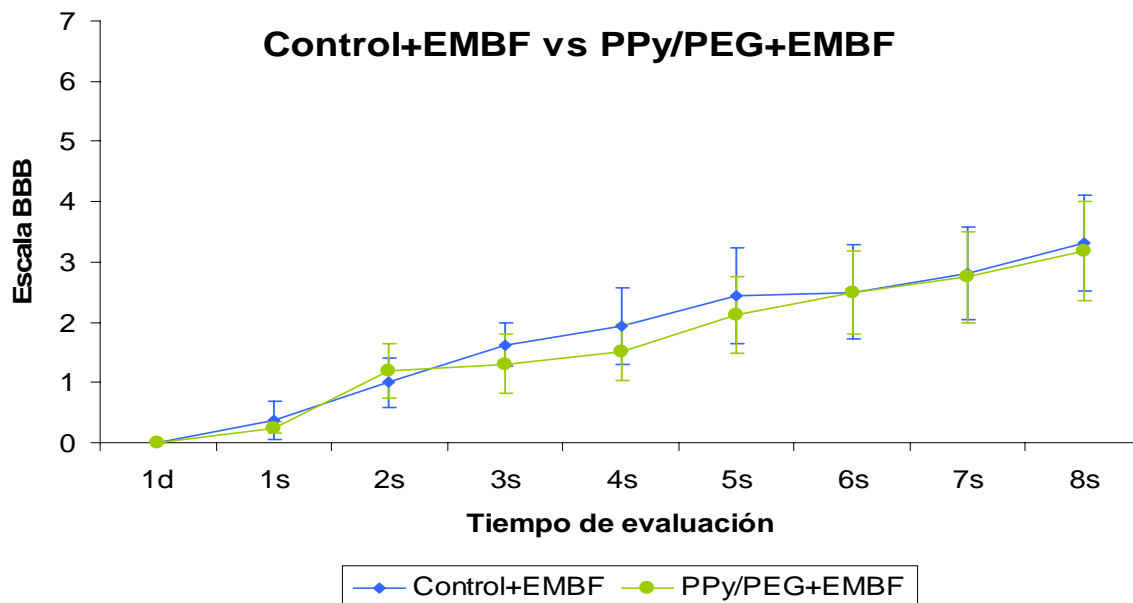
El subgrupo PPy/I+EMBF tuvo un efecto negativo sobre la evaluación funcional al compararlo con la del subgrupo Control+EMBF (Figura 9), mientras que en el caso del grupo con tratamiento PPy/PEG+EMBF no se encontró diferencia significativa alguna en la recuperación motora de los animales de este grupo (Figura 10).



**Figura 28.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control+EMBF y el subgrupo PPy+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 8 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy+EMBF con respecto al subgrupo Control+EMBF.



**Figura 29.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control+EMBF y el subgrupo PPy/I+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 8 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/I+EMBF con respecto al subgrupo Control+EMBF.

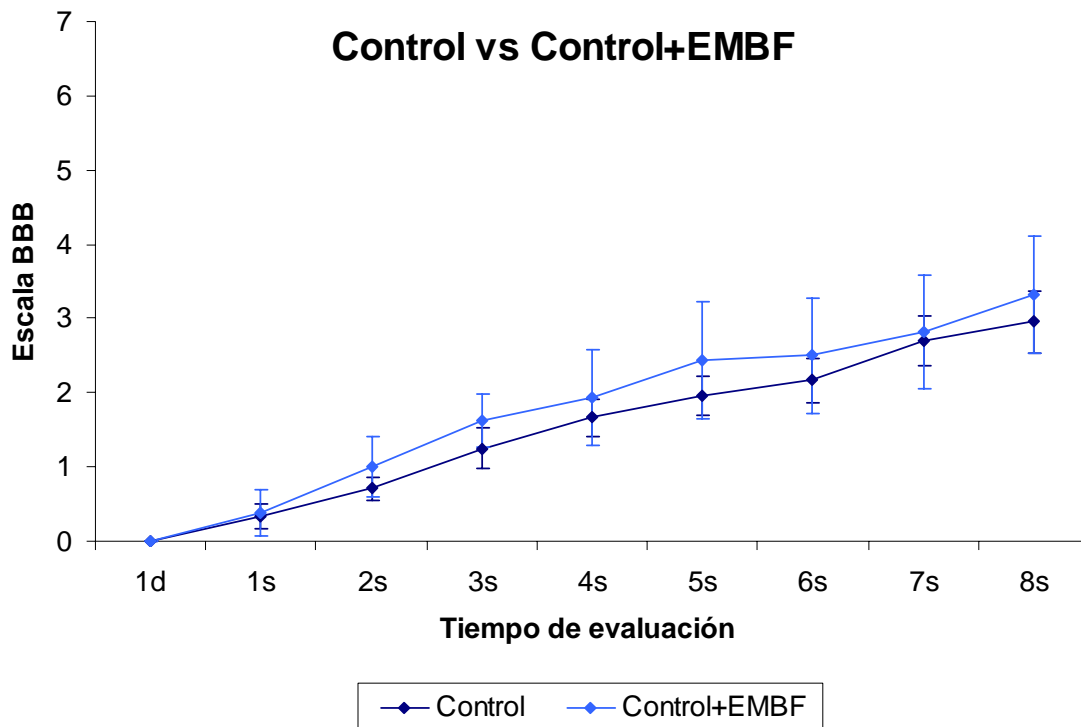


**Figura 30.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control+EMBF y el subgrupo PPy/PEG+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 8 animales por subgrupo. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \* Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/PEG+EMBF con respecto al subgrupo Control+EMBF.

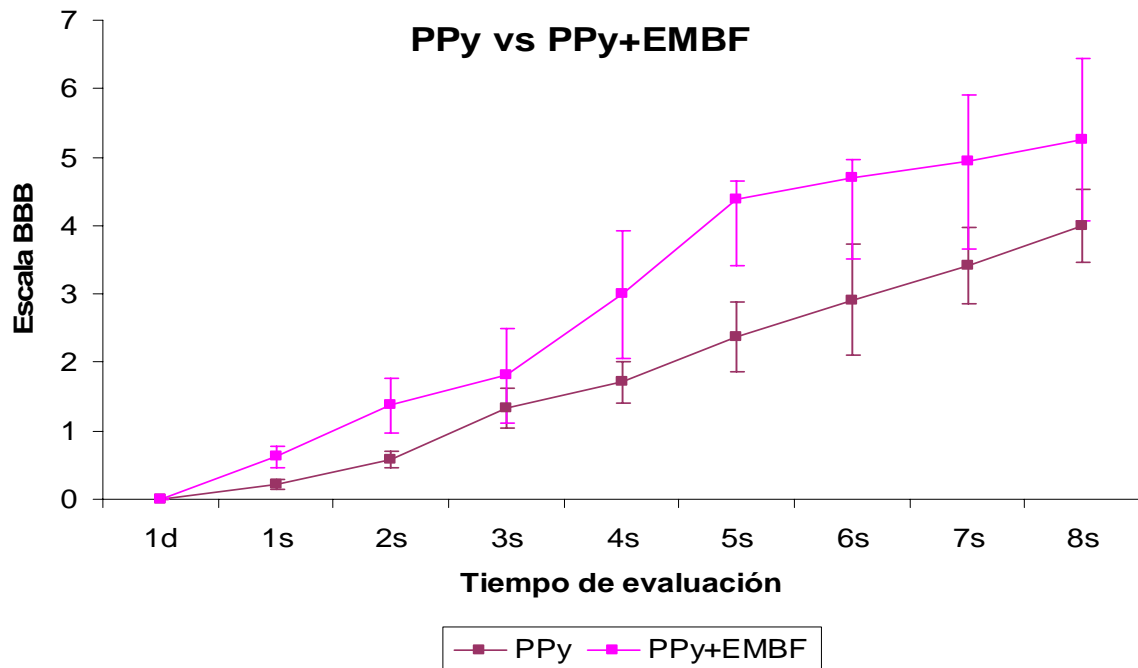
Al realizar comparaciones entre los diferentes subgrupos tanto del Grupo I como del Grupo II se observó, al comparar el subgrupo PPy/I con el subgrupo PPy/I+EMBF (Figura 33), una diferencia estadística con efecto negativo en el modelo lineal general ( $p < 0.022$ ) seguida de la prueba inter-sujetos así como en la prueba T seguida de la prueba de muestras independientes, lo cual significa que el tratamiento con implante de PPy/I tiene efectos adversos sobre la función motora de las extremidades posteriores de los animales que recibieron dicho tratamiento en combinación con EMBF.

Por otro lado, aunque el tratamiento combinado a base de estimulación magnética e implantes de PPy facilita la recuperación funcional motora en las extremidades posteriores de los animales estudiados, no se encontró diferencia significativa al compararlo con aquellos que solo recibieron el implante sin la EMBF (Figura 32).

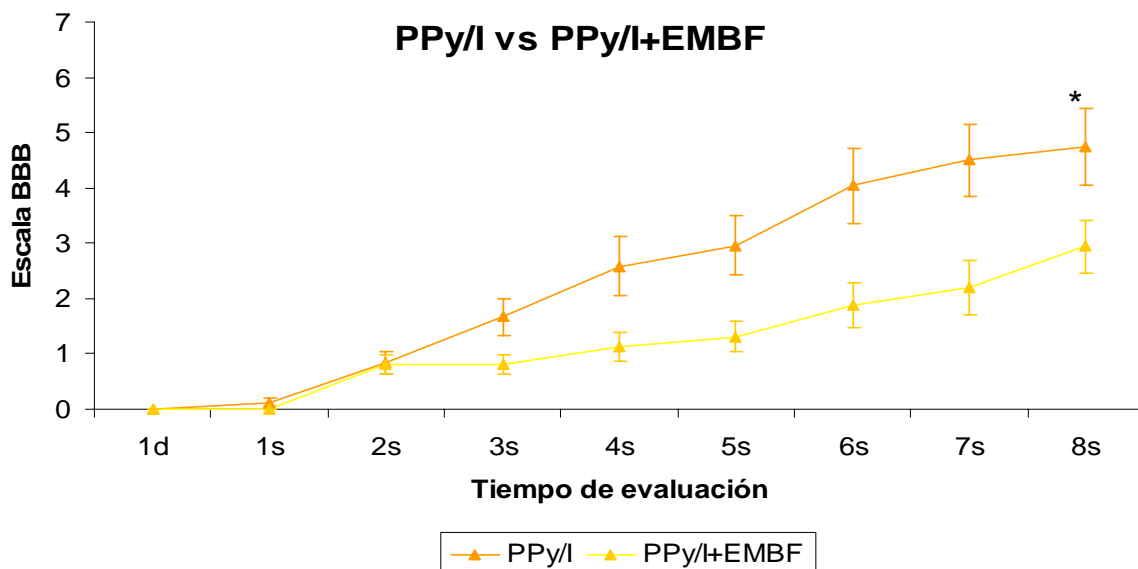
De manera similar, tampoco se encontraron diferencias en la evaluación funcional del subgrupo Control comparada con la del subgrupo Control+EMBF (Figura 31), así como la observada en el subgrupo PPy/PEG en comparación con la del subgrupo PPy/PEG+EMBF (Figura 34).



**Figura 31.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo Control y el subgrupo Control+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  ee de 12 animales para el subgrupo Control y 8 animales para el subgrupo Control+EMBF. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \*Diferencias estadísticas significativas del subgrupo Control con respecto al subgrupo Control+EMBF.

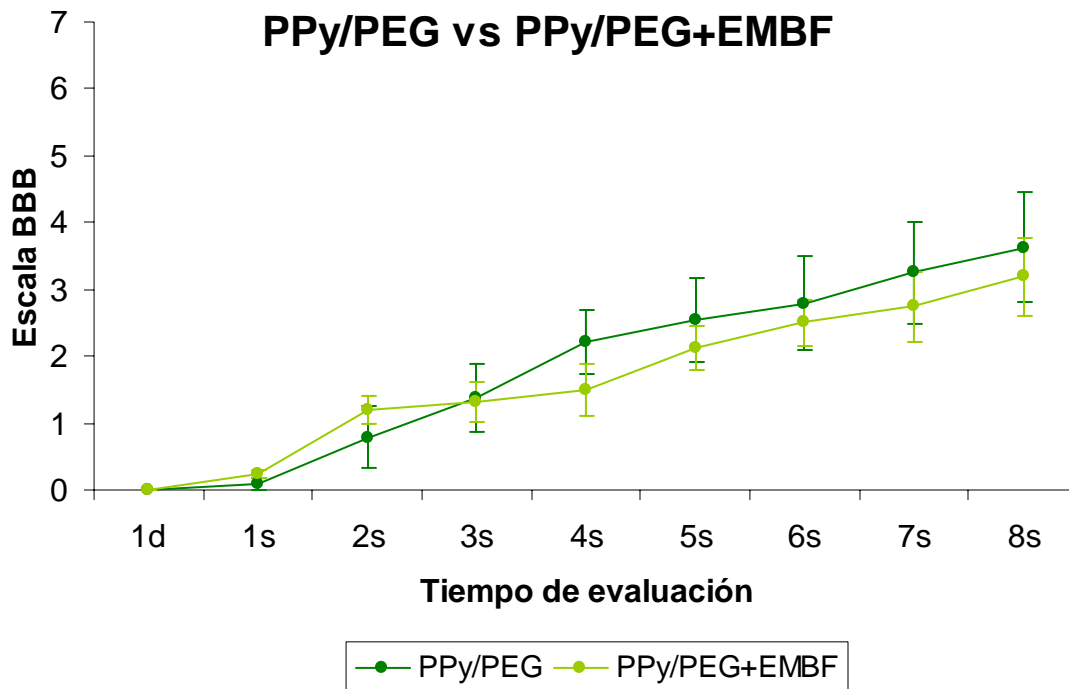


**Figura 32.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo PPy y el subgrupo PPy+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  e.e de 12 animales para el subgrupo PPy y 8 animales para el subgrupo PPy+EMBF. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \*Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy con respecto al subgrupo PPy+EMBF.



**Figura 33.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo PPy/l y el subgrupo PPy/l+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  e.e de 12 animales para el subgrupo PPy/l y 8 animales para el subgrupo PPy/l+EMBF. Modelo lineal general seguida de la prueba inter-sujetos y Prueba T seguida de la prueba de muestras independientes ( $p=0.022$ ). \*Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/l con respecto al subgrupo PPy/l+EMBF.

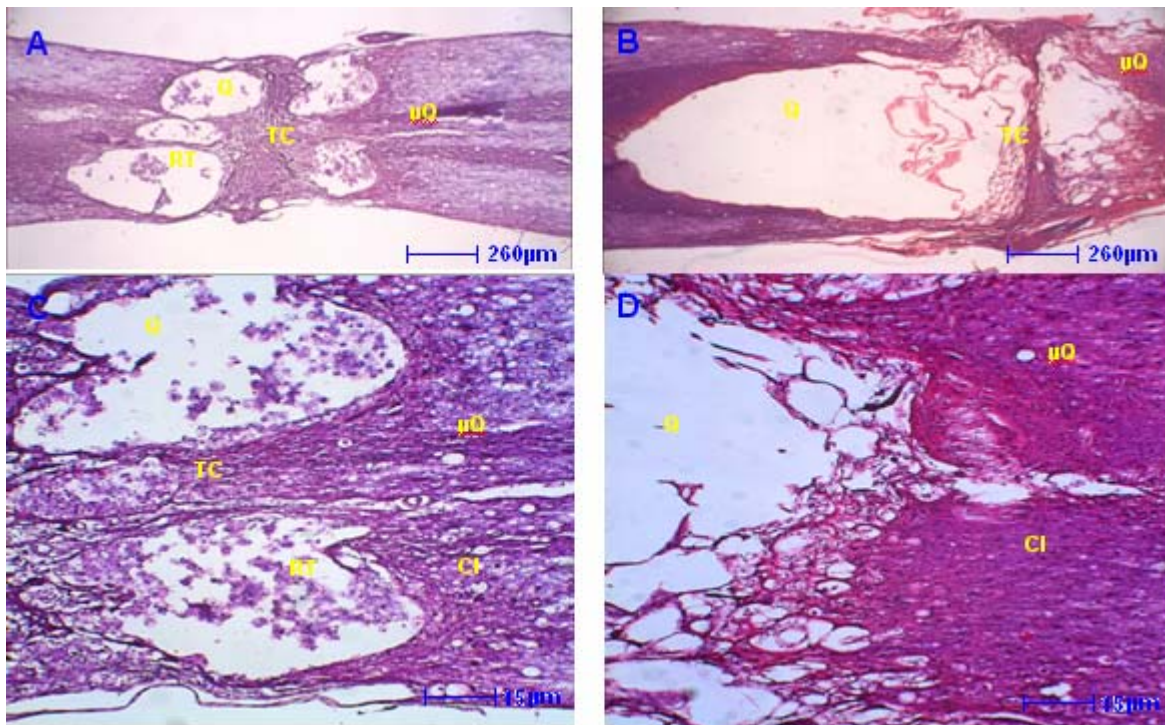




**Figura 34.** Comparación de la recuperación motora en la escala BBB del subgrupo PPy/PEG y el subgrupo PPy/PEG+EMBF. Los resultados son expresados como medias  $\pm$ ee de 12 animales para el subgrupo PPy/PEG y 8 animales para el subgrupo PPy/PEG+EMBF. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. \*Diferencias estadísticas significativas del subgrupo PPy/PEG con respecto al subgrupo PPy/PEG+EMBF.

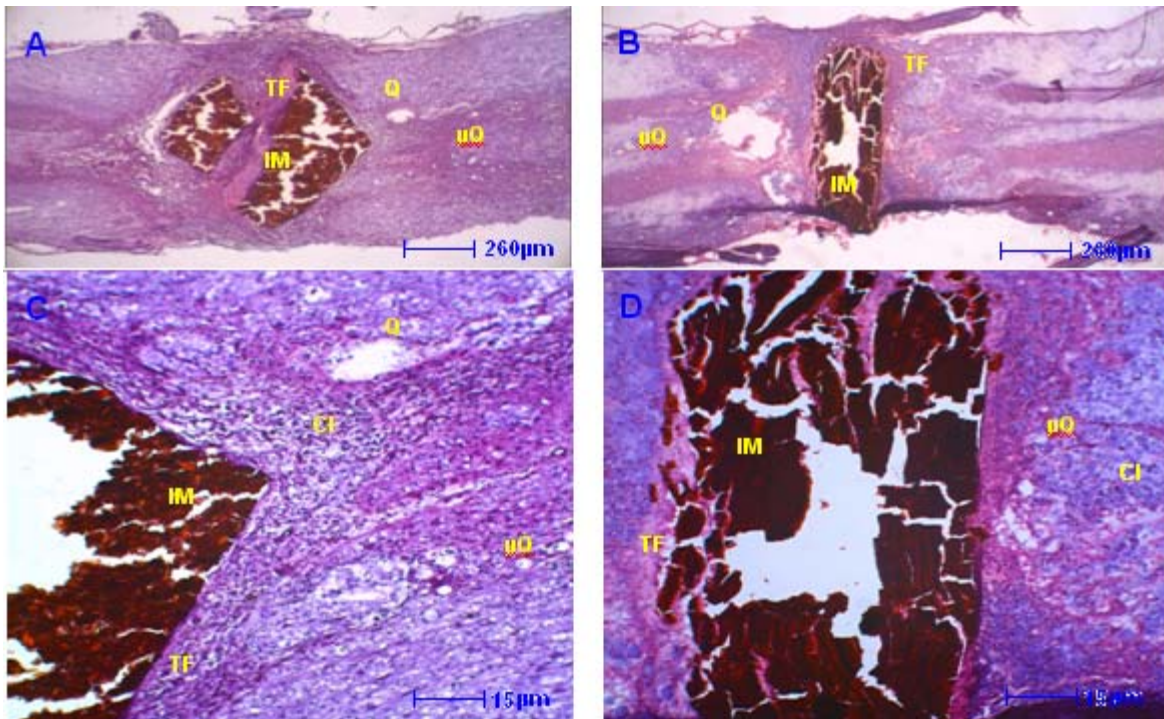
### 6.3. Estudio histológico

Al analizar específicamente el subgrupo control que no recibió tratamiento con EMBF, por lo general se observaron varios quistes de diferente tamaño con restos tisulares (detritus) en su interior, localizados en la región circundante al sitio donde se realizó la LPSCME (Figura 35-A y 35-C), mientras que la porción central del sitio de lesión presentó tejido cicatrizal grueso y en las regiones tanto proximal (cefálica) como distal (caudal) se localizaron microquistes a lo largo de toda la médula espinal. Por otra parte, en el caso del subgrupo control que si recibió tratamiento con campos magnéticos de baja frecuencia (Figura 35-B y 35-D) se observó un gran quiste que ocupaba casi la totalidad del tejido medular circundante al sitio de lesión además de algunos otros quistes de diferente tamaño, separados entre sí por una delgada capa de tejido cicatrizal. Al comparar estos dos subgrupos se observó una mayor destrucción del tejido o parénquima medular y una menor cantidad de células inflamatorias cuando se aplicó la EMBF. (Figura 35-D)



**Figura 35.** Cortes longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión teñidos con hematoxilina y eosina de Harris, del subgrupo control con EMBF (B) y (D) y sin EMBF (A) y (C) , 2.5X y 10X. **Sustancia blanca.** TC → Tejido cicatrizal, TF→Tejido fibroso, Q→Quiste, μQ→Micro quiste, CI→Células inflamatorias, RT→Restos tisulares.

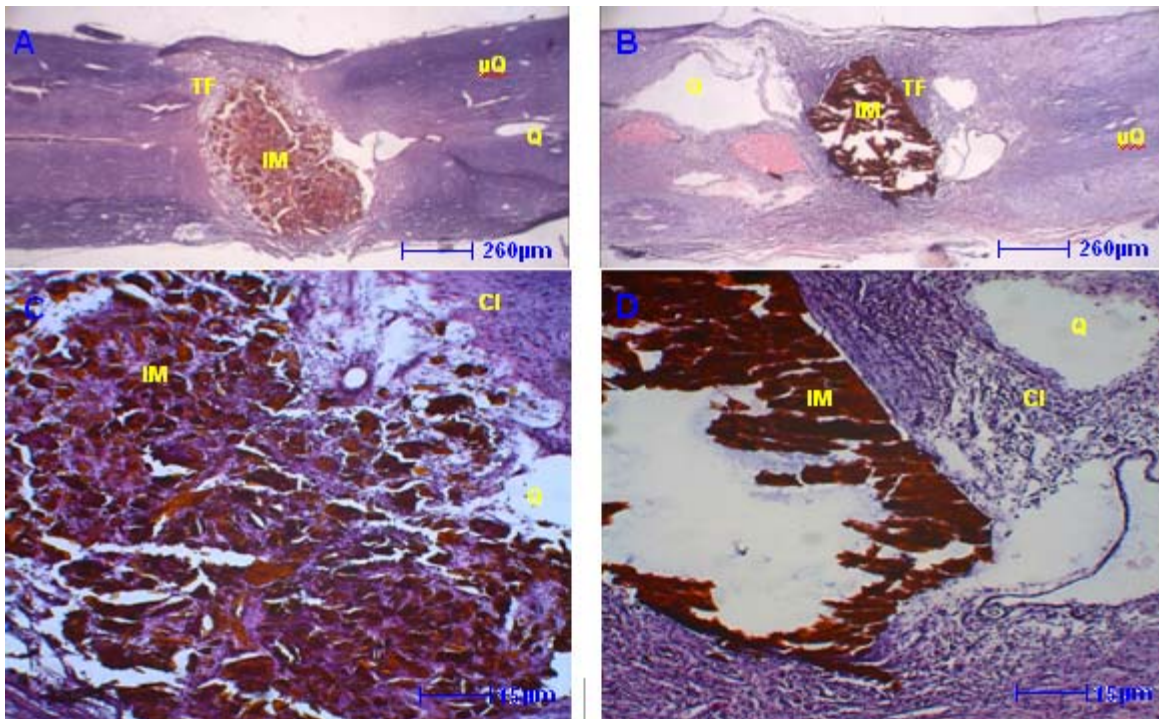
En cuanto a los dos subgrupos que recibieron implantes de PPy con o sin EMBF, por lo general estos presentaron poca destrucción del tejido nervioso caracterizada por la presencia de algunos microquistes a lo largo del parénquima medular (Figura 36). Específicamente en el subgrupo PPy que no recibió estimulación magnética (Figura 36-A y 36-C) se observó fragmentación del implante en la porción central de la lesión donde dichos fragmentos fueron encapsulados por tejido fibroso, se observaron células inflamatorias rodeando el implante e incluso entre los fragmentos del mismo, aunque la cantidad fue mayor en la periferia del material polimérico (Figura 36-C), mientras que en el implante del subgrupo PPy mas EMBF (Figura 36-B y 36-D) se observó una capa de tejido fibrótico rodeando dicho implante además de algunas células inflamatorias y quistes de mediano tamaño en el parénquima medular circundante.



**Figura 36.** Cortes longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión teñidos con hematoxilina y eosina de Harris, del subgrupo PPy con EMBF (B) y (D) y sin EMBF (A) y (C), 2.5X y 10X. TC → Tejido cicatrizal, TF→Tejido fibroso, Q→Quiste, μQ→Micro quiste, CI→Células inflamatorias, IM→Implante.

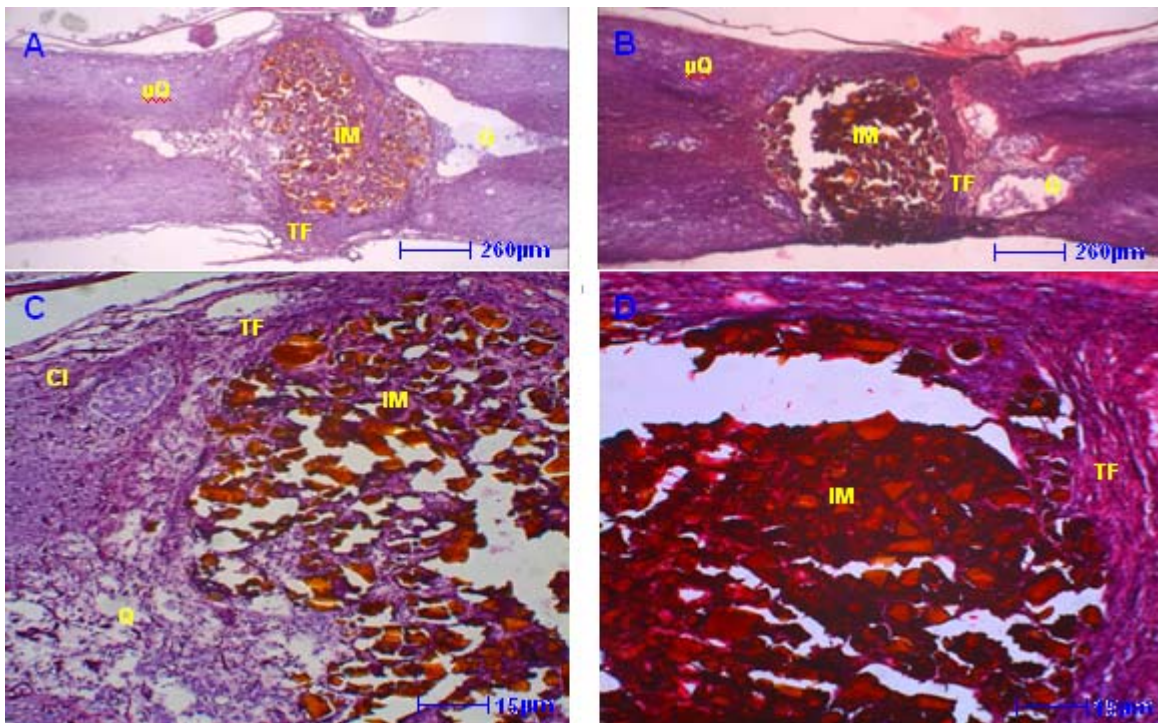
El parenquima medular de los animales que recibieron implantes de PPy/I con o sin estimulación magnética se encontró mejor preservado en la porción central de la médula espinal mientras que los implantes se encontraban rodeados por una capa gruesa de tejido fibroso (Figura 37-A y 37-B). En el subgrupo PPy/I con EMBF se observó una mayor integridad del implante mientras que en el grupo que no recibió dicha estimulación se observó el material polimérico disgregado con tejido y células entre los fragmentos del mismo (Figura 37-C).

El subgrupo PPy/I que recibió EMBF presentó quistes de mediano y gran tamaño en el parénquima medular sin que se observaran fibras o estructuras celulares en el interior del implante (Figura 37-B y 37-D), mientras que el que no recibió la estimulación magnética presentó quistes de diversos tamaños. No obstante lo anterior, al igual que en los otros grupos que recibieron la estimulación magnética, se observó una menor cantidad de células inflamatorias (Figura 37-D).



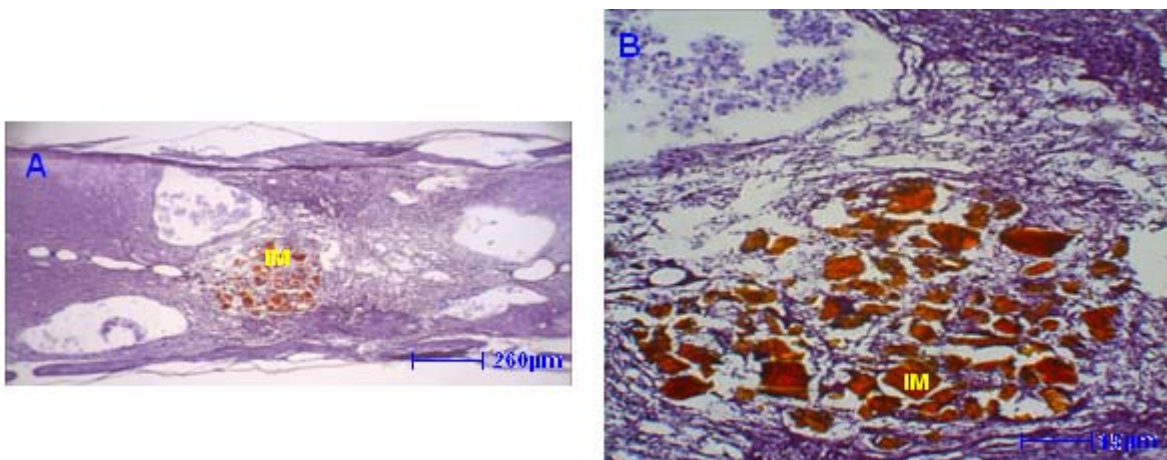
**Figura 37.** Cortes longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión teñidos con hematoxilina y eosina de Harris, del subgrupo PPy/I con EMBF (B) y (D) y sin EMBF (A) y (C), 2.5X y 10X. TC → Tejido cicatrizal, TF→Tejido fibroso, Q→Quiste, μQ→Micro quiste, CI→Células inflamatorias, IM→Implante.

Los implantes de lo subgrupos PPy/PEG con (Figura 38-B y 38-D) o sin (Figura 38-A y 38-C) estimulación magnética se encuentran disgregados y entre los fragmentos se observa tejido aparentemente fibrótico el cual continua hasta formar una capa que rodea parcialmente la zona del implante. En la porción caudal y distal se localizan quistes de diferente tamaño y microquistes en las partes mas distales. En el subgrupo que recibió EMBF se observó una mayor cantidad de tejido aparentemente fibroso y una menor cantidad de células inflamatorias (Figura 38-B y 38-D) con respecto al grupo que no recibió dicha estimulación.



**Figura 38.** Cortes longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión teñidos con hematoxilina y eosina de Harris, del subgrupo PPy/PEG con EMBF (B) y (D) y sin EMBF (A) y (C), 2.5X y 10X. TC → Tejido cicatrizal, TF→Tejido fibroso, Q→Quiste, μQ→Micro quiste, CI→Células inflamatorias, IM→Implante.

Por otra parte, en el subgrupo que recibió implantes de PPy/PEG sin EMBF se observó que el 25% de los implantes se absorbió completamente y que el 12.5% se encontraba en proceso de absorción al término del estudio. En las figuras 39-A y 39-B se puede observar los restos del implante rodeado de tejido fibroso y quistes de diferente tamaño a lo largo del parénquima medular.



**Figura 39.** Cortes longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión teñidos con hematoxilina y eosina de Harris, del subgrupo PPy/PEG (A) y (B) en proceso de absorción. IM→Implante.

## 6.4. Análisis morfométrico del sitio de lesión e implante

Para evaluar la integración de los implantes poliméricos al tejido medular, a los 80 animales incluidos en el experimento se les midió en los respectivos cortes histológicos, el tamaño de los quistes y la cantidad de fibrosis que se formó dos meses después de la LPSCME y el implante de los polímeros correspondientes (Tabla 7) observándose el mayor porcentaje de quistes en el subgrupo Control+EMBF y el menor en el subgrupo PPy+EMBF y la mayor cantidad de tejido preservado en este mismo grupo y en el que recibió PPy/I pero sin estimulación magnética.

**Tabla 7.** Análisis morfométrico del sitio de lesión por sección completa de la médula espinal e implante de diferentes polímeros. Los resultados se muestran en porcentajes. El 100% esta conformado por el tamaño total de la médula en imágenes de microscopía óptica a 2.5X

| Subgrupo       | Quiste | Fibrosis | Implante | Tejido preservado |
|----------------|--------|----------|----------|-------------------|
| Control        | 23     | 15       | -----    | 62                |
| PPy            | 7      | 13       | 15       | 65                |
| PPy/I          | 3      | 8        | 15       | 74                |
| PPy/PEG        | 7      | 8        | 19       | 66                |
| Control + EMBF | 57     | 8        | -----    | 35                |
| PPy + EMBF     | 2      | 19       | 9        | 70                |
| PPy/I + EMBF   | 15     | 12       | 11       | 62                |
| PPy/PEG + EMBF | 6      | 8        | 22       | 64                |

En el Grupo I (n = 48 animales), se encontró que los subgrupos que no recibieron EMBF y que recibieron cualquiera de los implantes poliméricos presentaron una menor destrucción del tejido nervioso y una disminución en la cantidad de tejido cicatrizal (fibrosis) en comparación con el subgrupo control, observándose un efecto benéfico en estos dos aspectos al utilizar este tipo de implantes después de una LPSCME.

Por otra parte, en el Grupo II (n = 32 animales), al aplicar el tratamiento combinado de implantes poliméricos más EMBF, se observó una menor destrucción del parénquima medular al compararlos con el subgrupo Control+EMBF. Respecto a la formación de quistes, se encontró que en los subgrupos PPy+ EMBF y PPy/PEG+EMBF la formación de los mismos era mínima, mientras que el subgrupo PPy/I+EMBF mostró un gran número de quistes de diferente tamaño (Figuras 35-39).

Aunque los animales que recibieron implantes de PPy con o sin EMBF generaron una mayor cantidad de tejido fibrotico, estos presentaron una buena recuperación funcional usando la escala BBB. En contraste, los animales que recibieron implantes de PPy/I combinados con EMBF presentaron un incremento en el grosor

de la cicatriz glial y su recuperación motora en las extremidades posteriores fue más baja. Cuando este tipo de implantes no se combinó con EMBF el tejido fibroso disminuyó y la recuperación motora aumentó significativamente ( $p < 0.022$ ). En el caso de los animales que recibieron implantes de PPy/PEG no se generaron cambios significativos a nivel funcional independientemente de si recibieron o no la estimulación magnética.

## 6.5. Medición de calcio

En base a que los resultados obtenidos con la EMBF no fueron favorables cuando este procedimiento se combinó con el implante de PPy/I, al término del estudio a los animales seleccionados se les realizaron mediciones de calcio por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica con el fin de valorar las concentraciones del ion en el suero sanguíneo, para verificar si al estimular magnéticamente al animal, estas concentraciones se incrementan tanto por los mecanismos secundarios de lesión como por la EMBF combinada con las propiedades físicas del PPy/I.

Es importante mencionar que la entrada masiva de calcio al interior de la célula tiene un efecto neurotóxico siendo esto perjudicial para la recuperación del tejido nervioso y por ende para la recuperación funcional.

Los resultados (Tabla 8) indican que al estimular magnéticamente a los animales, las concentraciones de calcio se incrementan significativamente en el subgrupo Control+EMBF y en el de PPy/I+EMBF en comparación a animales que no fueron sometidos a ningún tratamiento quirúrgico.

Estos resultados se pueden contrastar con los obtenidos en la recuperación funcional y la preservación del tejido nervioso de los subgrupos Control+EMBF y PPy/I+EMBF, ya que se pudo observar que estos grupos obtuvieron una menor recuperación funcional y la mayor destrucción del tejido nervioso cuando recibieron EMBF (Figura 24, 35 y 37). Mientras que el subgrupo PPy+EMBF mostró poco incremento en las concentraciones de  $Ca^{++}$  en comparación con los animales que no fueron sometidos a ningún tratamiento quirúrgico.

**Tabla 8.** Concentraciones de calcio

| <b>Subgrupo experimental</b>                 | <b>Concentración de <math>Ca^{++}</math> en microgramos por mililitro (<math>\mu gCa/ml</math>)</b> | <b>Incremento de la concentración de <math>Ca^{++}</math> (%) 15 días después de la lesión</b> |
|--|---|--|
| Animales sin ningún procedimiento quirúrgico | 5   | 0  |
| Control                                      | 10.3  | 106  |
| PPy+EMBF                                     | 5.9   | 19   |
| PPy/I+EMBF                                   | 10.5  | 109  |
| PPy/PEG+ EMBF                                | 7.2   | 45   |

## 7. Discusión

---

### 7.1. Efecto de diferentes implantes poliméricos en lesión por sección completa de la médula espinal

#### 7.1.1. Evaluación funcional y estudio histológico

En el presente trabajo se estudió el efecto de tres diferentes implantes poliméricos a base de PPy (PPy, PPy/I y PPy/PEG) sintetizados por plasma en un modelo de LPSCME en ratas. Los resultados indican que los implantes de PPy y el implante derivado de este: PPy/I tiene un efecto neuroprotector, lo cual se ve reflejado en la baja destrucción del parénquima medular a dos meses después de la LPSCME.

Los animales que recibieron cualquiera de los tres implantes poliméricos presentaron un efecto favorable por parte del hospedero, observándose menor infiltración de células inflamatorias en el epicentro de la lesión y en las zonas adyacentes por lo que se redujo la formación de cavidades o quistes y la muerte neuronal en comparación con el grupo de animales que solo fue sometido a la LPSCME.

Los resultados obtenidos con los implantes de PPy/I y PPy/PEG en este trabajo concuerdan con lo observado en un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el cual se demostró un efecto neuroprotector en los animales que recibieron implantes de PPy/I después de la LPSCME, observándose además una recuperación funcional significativa en comparación a los animales del grupo control [53][54]. En el caso del implante de PPy/PEG, otros estudios han demostrado que este tipo de biomaterial posee propiedades neuroprotectoras [53][54][62] debido a su capacidad para detener el daño en la membranas celulares y por su capacidad para atenuar el estrés oxidativo en lesiones del sistema nervioso central [62]. Más aún, se ha demostrado una reducción en el volumen de la cavidad quística y una discreta recuperación funcional en otros modelos experimentales de lesión de médula espinal [53] [54] [64] [65].

Es posible que el efecto benéfico de los implantes poliméricos que se utilizaron en el presente trabajo se deba a que estos fueron sintetizarlos por el método de polimerización por plasma, con lo que dichos polímeros presentan triples ligaduras presentes en las vibraciones del espectro de absorción de IR en el intervalo 2210-2250 $\text{cm}^{-1}$ , las cuales, corresponden al grupo nitrilo  $\text{C}\equiv\text{N}$  [53]. La importancia de este hecho radica en que estas triples ligaduras pueden actuar como atrapadores de



radicales libres o como antioxidantes permitiendo una reducción en el proceso de lipoperoxidación y por ende una mejor recuperación funcional en los animales.

Cabe resaltar que este efecto sólo se observa cuando los polímeros son sintetizados por plasma y no por métodos químicos o electroquímicos ya que la síntesis por plasma estabiliza directamente las triples ligaduras inestables del polímero, efecto que no sucede cuando se utilizan otros métodos de síntesis.

Por otra parte, se observó que la absorción de nitrógeno es más intensa en el PPy/I [53], lo cual podría explicar el efecto positivo sobre la recuperación funcional y la menor destrucción del tejido que se obtuvieron al implantar este polímero en comparación a lo observado con el implante de los otros dos materiales poliméricos (PPy y PPy/PEG).

Aunque los implantes poliméricos fueron insertados en forma de pastilla, estos se disgregaron y al término de los 2 meses de seguimiento se observaron células e incluso tejido entre los fragmentos del mismo. Sin embargo, no se pudo comprobar el tipo celular ni el tipo de tejido presentes.

A pesar de que la preservación del tejido nervioso fue mejor al hacer uso de cualquiera de los tres implantes poliméricos en comparación con lo observado en el grupo control, la recuperación funcional en las extremidades posteriores de los animales estudiados fue diferente en cada uno de los grupos. Esto puede deberse a que la interacción eléctrica entre las células neuronales y los diferentes polímero es distinta, debido a que la conductividad eléctrica no es igual en todos los polímeros.

Específicamente, al utilizar los implantes de PPy la recuperación motora fue significativa al compararla con la observada en el subgrupo de animales control que solamente fueron lesionados pero que no recibieron tratamiento alguno. Sin embargo, el efecto favorable que se presentó al utilizar este tipo de implante era esperado, ya que los implantes derivados del pirrol han tenido buenos resultados, en nuestra experiencia, sobre la recuperación funcional y la protección del tejido nervioso en lesiones similares [53] [54].

Por otra parte, es probable que el incremento en la conductividad eléctrica pueda ser responsable de que los animales que recibieron implantes de PPy/I mostraran la mayor recuperación motora, ya que este biomaterial presenta mayor conductividad con respecto a los otros implantes poliméricos probados.

No obstante lo anterior, el polímero PPy/PEG no es considerado como un conductor de electricidad porque presenta una resistencia en el orden de  $G\Omega$ ; Aún cuando en la evaluación morfométrica se observó poca destrucción del tejido nervioso y presencia de cuerpos celulares entre los fragmentos del polímero implantado, la recuperación funcional no fue significativa en comparación a los

animales que solo fueron sometidos a la LPSCME, probablemente debido a la falta de interacción eléctrica entre las células neuronales y el polímero y porque este es un biomaterial degradable, lo cual no permite una interacción prolongada con el tejido nervioso. En este contexto es importante mencionar que los implantes de PPy/PEG se reabsorbieron en un 25% del total de los animales implantados y en el 12.5% el implante estaba en proceso de reabsorción, resultados que se contraponen a lo reportado en un trabajo previo en el que es posible que el material no se reabsorbiera porque el tiempo de estudio fue menor (1 mes) al aquí reportado y a que el polímero fue implantado en forma de laminillas y no como en el presente trabajo en forma de pastilla [53].

### 7.1.2. Polímeros sintetizados por plasma

La ventaja de utilizar materiales artificiales consiste en la posibilidad de modificar sus propiedades físicas y químicas para desarrollar implantes capaces de reemplazar la función de diferentes tejidos sin repercusiones biológicas como la inflamación. Sin embargo, en LTME los resultados obtenidos han sido modestos al utilizar diferentes tipos de implantes sintéticos. Esto puede deberse directamente al tipo de material utilizado o al método de síntesis que se usó para su elaboración.

Debido a que la síntesis del pirrol y sus derivados comúnmente se lleva a cabo por medio de métodos químicos o electroquímicos, los polímeros obtenidos por estos métodos deben ser cuidadosamente purificados antes de ser utilizados en algún sistema biológico a raíz de las impurezas y a la contaminación con solventes atrapados y reactivos catalíticos entre las cadenas, lo cual puede tener efectos colaterales en los sistemas biológicos, como incremento en la respuesta inflamatoria y en los procesos degenerativos [53]. Diferentes implantes poliméricos como el de colágeno y el de agarosa a pesar de haber mostrado resultados favorables parciales después de una LTME al ser implantados no tuvieron éxito debido a la citotoxicidad que se presentó semanas más tarde [55] [57] [59] [61]. Más aún, en el caso de la agarosa esta tiene que pasar por diferentes procesos de purificación antes de su uso, por consiguiente el tratamiento es muy costoso y poco viable en este tipo de lesiones [61].

Se ha descrito al plasma como agente ionizante para la generación de iones, electrones, fotones y moléculas en estado de excitación electrónica y por ello constituye una alternativa para promover la propagación de la polimerización reactiva libre de contaminantes (reactivos catalizadores). Lo anterior se debe a que al inicio de la polimerización sólo participan los monómeros iniciales y en el siguiente paso productos como oligómeros y polímeros con diferente peso molecular [88]. Como todas las especies químicas involucradas en este tipo de procesos son derivadas de las mismas moléculas del monómero, no existe contaminación con otras sustancias y la potencial respuesta inflamatoria en las

zonas de implante esta limitada prácticamente a sustancias derivadas de las combinaciones monoméricas [53]. Por lo que los materiales sintetizados por plasma son una alternativa real en el desarrollo de nuevos biomateriales [54] [89] [90] con la capacidad de interactuar con el tejido nervioso.

Aún cuando algunos biomateriales como los hidrogeles han tenido resultados favorables sobre la recuperación funcional y la protección del tejido nervioso [66] [67] [68] similares a los obtenidos con polímeros semiconductores sintetizados por plasma y derivados del pirrol en LTME, los hidrogeles muestran dichos resultados benéficos comúnmente tres meses después de la lesión, [52] [68] siendo biodegradables la mayoría de estos materiales por lo que es posible que al no estar en contacto mas tiempo con el tejido medular, el efecto se pierda y el tejido y la función deje de recuperarse. Así mismo, los hidrogeles que han tenido resultados benéficos más destacados se han utilizado en combinación con otros tratamientos [52] [68]; por lo que estos materiales por si solos podrían no tener una respuesta significativa.

## 7.2. Efecto de la estimulación magnética de baja frecuencia y el implante de polimeros derivados del pirrol en lesión por sección completa de la médula espinal

### 7.2.1. Evaluación funcional y estudio histológico

A pesar del efecto benéfico que tienen los implantes poliméricos sintetizados por plasma sobre la recuperación funcional y la protección del tejido nervioso después de una LPSCME [53] [54], existen importantes limitaciones para controlar todos los mecanismos de lesión secundaria presentes en esta patología o para estimular eficazmente los procesos de regeneración en el sistema nervioso central. Por lo anterior, se planteo la posibilidad de combinar el implante de un polímero derivado del pirrol con otra estrategia terapéutica que potencialmente incrementara el efecto benéfico obtenido con los biomateriales, seleccionando para ello a la estimulación magnética de baja frecuencia debido a que a nivel experimental ha demostrado su capacidad para favorecer tanto la neurogénesis *in vitro* [96] [97] [100] [105] como la recuperación motora *in vivo* en otras condiciones experimentales [80] [122], pero con potencial aplicación en lesiones de médula espinal.

En base a lo previamente descrito, se exploró la posible existencia de un efecto sinérgico entre los implantes de polímeros sintetizados por plasma y la estimulación con campos magnéticos de baja frecuencia. Lo anterior fue valorado cuidadosamente debido a que nunca se había reportado el uso de estimulación

magnética en LPSCME sola ni en combinación con algún implante polimérico. Al realizar esta combinación y contrario a lo que se esperaba, resultó ser que los campos magnéticos anularon los efectos benéficos de los implantes de PPy/I debido, probablemente, a efectos térmicos dañinos que pudieron causar sobrecalentamiento del implante y del tejido adyacente lo que condujo a la muerte celular. Es así que el subgrupo que recibió el implante de PPy/I y la estimulación magnética de baja frecuencia (PPy/I+EMBF) mostró diferencias estadísticas con efecto negativo sobre la recuperación funcional, al compararlo con el subgrupo PPy/I ( $p=0.022$ ). Es probable que el efecto negativo que se presentó al estimular magnéticamente a los animales implantados con PPy/I, esté dado porque al ser muy baja la energía de los campos magnéticos, la absorción de la onda electromagnética no tuvo suficiente poder energético para ionizar a las moléculas, pero si para transformarse en energía rotatoria, lo cual produjo aumento de la temperatura corporal, misma que se distribuyó irregularmente [94], y debido a que el yodo como dopante del PPy aumenta la conductividad del material al interactuar con el agua, el PPy/I al estar en contacto con el líquido cefalorraquídeo después de ser implantado en la médula espinal, este incrementó su conductividad y por ende la temperatura al interior de las células lo cual provocó muerte celular, pérdida del tejido nervioso y disminución en la recuperación funcional.

Cuando la estimulación magnética de baja frecuencia se empleo en combinación con implantes de PPy/PEG, no se presentó efecto adverso alguno sobre la recuperación funcional de los animales, probablemente debido a que el polímero PPy/PEG no es un biomaterial conductor y por lo tanto no se sobrecalienta en presencia de la estimulación magnética de baja frecuencia.

Sin embargo, el tratamiento con implante de PPy/PEG más estimulación magnética (PPy/PEG+EMBF) no mostró cambios en la recuperación funcional ni diferencia estadística al compararlo con el subgrupo PPy/PEG y Control+EMBF, aunque el implante de PPy/PEG sí presentó un efecto neuroprotector con o sin la aplicación de la EMBF lo cual se vió reflejado en el menor daño observado en el tejido nervioso, en la reducción en la formación de cavidades o quistes y en la disminución de la proliferación de células inflamatorias. Esto puede deberse a que el tejido nervioso está conformado en un 80% por lípidos y por ello, la conductividad y la permeabilidad eléctrica son bajas al estimular magnéticamente [94]. Es decir, si el material no es conductor y la conductividad del tejido medular es baja, no se presenta conducción y por ende no se presentan cambios en la recuperación funcional del subgrupo PPy/PEG al compararlo con el subgrupo PPy/PEG+EMBF, aún y cuando el tejido este preservado.

A pesar de que dos meses después de la LPSCME el tratamiento combinado con implante de PPy más estimulación magnética de baja frecuencia (PPy+EMBF), no mostró diferencia significativa en la recuperación de la función motora al compararlo con el del subgrupo Control+EMBF, los implantes de PPy con o sin

EMBF presentaron la mejor recuperación funcional observada en el presente estudio.

En cuanto a los efectos de la EMBF ejercen sobre las células inflamatorias, en estudios *in vitro* se ha observado reducción de la proliferación de células inmunitarias como los linfocitos [94] y otros estudios han demostrado un incremento en la proliferación de macrófagos y liberación de radicales libres [124] [125] [126]. Se sabe que la presencia de macrófagos se encuentra asociada con el proceso de fagocitosis y con la formación de especies reactivas de oxígeno, lo cual puede causar daño al ADN, generando inestabilidad genómica [124] [125] [123]. Sin embargo, en el presente estudio, se observó que *in vivo* los campos magnéticos disminuyen la proliferación de células inflamatorias como los macrófagos después de una LPSCME con o sin implante polimérico.

### 7.2.2. Efecto de la estimulación magnética de baja frecuencia en lesión por sección completa de la médula espinal

Diferentes autores han postulado que el efecto de la EMBF depende del arreglo de bobinas y de la dirección del campo sobre el sitio de la lesión tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [119] [120]. Debido a que Walter y colaboradores (2004) propusieron que la dirección del campo magnético debe ser perpendicular a la médula espinal o al nervio para que se presenten efectos benéficos [90], en el presente trabajo se utilizó un arreglo de bobinas Helmholtz con una intensidad de campo de 0.7mT a 60Hz y con dirección perpendicular. No se intentó una intensidad de campos mayor, porque los implantes empleados en esta investigación son conductores de electricidad y se podrían haber generado efectos térmicos con consecuencias como hipertermia, quemaduras en los animales, necrosis o muerte celular [94].

Si la EMBF que se utilizó en este trabajo de investigación, no obtuvo los resultados esperados puede deberse a que la intensidad de campo magnético utilizada no fue la correcta para este modelo experimental en particular, o bien, debido a que en los estudios *in vivo* e *in vitro* en los que nos basamos para la presente propuesta, las células interactúan y reaccionan de forma diferente cuando están en cultivo dependiendo de múltiples variables como la de la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Lo cierto es que los efectos reportados en la literatura difieren de un estudio a otro en mayor o menor grado. Aunado a lo anterior, los sistemas biológicos poseen sensores que detectan directamente los campos magnéticos de baja frecuencia y estáticos, entre estos sensores se encuentran la magnetita (óxido ferroso) y el  $\text{Ca}^{++}$  [126], por lo que es posible que al igual que en los experimentos *in vitro*, el  $\text{Ca}^{++}$  incremente sus concentraciones citosólicas al estimular magnéticamente las moléculas y los lípidos de la

membrana plasmática [94] [127]. Se ha demostrado que cuando se presenta una lesión de la médula espinal se produce una desregularización iónica, la cual genera una despolarización de la membrana de la neuronas sobrevivientes, provocando con ello que los canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje se abran e ingresen grandes cantidades de dicho ión a la célula [43], por lo que, la combinación de ambas estrategias podría producir efectos adversos, ya que tanto la LPSCME como la EMBF incrementan las concentraciones de  $Ca^{++}$  al interior de la célula provocando de este modo, mayor muerte celular y por ende mayor destrucción del tejido nervioso. Debido a lo antes mencionado, se realizó mediciones de  $Ca^{++}$  por espectrofotometría de absorción atómica en suero sanguíneo para valorar si el incremento de este ión a nivel sistémico podría tener un efecto tóxico, el cual podría repercutir en la recuperación del tejido nervioso y sobre la recuperación funcional. Los resultados mostraron que el subgrupo Control+EMBF y PPy/I+EMBF incrementaron sus concentraciones de  $Ca^{++}$  en un 105% y 109% respectivamente, en comparación con animales que no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico. Este se vio reflejado en el hecho de que los animales de estos subgrupos presentaron mayor destrucción del tejido nervioso y una baja recuperación funcional. Sin embargo, el subgrupo PPy+EMBF en el cual, no se presentó un incremento significativo en las concentraciones de  $Ca^{++}$ , la recuperación funcional y la preservación del tejido nervioso fue favorable.

Por otro lado, se ha demostrado que la EMBF en presencia de iones de  $Fe^{++}$  pueden incrementar las concentraciones de radicales libres e inducir la ruptura de las cadenas de ADN provocando la muerte celular. Esto es un factor importante porque a que el sistema nervioso central es particularmente susceptible al daño causado por los radicales libres [128] [129]. Más aún, dentro de los mecanismos secundarios de lesión, la lipoperoxidación es uno de los principales causantes de la pérdida neuronal debido a que las membranas celulares del sistema nervioso son ricas en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados lo cual constituye un blanco perfecto para los radicales libres incrementando la degeneración y la muerte neuronal. Lo anterior se vio reflejado en los animales del subgrupo Control+EMBF, puesto que la necrosis y las cavidades o quistes que se formaron después de la lesión fueron de mayor tamaño al compararlos con los de los otros grupos; y puesto que la presencia de células inflamatorias era mínima en estos animales, es posible que las cavidades se hayan formado por lipoperoxidación y por efecto de la glia reactiva.

## 8. Conclusiones

---

Los implantes poliméricos de PPy y sus derivados, sintetizados por plasma, ejercen un efecto neuroprotector caracterizado por una menor destrucción del parénquima medular, disminución de tejido necrótico, reducción de la presencia de células inflamatorias y una mayor recuperación funcional en comparación a los animales con LPSCME.

El tratamiento combinado de implantes de PPy más EMBF tienen un efecto positivo en la recuperación funcional y en la preservación del tejido nervioso mientras que la combinación de EMBF con implantes de PPy/I produce un efecto negativo en ambos aspectos, probablemente debido al incremento en la conductividad por la presencia del yodo, lo cual genera hipertermia en el tejido medular y muerte del mismo.

Los implantes de PPy/PEG no ejercieron efectos significativos positivos ni negativos sobre la recuperación funcional cuando se comparan con los subgrupos Control y/o Control+EMBF debido a que el PPy/PEG no es un polímero conductor de electricidad; Sin embargo es un material con propiedades de neuroprotección el cual, si se usa con otras estrategias podría tener buenos resultados.

El incremento de las concentraciones de  $Ca^{++}$  intracelular en los subgrupos Control+EMBF y PPy/I+EMBF tiene efectos negativos sobre la recuperación funcional y la preservación del tejido nervioso, mientras que en el grupo con implante de PPy+EMBF las concentraciones de  $Ca^{++}$  disminuyeron y no se observaron efectos negativos ni histológicos ni funcionales.

La EMBF reduce la proliferación y/o migración de células inflamatorias con o sin implante en el sitio de LPSCME *in vivo*.

Por lo anterior se deberá tomar en cuenta las características físico-químicas específicas de los polímeros a implantar y los posibles efectos que sobre estos ejerzan no solo el hospedero o receptor del implante, si no también las otras alternativas terapéuticas que se llegue a utilizar en conjunto.

## 9. Perspectivas

---

- Estudiar la Influencia del campo magnético sobre la regeneración axonal después de un implante de polímero semiconductor en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal a diferentes intensidades y periodos de tiempo.
- Hacer uso de polímeros semiconductores derivados del pirrol sintetizados por plasma en LTME en combinación con otras estrategias terapéuticas para incrementar su efecto benéfico como implantes en lesiones medulares.
- Explorar el uso de otros biomateriales poliméricos como implantes en LTME para restablecer la función neurológica.
- Estudiar otras estrategias terapéuticas para restablecer la función neurológica.



# Bibliografía

---

1. Guyton A.C. (1987) Fisiología Humana. McGraw-Hill, México
2. Lockhart RD., Hamilton GF., Fyfe FW. (1995) Anatomía Humana Interamericana McGraw-Hill, México
3. Alcaraz RV. (2001) Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. Editorial el manual moderno, México
4. Paulsen DF. (1991) Histología Básica. Editorial el manual moderno, México
5. Díaz RA. (2003) Efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la sintasa del oxido nítrico en tejido medular de rata. Tesis de Doctorado UNAM, México
6. Guyton A. C. (1994) Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Editorial médica panamericana, México
7. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T M. (1997) Neurociencia y conducta. Prentice Hall, Madrid
8. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A, McNamara JO. (2001) Invitación a la neurociencia. Editorial médica panamericana; Argentina
9. Pardini CM. (1998) Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis doctoral, Secretaria de Salubridad y Asistencia, México
10. UAB at <http://www.spinalcord.uab.edu>
11. Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319-370.
12. Hulsebosch CE (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol Educ* 26 (4): 238-255.
13. Tator CH (1995) Update on pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5: 497-513.
14. Caballero CS, Nieto-Sampedro M (2005) Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura. *Articulos de Revisión* 36 (1): 75-86.
15. Dusart I, Schwab ME (1994) Secondary cell death and inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6: 712-724.
16. Nieto-Sampedro M (2001) Reparación del trauma medular. *Bol Soc Esp Neuroci* 12: 2-15.
17. Nieto-Sampedro M (1999) Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Adv Exp Med Biol* 468:207-224.
18. Means ED, Anderson DK (1983) Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J. Neuropathol Exp Neurol* 42:707-719.
19. McTigue DM, Tani M, Krivacic K, Chernosky A, Kelner GS, Maciejewski D (1998) Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury. *J Neurosci Res* 53: 358-376.

20. Moreno-Flores M. T., Bovolenta, P, Nieto-Sampedro M (1992) Polymorphonuclear leukocytes in brain parenchyma alter injury and their interaction with purified astrocytes in culture. *Glia* 7: 146-157.
21. Perry VH, Brown MC, Gordon S (1993) The macrophage response and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 16: 268-273.
22. Barlett B, Holets VR, Bates ML, Clarke TS, Watson BD (1994) Characterization of photochemically induced spinal cord in the rat by light and electron microscopy. *Exp. Neurol* 127: 76-93.
23. Girardi FP, Khan SN, Cammisa FP, Blanck TJJ (2000) Advances and strategies for spinal cord Regeneration. *Orthop Clin North America* 31: 465-476.
24. Griffiths IR, McCulloch MC (1983) Nerve fibres in spinal cord impact injuries. *J Neurol Sci* 58: 335-349.
25. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM (1993) Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 59: 75-89.
26. Lemke M, Demediuk P, McIntosh T K, Vink R, Faden AI. (1987) Alterations tissue Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Cipo Res Com.* 147: 1170-1175.
27. Young W, Koreh I. (1986) Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res.* 365: 42-53
28. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. (1998) Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Raven; New York
29. Díaz RA, Guízar SG, Rios CC. (2002) Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de medula espinal. *Rev Med IMSS* 40 (5): 437-455
30. Dykens, J.A. (1994) Isolated Cerebral and Cerebellar Mitochondria Produce Free Radicals when Exposed to Elevated Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>: Implications for Neurodegeneration. *J. Neurochem.* 63: 584-591
31. Stoffel W. (1990) The myelin membrane of the central nervous system essential macromolecular structure and function. *Angew Chem Int De Engl* 29:958-976
32. Choit DW. (1995) Calcium Still center-stage in hipoxic-ischemic neuronal death. *Trenes Neurosci.* 18:58-60
33. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Adrich EF, Fazl M, et al. (1998) Methylprednisolone of tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Result of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *J Neurosurg* 89(5):699-706
34. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. (2000) Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord* 38:71-76
35. Braughler JM, Chase RL, Neff GL, Yonkers PA, Day JS, Hall ED, et al. (1998) A new 21-aminoesteroid antioxidant Lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and block araquidonic acid release from pituitary tumor (AtT-20) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 244(2):423-427

36. Xiao J, Zhao D, Hou T, Wu K, Zeng H. (1998) Synergetic protective effects of combined blockade by two kinds of autolesion mediator receptor on neurological function after cervical cord injury. *Chin Med J (Engl)* 111:443-446
37. Chang RC, Rota C, Glover RE, Mason RP, Hong JS. (2000) A novel effect of an opioid receptor antagonist, naloxone, on the production of reactive oxygen species by microglia: a study by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Brain Res* 854: 224-229
38. Hukuda S, Maeda T. (1996) The role of GM-1 ganglioside in the injured spinal cord of rats: An immunohistochemical study using GM-1 antisera. *J Neurotrauma* 13(3):163-170
39. Fehlings MG, Tator CH. (1989) The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 71(3):403-416.
40. Wada S, Yone K, Ishidou Y, Nagamine T, Nakahara S, Niiyama T, et al. (1999) Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventive effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg* (1 Suppl):98-104
41. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Vaillant N, Widmann C, Lazdunski M. (1999) Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117 (5):881-889
42. Díaz-Ruiz A, Ríos C, Duarte I, Correa D, Guízar- Sahagún G, Grijalva I, et al. (1999) Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 266(1):61-64
43. Díaz-Ruiz A, Ríos C, Duarte I, Correa D, Guízar- Sahagún G, Grijalva I, et al. (2000) Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: Cyclosporin-A vs. methylprednisolone. *Neuroreport* 11(8):1765- 1767
44. Bavetta S, Hamlyn Pj, Burnstock G, Lieberman AR, Anderson PN. (1999) The effects of FK506 on dorsal column axon following spinal cord injury in adult rats: Neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol* 158(2):382-393
45. Kaptanoglu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. (1999) Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 91(2 Suppl):200-204
46. Hu WH, Li F, Qiang WA, Liu N, Wang GQ, Xiao J, Liu JS, Liao WH, Jen MF. Dual role for nitric oxide in dynorphin spinal neurotoxicity. *J Neurotrauma* 1999;16(1):85-98
47. Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD. (1999) Clenbuterol, a  $\beta_2$  adrenoreceptor agonist improves locomotion and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol* 159(1):267-273
48. Suzer T, Coskun E, Islekel H, Tahta K. (1999) Neuroprotective effect of magnesium on lipid peroxidation and axonal function after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 37(7):480-484
49. Segal JL, Pathak MS, Hernández LP, Himber PL, Brunnemann SR, Charter RS. (1999) Safety and efficacy of 4-aminopyridine in humans with spinal cord injury: A long-term, controlled trial. *Pharmacotherapy* 19(6):713-723
50. Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelymayr R, Perry G, Smith MA, Drew KL (2001) Hibernation, a model of neuroprotection. *Am J Pathol* 158:2145-2151
51. Maragos WF, Korde AS (2004) Mitochondrial uncoupling as a potential therapeutic target in acute central nervous system injury. *J Neurochem* 91(2):257-262
52. Nomura H, Tator CH, Shoichet MS (2006) Bioengineered strategies for spinal cord repair. *J Neurotrauma* 23: 496-507.

53. Olayo R, Rios C, Salgado-Ceballos H, Cruz GJ, Morales J, Olayo MG, Alcaraz-Zubeldia M, Alvarez AL, Mondragon R, Morales A, Diaz-Ruiz A (2007) Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci Mater Med.* 19:817-826
54. Alvarez-Mejia AL, Mondragon-Lozano R, Morales-Guadarrama A (2004) Interfaz Neuro-Motora, Conector permanente para la extracción de señales neuro-motoras. Tesis de licenciatura IPN, México
55. De la Torre JC (1982) Catecholamine fiber regeneration across a collagen bioimplant after spinal cord transection. *Brain Res. Bull* 9: 545-552
56. Marchand R, Woerly S, Bertrand L, Valdes N (1993) Evaluation of two cross-linked collagen gels implanted in the transected spinal cord. *Brain Res. Bull* 30:415-422.
57. Yoshi S, Oka M, Shima M, Taniguchi, Akagi M (2004) Restoration of function after spinal cord transection using a collagen bridge. *J Biomed Mater Res A* 70: 569-575
58. King VR, Phillips JB, Brown RA, Priest-Ley JV (2004) The effects of treatment with antibodies to transforming growth factor beta1 and beta2 following spinal cord damage in the adult rat. *Neuroscience* 126: 173-183
59. Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M y col (2004) Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats. *Tissue eng.* 10: 493-504
60. Suzuki Y, Kitaura M, Wu S y col (2002). Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neurosci Lett* 318:121-124
61. Zimmermann U, Thurmer F, Jork A y col (2001) A novel class of amitogenic alginate microcapsules for longterm immunoisolated transplantation. *Ann. NY Acad Sci* 944:199-215
62. Rochkind S, Shahar A, Amon M, Nevo Z (2002) Transplantation of embryonal spinal cord nerve cells cultured on biodegradable microcarriers followed by low power laser irradiation for the treatment of traumatic paraplegia in rats. *Neurol Res* 24: 355-360
63. Luo J, Shi R (2004). Diffusive oxidative stress following acute spinal cord injury in guinea pigs and its inhibition by polyethylene glycol. *Neurosci Lett* 359:167-170
64. Borgens RB, Shi R, Bohnert D (2002) Behavioral Recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. *J Exp Biol* 205: 1-12
65. Laverty PH, Leskova A, Breur GJ y col (2004) A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SNC. *J Neurotrauma* 21: 1767-1777
66. Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2006) matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *biomaterials* 27: 519-533
67. Woerly S, Doan VD, Sosa N, De Vellis J, Espinosa-Jeffrey a (2004) prevention of gliotic scar formation by neurogel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *j. neurosci. res.* 75: 262-272
68. Hejcl A, Lesný P, Pradný M, Michálek J, Jendelová J, Stulík J, Syková E (2008) Biocompatible hydrogels in spinal cord repair. In press
69. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. (2000) Perspectives: neurobiology. Regeneration in the nogo zone. *Science* 287(5454):813-814

70. Jeffery ND, Crang AJ, O'Leary MT, Hodge SJ, Blakemore WF. (1999) Behavioral consequences of oligodendrocyte progenitor cell transplantation into experimental demyelinating lesion in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 11(5):1508-1514
71. Robchevsky AG, Streit WJ. (1998) Role of microglia in postinjury repair and regeneration of the CNS. *Ment Retard Dev Disabilities Res Rev* 4:187-192
72. Dumouli A, Privat A, Gimenez-y-Ribotta . (2000) Transplantation of embryonic Rafe cells regulates the modifications of the gabaergic phenotype occurring in the injury spinal cord. *Neuroscience* 5: 173-182
73. Gimenez-y-Ribotta M, Orsal D, Feraboli-Lohnherr D, Privat A. (1998) Recovery of locomotion following transplantation of monoaminergic neurons in the spinal cord of paraplegic rats. *Ann NY Acad Sci* 860:393-411
74. Bamber NI, LiH, Aebischer P, Xu XM. (1999) Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisectioned adult rat spinal cord. *Neural Plast* 6: 103-121
75. Salgado-Ceballos H, Guizar-Sahagun G, Feria-Velasco A, Grijalva I, Espitia L, Ibarra A, Madrazo I (1998) Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res.*782(1-2):126-135
76. Menei P, Montero-Menei C, Whittemore SR, Bunge R.P. Bunge M.B. (1998) Schwann cell genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 10(2):607-621
77. McDonal Jw, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DJ, Choi DW. (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5:1410-1412
78. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. (1998) Neurotrophin-3 and brain –derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 18:5354-5365
79. Grijalva I, Guizar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G, Mino D, Maldonado-Julián H, Vidal-Cantú G, Ibarra A, Serra O, Salgado-Ceballos H, Arenas-Hernández R. (2003) Efficacy and safety of 4-aminopyridine in patients with long-term spinal cord injury: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pharmacotherapy.* 23(7) 823-834
80. Poirrier AL, Nyssen Y, Scholtes F, Multon S, Rinkin C, Weber G, Bouhy D, Brook G, Franzen R, Schoenen J. (2004) Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but not high thoracic spinal cord compression injury in adult rats. *J Neurosci Res* 75:253-261
81. Shirakawa H (2001) The Discovery of Polyacetylene Film: The Dawning of an Era of Conducting Polymers (Nobel Lecture). *Angew. Chem.* 40(14) 2574-2580
82. Revista "Noticiero Plástico", N° 431, junio de 1998, Buenos Aires – Argentina
83. Asociación Argentina de materiales (SAM): [www.materiales-sam.org.ar](http://www.materiales-sam.org.ar)  
Barbero CA (2005) Polímeros conductores y semiconductores. De la biología a la nanotecnología, Programa de Desarrollo de materiales avanzados, Universidad nacional de río Cuarto Argentina. Registro N°ISSN 1668-4788
84. Rocha IS, Mattoso LHC, Malmonge LF, Gregório Jr R (1999) Effect of low contents of a polyaniline derivative on the crystallization and electrical properties of blends with PVDF. *J. Pol Sci. Polym. Phys.* 37 (12) 1219-1224

85. Khare PK, Upadhyay JK, Ashish Verma, Paliwal SK (1998) Electrical conduction behaviour of diphenylthiocarbazone doped cellulose acetate 47 (2)145-151
86. Shen M, Bell AT (1978) Plasma Polymerization. University of California, Berkeley. Miami Beach, Florida
87. Morales J. (2001) Polimerización por plasma: Tratamiento superficial y simulación del plasma. Tesis doctoral UAM-I México
88. Cruz GJ, Morales J, Olayo R (1999) Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. Thin solid films 342: 119-126
89. Williams DF, Roaf R, (1973) Implants in surgery. WB Saunders, Philadelphia 203–297
90. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N (2002) Plasma surface modification of material. Materials Science and Engineering 36: 143–206
91. Ferreira M, Rubner MF (1995) Molecular-level processing of conjugated polymers 1 layer-by-layer manipulation of conjugated polyions. Macromolecules 28 (21) 7107-7114
92. D'Agostino R (1990) Plasma deposition, treatment and etching of polymers. Ed. Academic Press EE.UU.
93. Castner DG, Ratner BD (2002) Biomedical surface science: Foundations to frontiers. Surface Science 500: 28-60
94. Bardasano JL, Ellorrieta JI (2000) Bioelectromagnetismo Ciencia y Salud. Serie McGraw-Hill de divulgación científica, España
95. Blackman, Blanchard JP, Benane SG, House DE (1994) Empirical test of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with PC-12 cells. Bioelectromagnetics 15:239-260
96. Drucker R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo J, Morgado C, Hernandez A, Corkidi G (1994) Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats. Mol. Cell. Neurosci. 5:485-498
97. Morgado C, Verdugo-Díaz L, García D, Morales C, Drucker R (1998) The role of the voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. Cell Tissue Res 291: 217-230
98. Unsicker, Skaper SD, Varon S (1985) Developmental changes in the response of rat chromaffin cells neuronotrophic and neurite promoting factors. Dev. Biol. 111:425-433
99. Hall, Ekanayake S (1991) Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cells-derivatives. Int. J Dev Biol. 35:367-387
100. Verdugo-Díaz L, Palomero M; Drucker R (1998) Differentiation of chromaffin cells by extremely low frequency magnetic fields changes ratios of catecholamine type Messenger. Bioelectrochem. and Bioenerg. 46: 297-300
101. Goodman R, Greenebaum B, MArron MT (1995) Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. Int. Rev. Cytol 158: 279-338
102. Karabakhtsian, Broude N, Shalts N, Kochlatyi S, Goodman R, Henderson AS (1994) Calcium is necessary in the cell response to EM fields. FEBS Lett. 349:1-6
103. García, Montero M, Alvarez J, Fonteriz RI, Sanchez A (1994) Effects extremely low frequency electromagnetic fields on ion transport in several mammalian cells. Bioelectromagnetics 15: 579-588

104. Zhang L, Zhou L, Vega-Gonzalez A, Mendoza D, Drucker-Colin R. (1997) *Comp Biochem Physiol* 118 (3): 295-299
105. Feria-Velasco A, Castillo S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suarez S, Sanchez C, Drucker-Colín R (1998) Neuronal differentiation of cromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetics fields of never growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *J Neurosci Res* 53:569-582
106. Azanza MJ., Del moral A, (1998). ELF-magnetic induced effects on the bioelectric activity of single neurone cells. *J Magn Magn Mater.* 177-81:1451-1452
107. Azanza MJ., Del moral A (1994) .Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog Neurobiol* 44(6):517-601
108. Engstrôm (1997) What is the time scale of magnetic field interaction in biological systems?. *Bioelectromagnetics* 18:244-249
109. Prato FS, Carson, JJJ, Ossenkopp KP, Kavaliers M. (1995) Possible Mechanisms by which extremely low frequency magnetic fiels affect opioid function. *FASEB J.* 9:807-814
110. Ip NY, Zigmond RE (1984) Pattern of presynaptic nerve activity can determine the type of neurotransmitter regulating post-synaptic event. *Nature* 311:472-474
111. Walicke PA, Campenot RB, Patterson PH (1977) Determination of transmitter function by neuronal activity. *Proc. Natl. Acad Sci* 74: 5767-5771
112. Lomo T, Rosenthal J. (1972) Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol Lond.* 221:493-513
113. Zigmond REE, Bowers CW. (1981) Influence of nerve activity on the macromolecular content of neurons and their effector organs. *Annu. Rev. Physiol* 43: 673-687
114. Borgens RB, Roederer E, Cohen MJ (1981) Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields. *Science* 213:611-617
115. Cohan CS, Kater SB (1986), Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity. *Science* 232:1638-1640
116. Patel NB, Poo MM (1982) Orientation of neurite growth by extra cellular electric fields. *J. Neurosci* 2:483-496
117. Changuieux JP, Danchin A (1976) Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264:705-12
118. Archer SM, Dubin Mw, Stark LA. (1982) Abnormal development of kitten retino-geniculate connectivity in the absence of action potentials. *Science* 217:743-745
119. Greenebaum B, Sisken BF (2007) Does direction of induced electronic field of current provide a test of mechanism involved in nerve regeneration? *Bioelectromagnetics* (in press)
120. Walker JL, Smith JM, Resig P, Herbst E, Sisken BF (2004) The effect of 3 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the Bioelectromagnetic society, June 20-24 Washington D.C.
121. McLeod BR, Pilla AA, Sampsel MW (1983) Electromagnetic fields induced by Helmholtz alding colls incide saline-filled boundarles. *Bioelectromagnetics* 4: 357-370
122. Bervar M (2005) Effect of weak: Interrupted sinusoidal low frequency magnetic field on neural regeneration in rats: Functional Evaluation. *Bioelectromagnetics* 26: 351-356
123. Simko M, Mattsson MO (2004) Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem* 93 (1):83-92

124. Simko M (2004) Induction of cell activation processes by low frequency electromagnetic fields. *Scientific World Journal* 2:4-22
125. Rollwitz J, Lupke M, Simko M (2004) Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1674(3):231-238
126. Kirschvink, JL, Kobayashi-Kirschvink A; Woodford BJ. (1992) Magnetite biomineralisation in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7683-7687
127. Kwo S, Young W, Decrescito V (1989) Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. *J Neurotrauma* 6(1):13-34
128. Gûler G, Tûrkôzer Z, Seyhan N (2007) Electric field effects on guinea pig serum: the role of free radicals 26(3): 207-223
129. Sharifian A, Gharavi M, Pasalar P, Aminian O (2008) Effect of extremely low frequency magnetic field on antioxidant in plasma and red blood cells in spot welders. *Int Arch Occup Environ Health*. In press



## Apéndice A. Ecuación de Nerst

---

El potencial eléctrico generado a través de la membrana en equilibrio electroquímico, el potencial de equilibrio, se puede predecir mediante la ecuación de Nerst.

En general esta relación se expresa como:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

donde:

$E_x$  Es el potencial de equilibrio para cualquier ion.

R Constante de los gases.

T Temperatura absoluta <K>.

z Valencia (carga eléctrica) del ion permeable.

F Constante de Faraday (cantidad de carga eléctrica contenida en un mol de ion univalente).

Utilizando logaritmos en base 10 a temperatura ambiente esta relación se simplifica a:

$$E_x = \frac{58}{z} \log \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

## Apéndice B. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud

---

### TITULO SÉPTIMO

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

### CAPITULO 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 calificados y competentes 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.

## Apéndice C. Procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris

---

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

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

### SOLUCIONES:

- Alcohol ácido al 1%:
  - Ácido clorhídrico 1ml
  - Etanol 99ml
- Agua amoniacal:
  - Hidróxido de amonio al 28% 2 a 4ml
  - Agua destilada. 800ml a 1000ml
- Solución saturada de carbonato de litio:
  - Carbonato de litio 1.54g
  - Agua destilada. 100ml
- Solución de eosina-floxina.

### HEMATOXILINA DE HARRIS

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

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

## PROCEDIMIENTO

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

## RESULTADOS

|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| Núcleos                     | azul             |
| Citoplasma                  | de rosado a rojo |
| La mayoría de otros tejidos | de rosado a rojo |

## Apéndice D. Escala BBB

---

La escala BBB evalúa la calidad de la marcha a través de 22 grados de recuperación motora descritos a continuación:

Grado 0: No se observan movimientos en patas traseras (PT).

Grado 1: Movimiento limitado (arco<50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla.

Grado 2: Movimiento amplio (arco<50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.

Grado 3: Movimiento amplio de dos articulaciones.

Grado 4: Movimiento limitado de las tres articulaciones de la PT (cadera, rodilla y tobillo).

Grado 5: Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.

Grado 6: Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.

Grado 7: Movimiento amplio de las tres articulaciones de la PT (Cadera rodilla y tobillo).

Grado 8: Movimientos rítmicos (coordinados) de ambas patas PT sin soporte del peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.

Grado 9: Colocación plantar con soporte de peso cuando no esta caminando o pasos ocasionales ( $\leq 50\%$ ), frecuentes (51% al 94%) o constantes (95% al 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.

Grado 10: Pasos ocasionales con soporte plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.

Grado 11: Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.

Grado 12: Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación ocasional entre PD y PT.

Grado 13: Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación frecuente entre PD y PT.

Grado 14: Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de patas, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT, y pasos dorsales ocasionales.

Grado 15: Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo.

Grado 16: Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.

Grado 17: Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).

Grado 18: La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.

Grado 19: Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.

Grado 20: Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constante. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, la cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.

Grado 21: Igual al anterior, pero, tronco constantemente estable.



## Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

INFLUENCIA DEL CAMPO MAGNÉTICO SOBRE LA  
REGENERACIÓN AXONAL DESPUÉS DE UN  
IMPLANTE DE POLÍMERO SEMICONDUCTOR  
EN UN MODELO DE LESIÓN POR SECCIÓN  
COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL

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

**Ana Laura Alvarez Mejía**

Asesores:

**Dr. Juan Morales Corona**  
**Dra. Hermelinda Salgado Ceballos**  
**M. en C. Rafael Godínez Fernández**

Sinodales:

---

**Dr. Juan Azorín Nieto**  
**Presidente**

---

**M. en C. Rafael Godínez Fernández**  
**Secretario**

---

**Dra. Sandra Orozco Suárez**  
**Vocal**

Agosto de 2008