



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Ingeniería Biomédica**

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

**Evaluación del efecto de tres implantes poliméricos en la función
nerviosa en un modelo de lesión por sección completa de la
médula espinal en ratas**

Presenta:

Rodrigo Mondragón Lozano

México, Abril de 2009



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Ingeniería Biomédica**

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

**Evaluación del efecto de tres implantes poliméricos en la función nerviosa
en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas**

Presenta:

Rodrigo Mondragón Lozano

Asesoras:

**Dra. María Teresa García González
Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz**

Sinodales:

Dr. Camilo Ríos Castañeda
Presidente

Dra. Ma. Teresa García González
Secretaria

M. en I. Juan Manuel Cornejo Cruz
Vocal

México, Abril de 2009

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de:

Dra. María Teresa García González
Dr. Roberto Olayo González
Dr. Juan Morales Corona
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. María de los Angeles Araceli Díaz Ruiz
Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos
Instituto Mexicano del Seguro Social
Proyecto CAMINA

Dra. Guadalupe Olayo González
Dr. Guillermo Cruz Cruz
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Dr. Noel Placencia
Centro Mexicano de Neurociencias

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo.

Gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro 199033 y al proyecto SEP2004-C0147467/A1.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	II
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO.....	4
1.2. MÉDULA ESPINAL.....	6
1.3. POTENCIAL DE MEMBRANA Y POTENCIAL DE ACCIÓN.....	10
1.4. POTENCIALES EVOCADOS.....	13
1.5. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.....	20
1.6. ESTRATEGIAS PARA RESTABLECER LA FUNCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.....	23
1.7. POLÍMEROS SEMICONDUCTORES.....	29
1.8. POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....	32
1.9. POLÍMEROS POR PLASMA EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.....	34
2. JUSTIFICACIÓN.....	36
3. HIPÓTESIS.....	37
4. OBJETIVOS.....	37
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	37
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS.....	38
5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
5.3. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.....	41
5.4. REGISTRO DE POTENCIALES EVOCADOS SOMATOSENSORIALES.....	43
5.5. EVALUACIÓN FUNCIONAL.....	45
5.6. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	46
5.7. ESTADÍSTICA.....	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS.....	47
6.2. REGISTRO DE POTENCIALES EVOCADOS SOMATOSENSORIALES.....	52
6.3. EVALUACIÓN FUNCIONAL.....	67
6.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	68
7. DISCUSIÓN.....	71
8. CONCLUSIONES.....	75
9. PERSPECTIVAS.....	76
10. REFERENCIAS.....	77
11. ANEXOS.....	84
A. REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD.....	84
B. ESCALA BBB.....	85
C. PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN. MÉTODO DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE HARRIS.....	87
D. PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN. MÉTODO DE CRESILO DE VOGT PARA SUSTANCIA DE NISSL.....	89

Índice de tablas y figuras

FIGURA 1.1: ESTRUCTURA DE UNA NEURONA.....	5
FIGURA 1.2: ESTRUCTURA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	7
FIGURA 1.3: CORTE TRANSVERSAL DE LAS PRINCIPALES VÍAS LARGAS DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA MÉDULA ESPINAL.....	8
FIGURA 1.4: VÍA SENSITIVA.....	9
FIGURA 1.5: TRACTO PIRAMIDAL.....	10
TABLA 1.1: CONCENTRACIÓN APROXIMADA DE IONES LIBRES EN AXÓN DE MAMÍFERO.....	11
FIGURA 1.6: ESQUEMA DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS IONES DE SODIO Y POTASIO DURANTE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PARA GENERAR EL POTENCIAL DE ACCIÓN.....	12
FIGURA 1.7: CARACTERÍSTICAS DE LOS PE.....	15
FIGURA 1.8: MONTAJE PARA PES CON ESTIMULACIÓN EN EL NERVIPO POSTERIOR DEL TOBILLO.....	18
FIGURA 1.9: PRINCIPALES EVENTOS DE DAÑO SECUNDARIO QUE SE DESENCADENAN DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	23
TABLA 1.2. COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE MATERIALES ELECTRÓNICOS INORGÁNICOS Y POLÍMEROS CONJUGADOS.....	31
TABLA 1.3: BIOMATERIALES EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.....	34
FIGURA 5.1: ESQUEMA DE REACTOR DE PLASMA.....	38
FIGURA 5.2: ESQUEMA DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DE CONDUCTIVIDAD EN CONDICIONES DE HUMEDAD.....	40
FIGURA 5.3: VISTA DORSAL ESQUEMÁTICA DEL CRÁNEO DE UNA RATA.....	41
FIGURA 5.4: CORTE CORONAL ESQUEMÁTICO DEL CEREBRO DE UNA RATA.....	42
FIGURA 5.5: ESQUEMA DE MONTAJE DE PES.....	43
FIGURA 5.6: ESQUEMA DE COORDENADAS PARA EL CÁLCULO DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA IMAGEN ORIGINAL Y EL PATRÓN.....	44
FIGURA 5.7: MÉTODO DE DETECCIÓN DE PES CON REPRESENTACIÓN TIEMPO-FRECUENCIA UTILIZANDO LA CORRELACIÓN CRUZADA BIDIMENSIONAL NORMALIZADA.....	45
FIGURA 6.1: ESPECTRO DE TRANSMITANCIA IR DE LOS MATERIALES.....	48
TABLA 6.1: CARACTERÍSTICAS ELÉCTRICAS DE LOS POLÍMEROS EN CONDICIONES DE HUMEDAD.....	49
FIGURA 6.2: MICROFOTOGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE LOS POLÍMEROS.....	50
TABLA 6.2: ANÁLISIS ELEMENTAL DE LOS POLÍMEROS.....	51
FIGURA 6.3: CORTE CORONAL HISTOLÓGICO DE LA ZONA DE IMPLANTE DE ELECTRODOS.....	52
FIGURA 6.4: POTENCIALES EVOCADOS SOMATOSENSORIALES REPRESENTATIVOS ESTIMULANDO EXTREMIDADES SUPERIORES.....	52
TABLA 6.2: MEDICIÓN DE PES PREVIO A LPSC.....	53
FIGURA 6.5: POTENCIALES EVOCADOS REPRESENTATIVOS DE CADA GRUPO DURANTE EL ESTUDIO.....	54
FIGURA 6.6: DETECCIÓN DE LOS PES UTILIZANDO CCBN DE LOS ESPECTROGRAMAS DE UN ANIMAL REPRESENTATIVO DEL GRUPO CONTROL.....	57
FIGURA 6.7: DETECCIÓN DE LOS PES UTILIZANDO CCBN DE LOS ESPECTROGRAMAS DE UN ANIMAL REPRESENTATIVO DEL GRUPO PPY.....	59
FIGURA 6.8: DETECCIÓN DE LOS PES UTILIZANDO CCBN DE LOS ESPECTROGRAMAS DE UN ANIMAL REPRESENTATIVO DEL GRUPO PPY/I.....	61
FIGURA 6.9: DETECCIÓN DE LOS PES UTILIZANDO CCBN DE LOS ESPECTROGRAMAS DE UN ANIMAL REPRESENTATIVO DEL GRUPO PPY/PEG.....	63
FIGURA 6.10: AMPLITUD (POTENCIA PICO) DE LA ONDA N1.....	64
FIGURA 6.11: LATENCIA (TIEMPO PICO) DE LA ONDA N1.....	65
FIGURA 6.12: AMPLITUD (POTENCIA PICO) DE LA ONDA P1.....	65
FIGURA 6.13: LATENCIA (TIEMPO PICO) DE LA ONDA P1.....	66
FIGURA 6.14: RECUPERACIÓN MOTORA EVALUADA CON LA ESCALA BBB.....	67
FIGURA 6.15: CORTES HISTOLÓGICOS LONGITUDINALES DE LA MÉDULA ESPINAL EN EL EPICENTRO DE LA LESIÓN.....	69
FIGURA 6.16: ANÁLISIS DE TEJIDO PRESERVADO.....	70

Abreviaturas

BBB	<i>Escala conductual Basso, Beattie y Bresnahan</i>
Ca²⁺	<i>Calcio</i>
CCBN	<i>Correlación Cruzada Bidimensional Normalizada</i>
Cl⁻	<i>Cloro</i>
CS	<i>Células de Schwann</i>
DS	<i>Desviación Estándar</i>
FES	<i>Estimulación Eléctrica Funcional</i>
HR	<i>Humedad Relativa</i>
IR	<i>Infrarrojo</i>
K⁺	<i>Potasio</i>
LTME	<i>Lesión Traumática de la Médula Espinal</i>
LPSC	<i>Lesión Por Sección Completa</i>
Na⁺	<i>Sodio</i>
NP	<i>Nervio Periférico</i>
PE	<i>Potenciales Evocados</i>
PES	<i>Potenciales Evocados Somatosensoriales</i>
PPy	<i>Polipirrol.</i>
PPy/I	<i>Polipirrol/Yodo.</i>
PPy/PEG	<i>Polipirrol/Polietilenglicol</i>
SN	<i>Sistema Nervioso</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
SNP	<i>Sistema Nervioso Periférico</i>
STFT	<i>Transformada de Fourier de Tiempo Corto</i>
±E.E.	<i>Error Estándar</i>

Resumen

Introducción: La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un problema de salud pública que provoca la pérdida de la función motora, sensitiva y autónoma; afecta principalmente a la población económicamente activa (20 a 35 años). Actualmente no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica perdida, debido a la complejidad para revertir los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan. Se ha demostrado que los implantes de polímero semiconductor después de una lesión por sección completa (LPSC) de la médula espinal, promueven la preservación del tejido nervioso y la recuperación funcional en ratas. Sin embargo, sólo se realizaron pruebas cualitativas para monitorear la evolución del estado de la médula espinal, sin observar el estado de la señal nerviosa. Por otro lado, el monitoreo neurofisiológico proporciona un indicador cuantitativo del estado de la función nerviosa de la médula espinal. Los potenciales evocados somatosensoriales (PES) son una herramienta para evaluar esta función.

Objetivo: Evaluar el efecto de tres implantes de polímeros semiconductores: Polipirrol (PPy), Polipirrol dopado con yodo (PPy/I) y el co-polímero Polipirrol/Polietilenglicol (PPy/PEG), en un modelo LPSC de la médula espinal y monitorear el efecto sobre la función nerviosa mediante la escala motora descrita por Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) y los potenciales evocados somatosensoriales (PES), así como, evaluar la cantidad de tejido preservado.

Materiales y Métodos: Se realizó un ensayo experimental aleatorio controlado con una muestra de 24 ratas que se sometió a una cirugía de LPSC de la médula espinal, y se dividió en cuatro grupos experimentales como sigue: Grupo 1 control; Animales con LPSC de la médula espinal sin implante, Grupo 2 PPy; Animales con LPSC de la médula espinal y con implante de Polipirrol, Grupo 3 PPy/I: Animales con LPSC de la médula espinal y con implante de polipirrol dopado con yodo y Grupo 4 PPy/PEG: Animales con LPSC de la médula espinal y con implante de polipirrol/Polietilenglicol en el sitio de lesión. Se realizaron pruebas electrofisiológicas de PES un día antes de la lesión para conocer los parámetros normales y posteriormente los animales fueron evaluados 24h para demostrar la ausencia de función nerviosa, finalmente se evaluó la función motora y sensitiva con la escala BBB y con PES, respectivamente, una vez por semana durante ocho semanas, al término de este tiempo los animales fueron sacrificados para realizarles un estudio histológico y evaluar la cantidad de tejido preservado por medio de un equipo digitalizador de imágenes.

Resultados: Los resultados demostraron una mayor recuperación funcional y de la señal nerviosa en los animales implantados con PPy y PPy/I al ser comparados con los animales que no recibieron implante ($p < 0.05$), en ambos estudios (BBB y PES), así mismo, se observó una mayor cantidad de tejido preservado en los animales con implante de PPy y PPy/I, que fue estadísticamente significativa al ser comparados con el grupo control.

Conclusiones: Es uno de los primeros estudios en el que se prueban biomateriales sintetizados por plasma como una alternativa de tratamiento de lesiones de la médula espinal. Los implantes de PPy y PPy/I mejoran de manera significativa la función motora en los animales sometidos a un modelo de LPSC de la médula espinal, estos implantes tienen un efecto neuroprotector al disminuir la cantidad de tejido dañado y presentan una menor respuesta inflamatoria cuando son comparados con el grupo control. El modelo de LPSC de la médula espinal es muy agresivo para ser evaluado mediante el registro de PES, sin embargo, el empleo de la representación tiempo-frecuencia y la CCBN son una herramienta útil para analizar y comparar los registros, por otro lado el implante de electrodos intracraneales es una buena opción para el registro de PES en modelos crónicos. Aún se requiere de una mayor cantidad de experimentos para desarrollar técnicas más adecuadas y poder proponer el uso de estos materiales como tratamiento en pacientes con lesión traumática de la médula espinal.

1. Marco Teórico

1.1. Estructura y función del sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) es una red de tejido especializado, se encarga de coordinar las funciones de las células, desempeña 3 funciones principales: (1) función sensitiva, (2) función integradora, y (3) función motora. Se divide en Sistema nervioso central (SNC), que a su vez está compuesto por el encéfalo y la médula espinal, y sistema nervioso periférico (SNP). [1-2]

El SN se compone de dos tipos de células básicas:

1. 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 de potencial, traducir la señal eléctrica en mensajeros químicos y llevar estos mensajeros a células efectoras [3-4] (Figura 1.1).

La neurona está constituida principalmente por 4 regiones.

- a. Cuerpo celular o soma: A partir de él se desprenden múltiples prolongaciones ramificadas que constituyen las principales áreas receptoras de la neurona. En esta región se encuentra el núcleo y gran cantidad de organelos. Brinda gran parte de la nutrición de la célula. [1]
- b. Dendritas: Prolongaciones ramificadas del cuerpo celular, la mayoría de las señales que la neurona va a transmitir ingresan por las dendritas, suelen recibir señales de puntos de contacto con otras neuronas, cada uno de estos se denomina sinapsis. [1]
- c. Axón: Prolongación que abandona el soma de la neurona, suele denominarse fibra nerviosa. Llevan las señales nerviosas a la neurona siguiente. [1]
- d. Sinapsis: Todos los axones presentan muchas ramificaciones cerca de sus terminaciones, en el extremo de cada una de esas terminaciones existe una terminación axónica especializada (terminación presináptica), que descansa sobre la superficie de la membrana de una dendrita o del soma de otra neurona; se tiene así un punto de contacto, denominado sinapsis, a través del cual se pueden transmitir las señales de una neurona a la siguiente. [1]

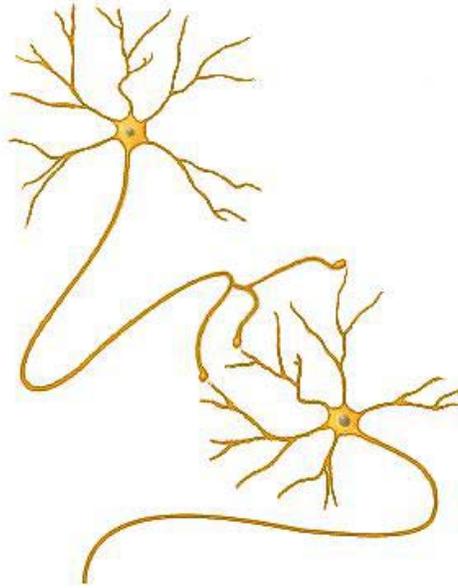


Figura 1.1: Estructura de una neurona. [5]

2. Células de sostén y aislantes: Son células que mantienen a las neuronas en su lugar y evitan la diseminación de las señales por otras neuronas. En el SNC ambos tipos se denominan en conjunto neuroglía mientras que en el SNP las células encargadas de estas funciones son las células de Schwann (CS). Las células de la neuroglía en el SNC se dividen en:
 - a. Oligodendrocitos: Cuya función es proveer y mantener un recubrimiento aislante (mielina) a los axones.
 - b. Astroglía: Encargada de múltiples funciones, entre ellas la regulación de diversos sustratos y precursores para la síntesis de citocinas, y neurotransmisores, están involucradas en el metabolismo neuronal y nutrición de las neuronas.
 - c. Microglía: Cumplen la función de responder como células inflamatorias cuando existe un estímulo traumático o infeccioso sintetizando citocinas. (La microglia secreta dos sustancias: el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento del nervio, el cual, ayuda a madurar las neuronas y favorece la supervivencia de la glía.)

El SNC, está ubicado en un plano profundo del organismo, rodeado y protegido por el hueso, consiste del cerebro dentro del cráneo y la médula espinal que se extiende por el conducto vertebral.

El cerebro es la principal área integradora del SN. La médula espinal desempeña dos funciones; sirve como conducto para muchas vías nerviosas que van y vienen del encéfalo, y como área integradora para muchas actividades nerviosas subconscientes.

En el SNP los axones están protegidos por 3 envolturas separadas de tejido conjuntivo: endoneuro, perineuro y epineuro, presentes a todo lo largo del nervio. Cada fibra nerviosa con sus respectivas CS son envueltas por un endoneuro de tejido conjuntivo formado por una fina malla de microfibrillas de colágena orientadas longitudinalmente, que está en contacto directo con la lámina basal de las CS y envuelve además a los capilares que nutren a la fibra nerviosa, fibroblastos, macrófagos y células cebadas. [6]

Las fibras nerviosas individuales se agrupan constituyendo fascículos ceñidos por un perineuro que anatómicamente es continuación de la aracnoides que envuelve a la médula espinal. El perineuro consta de una o varias capas celulares, según el diámetro del nervio, alternadas con redes de microfibrillas de colágena. Las células que forman este tejido son planas, escamosas y producen una delgada lámina basal en ambas caras celulares, que funciona como una barrera protectora semipermeable entre las fibras nerviosas y el tejido epineural; estas células son contráctiles debido a que contienen una gran cantidad de microfilamentos similares a los que poseen las células musculares lisas. [6]

Todo el conjunto de haces de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y tejido adiposo se encuentra envuelto por el epineuro, formado por abundantes fibras de colágena. [6-7]

Las fibras del nervio periférico (NP) se clasifican en mielínicas y amielínicas de acuerdo a la presencia o no de la vaina que forman las CS alrededor del axón. Las fibras amielínicas se originan por la asociación de los axones con las CS formando haces de aproximadamente 5 a 20 fibras inmersas en una misma CS la cual envuelve y protege al conjunto de axones que integran columnas continuas y se interdigitan a lo largo del NP. [8-9]

En las fibras mielinizadas, la vaina de mielina se produce cuando las CS envuelven al axón originando un estrecho contacto entre las caras externas de su membrana; una vez formada la vaina, ésta se interrumpe a intervalos de los nódulos de Ranvier por lo que cada segmento se halla mielinizado por una sola CS.

1.2. Médula espinal

Existen 3 membranas que rodean a la médula espinal: la duramadre, la aracnoides y la piamadre. La duramadre es la más externa, es una cubierta tubular fibrosa y resistente. El espacio epidural separa a la duramadre de la columna vertebral, contiene tejido areolar laxo y plexos venosos. El espacio subdural es un espacio estrecho entre la duramadre y aracnoides subyacente. La aracnoides es una membrana transparente delgada, separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo que contiene el líquido cefalorraquídeo. La piamadre se adosa íntimamente a la médula espinal. (Figura 1.2)

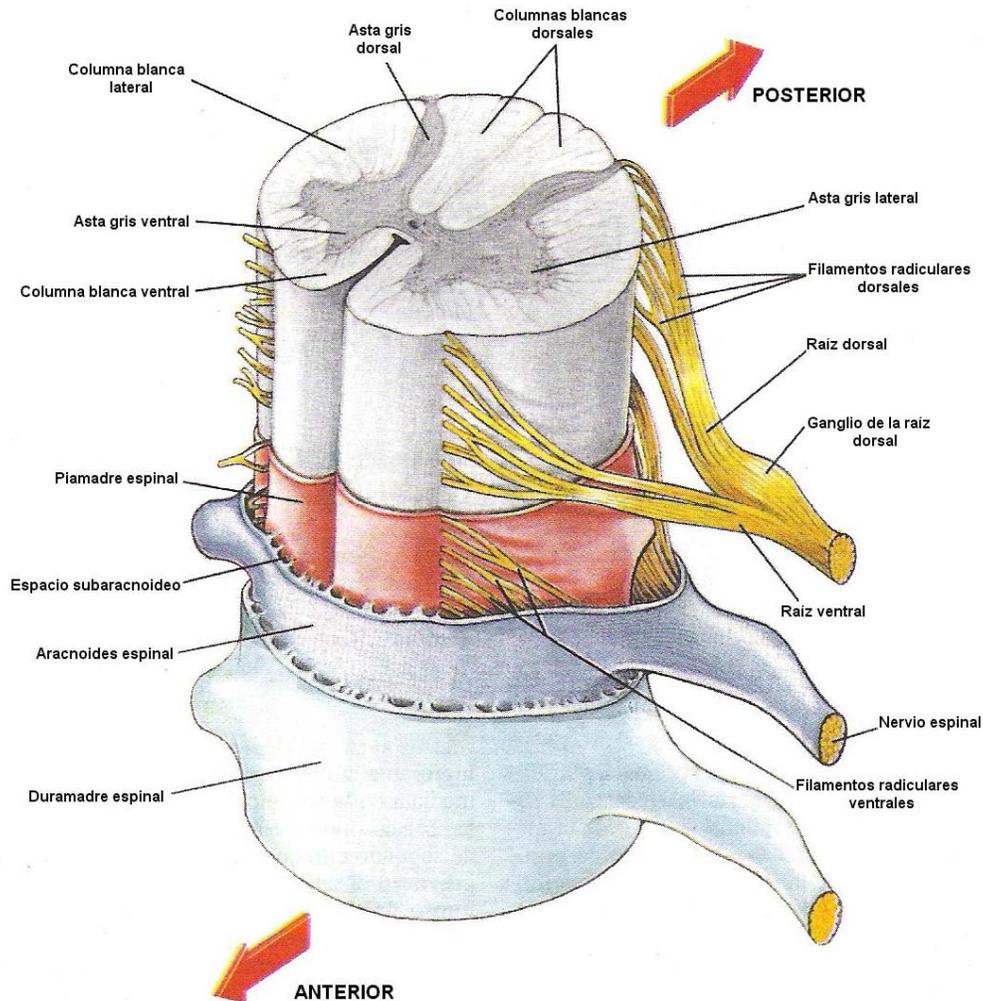


Figura 1.2: Estructura de la médula espinal. [1]

El encéfalo y la médula espinal están compuestos por áreas de sustancia gris y áreas de sustancia blanca, mientras que en el cerebro la sustancia blanca es más profunda, si se observa en sección transversal la médula espinal se aprecia contiene una masa de sustancia gris en forma de H rodeada por sustancia blanca, la sustancia gris está constituida por dos mitades simétricas unidas en la línea media por una conexión transversal (comisura), de sustancia gris, a través de la cual corre un pequeño conducto central. La columna gris anterior (asta anterior) está delante del conducto central y contiene las células que dan origen a las fibras de las raíces ventrales. La columna lateral contiene células preganglionares del sistema nervioso autónomo. La columna gris posterior (asta posterior) es una columna larga y delgada que llega casi hasta el surco colateral posterior. Está cubierto por una masa en forma de media luna, de tejido translúcido, que contiene células nerviosas. La formación reticular es una red de prolongaciones que se extienden dentro del cordón lateral situado entre los cordones anterior y posterior. La forma, cantidad y aspecto de la sustancia gris varía a diferentes niveles. La sustancia gris de la médula espinal puede ser dividida en 2 componentes principales: motor y receptor. La parte motora comprende a las columnas anterior y lateral y da origen a las raíces anteriores. Contiene el asta anterior con motoneuronas que inervan a la musculatura estriada voluntaria. Las células de la

columna lateral dan origen a fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo, torácico y lumbosacro las cuales abandonan la médula espinal con las raíces anteriores. Ver figura 1.3. [10]

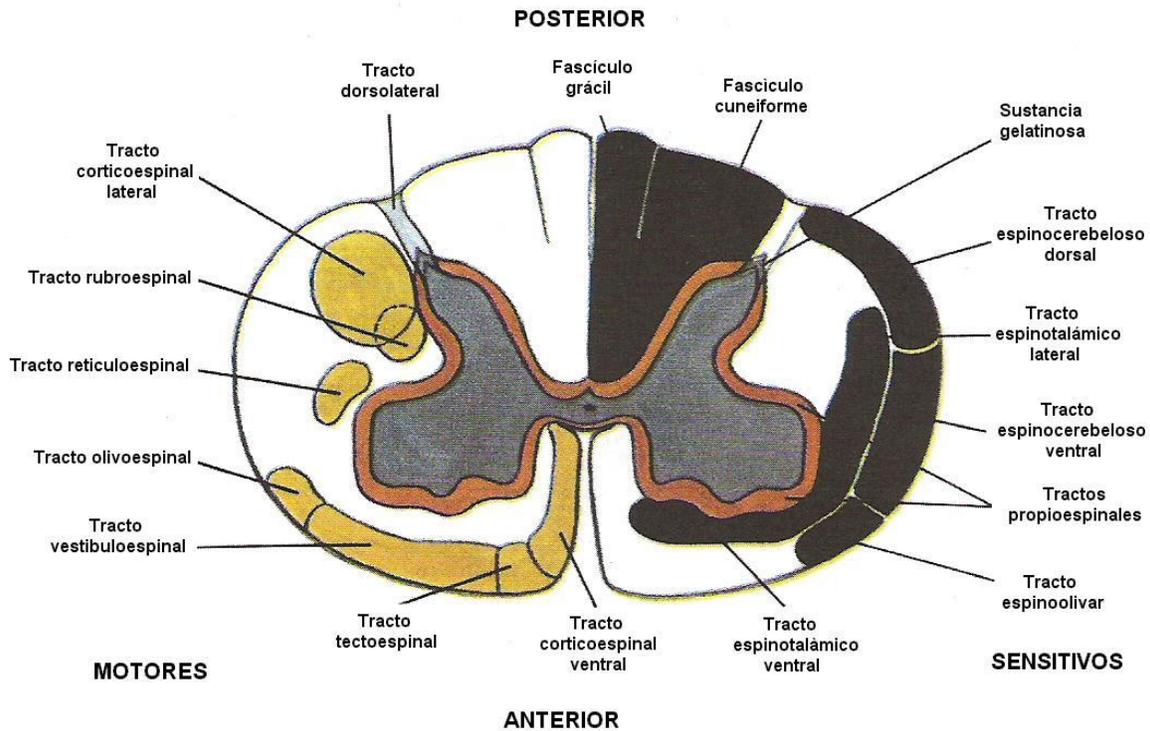


Figura 1.3: Corte transversal de las principales vías largas de fibras nerviosas de la médula espinal. [1]

1.2.1. Vía sensitiva

Toda la información sensorial procedente de los segmentos somáticos del cuerpo entra en la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales. Desde su punto de entrada en la médula espinal y, después, en el encéfalo, los impulsos sensoriales discurren a través de una de estas vías: 1) *sistema columna dorsal-lemnisco medial*, o 2) *sistema anterolateral*. Estos dos sistemas se reúnen de forma parcial en el tálamo (Figura 1.4).

El sistema columna dorsal-lemnisco medial, transporta los impulsos principalmente por las columnas dorsales de la médula (los núcleos cuneiforme y grácil); después de establecer sinapsis y de cruzar al lado opuesto del bulbo, las señales ascienden por el tronco encefálico hasta el tálamo a través del lemnisco medial. Los impulsos del sistema anterolateral penetran, en primer lugar, en la médula espinal procedentes de las raíces posteriores y establecen sinapsis con las astas dorsales de la sustancia gris; a continuación, cruzan al lado opuesto y ascienden por las columnas anterior y lateral de la médula para terminar en el tronco encefálico y en el tálamo. [1]

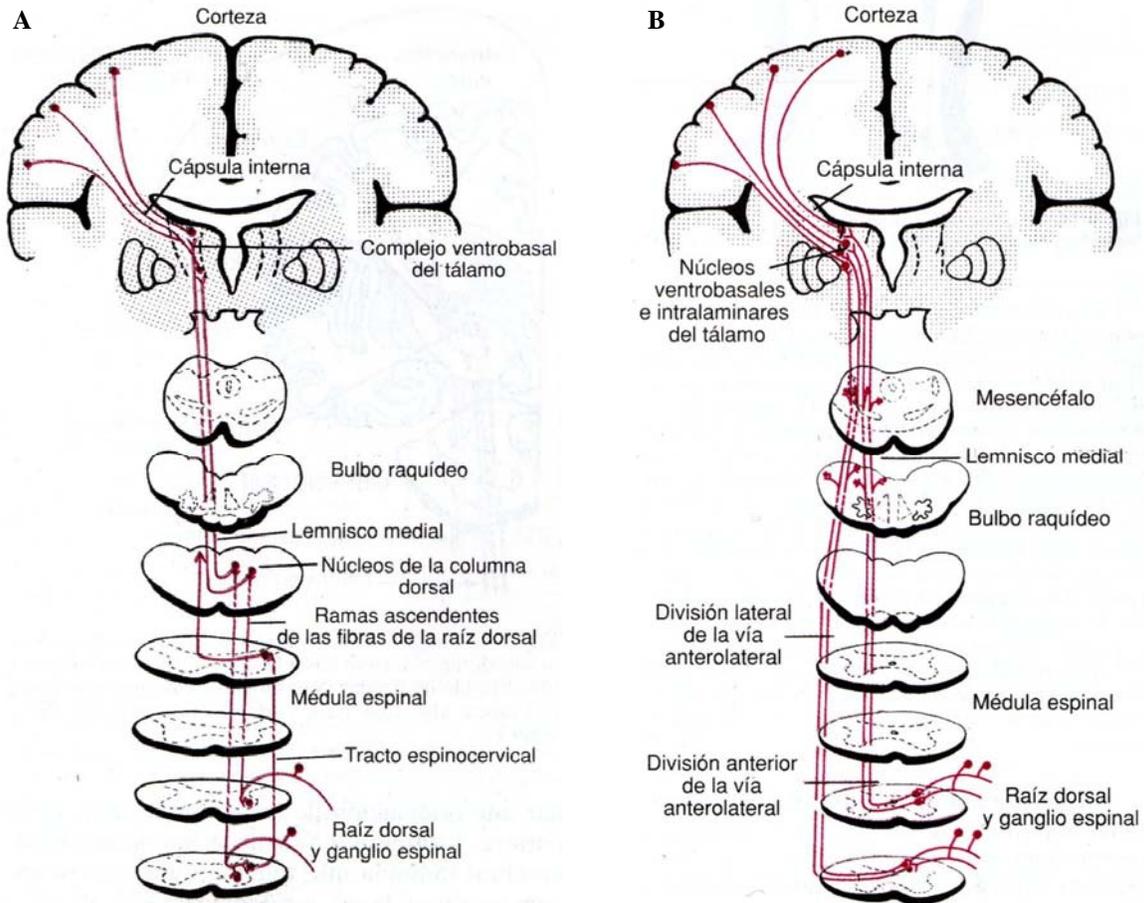


Figura 1.4: Vía sensitiva. A: Vías de la columna dorsal y espinocervicales. B: División anterior y lateral. [1]

1.2.2. Vía motora

Las señales motoras se transmiten directamente desde la corteza a la médula a través de la *vía corticoespinal (vía piramidal)*, e indirectamente por múltiples vías accesorias donde intervienen los ganglios basales, el cerebelo, y diversos núcleos del tronco encefálico. En general, las vías directas se ocupan más de movimientos concretos y detallados, en especial de los segmentos distales de los miembros.

El haz corticoespinal se origina en la corteza motora, tras abandonar la corteza motora pasa por el limbo posterior de la cápsula interna (entre el núcleo caudado y el putamen de los ganglios basales) y luego desciende por el tronco encefálico, formando la pirámide del bulbo raquídeo. La mayoría de las fibras piramidales se cruzan de lado en la médula inferior y descienden en los haces corticoespinales laterales de la médula, para terminar principalmente en las interneuronas de las regiones intermedias de la sustancia gris, unas pocas en neuronas de relevo sensitivo en el asta dorsal, y muy pocas en las motoneuronas anteriores. Algunas de las fibras no cruzan al lado opuesto del bulbo, sino que descienden ipsolateralmente por los haces corticoespinales ventrales, pero muchas de

estas fibras acaban cruzándose al lado opuesto de la médula, a la altura del cuello o de la región torácica superior. [1] (Figura 1.5)

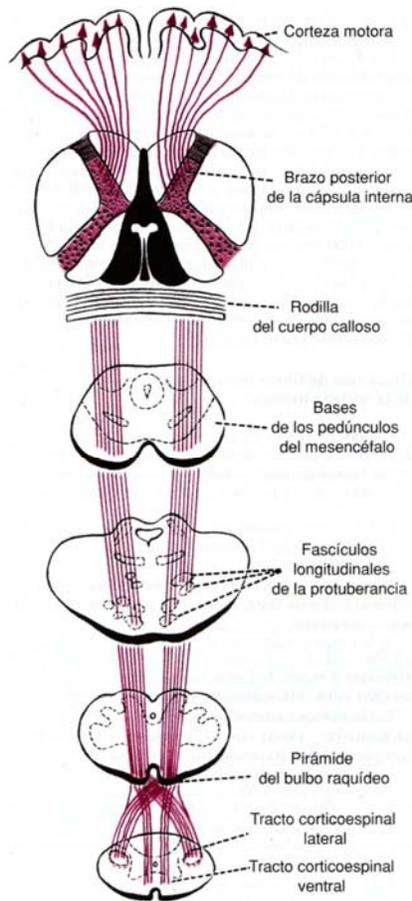


Figura 1.5: Tracto Piramidal. [1]

1.3. *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 con ello la generación de potenciales eléctricos. [1] (Figura 1.6)

El paso del impulso nervioso está asociado a una despolarización reversible transitoria de la membrana, acompañado de cambios en la permeabilidad en ella. Los iones sodio entran a la fibra nerviosa durante el ascenso del potencial de acción y los de potasio salen, a través de canales sensibles a voltaje (Tabla 1.1). Durante la despolarización el sodio (Na^+) sale selectivamente y regresa el potasio (K^+) por medio de la bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ la cual bombea estos iones en relación 2:1 respectivamente de esta manera se restablecen las concentraciones originales de estos iones y por lo tanto el potencial de reposo de la membrana. [11]

Tabla 1.1: Concentración aproximada de iones libres en axón de mamífero

Ion	Concentración extracelular (nM)	Concentración intracelular (nM)	[Ion] _e /[Ion] _i	Potencial de Nernst ^a (mV)
Na ⁺	145	12	12	+66
K ⁺	4	155	0.026	-97
Ca ²⁺	1.5	<10 ⁻³	>1,500	<97
Cl ⁻	120	4 ^b	30 ^b	-90 ^b

^a Potencial de equilibrio calculada a 37°C de la ecuación de Nernst

^b Cálculo asumiendo un potencial de reposo de -90 mV para la membrana muscular y que los iones de Cl⁻ están en equilibrio

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 y pueden ser empleados para transmitir señales a lo largo de estas membranas.

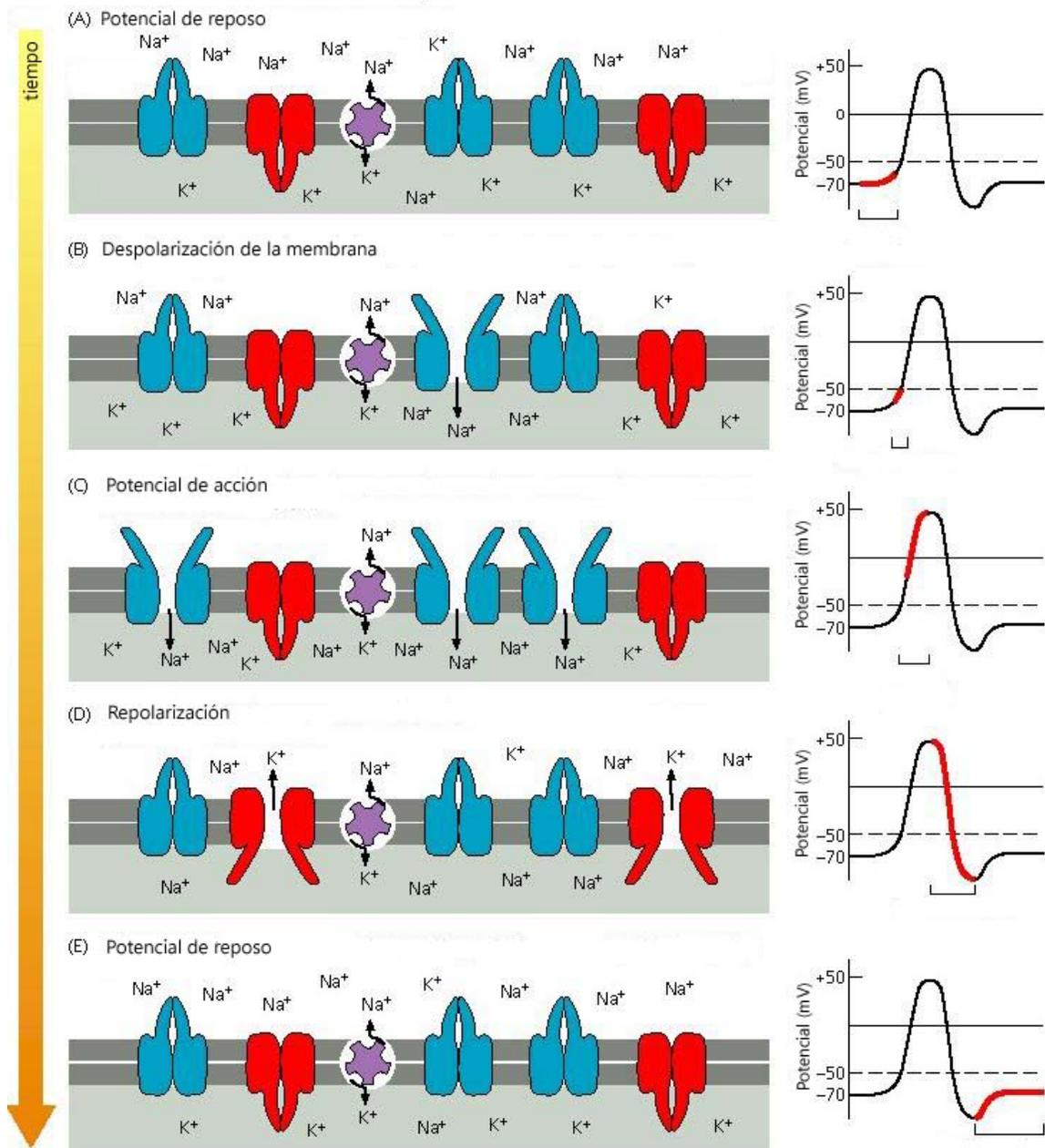


Figura 1.6: Esquema de la participación de los iones de sodio y potasio durante la despolarización de la membrana para generar el potencial de acción.

1.4. Potenciales evocados

Una herramienta muy útil para analizar la función neurológica son los potenciales evocados.

1.4.1. Definición de potenciales evocados

Los potenciales evocados (PE) son las respuestas eléctricas del sistema nervioso provocadas por un estímulo. Los potenciales se presentan como una secuencia de oscilaciones y se describen, por lo general, en términos de su magnitud (amplitud), polaridad (positiva o negativa) y el lapso en el que se presenta la respuesta respecto al estímulo (latencia). Para registrar estas ondas hay que aplicar varios estímulos, y promediar la respuesta recibida, ya que la amplitud es muy baja y está enmascarada por actividad cerebral basal sin relación con el estímulo. El registro de los PE se realiza por medio de electrodos de superficie sobre las extremidades, la médula espinal, o la cabeza, aunque también se emplean electrodos de aguja en el campo de la investigación. [12-13]

Los PE se denominan según el tipo de estímulo que produce la respuesta como potenciales evocados visuales (PEV), potenciales evocados auditivos (PEA), potenciales evocados somatosensoriales (PES), potenciales evocados motores (PEM). Son utilizados para valorar la integridad de las vías nerviosas, ya que si el estímulo visual, auditivo, o estimulación eléctrica dada en pies y manos no produce la onda esperada, con la amplitud y tiempo adecuados, quiere decir que hay alguna alteración de esa vía, y por lo tanto, hará pensar en un tipo de desorden. [13]

1.4.2. Descripción general

Los PE son generados por el cerebro o la médula espinal, dependiendo del modo de estímulo. La generación de los potenciales es debida a cualquier transmisión sináptica o al movimiento de las cargas propagadas por el potencial de acción en los nervios.

Los PE corticales son generados por la transmisión sináptica en la corteza y/o por el movimiento de carga en las proyecciones tálamo-corticales. Los PE subcorticales son generados por núcleos localizados debajo de la corteza y proyecciones de ésta, es posible la superposición con los PE corticales. El potencial de la corteza puede tener una gran contribución con los potenciales subcorticales. Son PE subcorticales los generados en el tronco cerebral y la médula espinal. [12]

El concepto de campo cercano y campo lejano es importante para la comprensión de los generadores de los PE. El registro de campo cercano significa que el potencial neuronal pasa inmediatamente por debajo de los electrodos de registro. El electrodo recoge el flujo de la corriente directa de carga entre el área de la despolarización y repolarización. La amplitud de un potencial de campo cercano puede ser muy grande, mientras que los

potenciales de campo lejano son atenuados por el cuero cabelludo, cráneo y otros tejidos. [12]

El registro de campo cercano muestra una breve onda positiva inicial seguida por una onda negativa más grande, que a su vez es seguida por otra positiva. La onda positiva inicial se debe a la despolarización electro tónica de la membrana bajo el electrodo. La posterior onda negativa se debe a la onda de despolarización que pasan por debajo del electrodo. Al final, la onda positiva se debe a la repolarización. La mayor despolarización es un potencial negativo aunque registros intracelulares muestran una reducción en el potencial de membrana negativo. Esto se debe a que la despolarización está dada por el influjo de carga positiva de iones sodio y calcio. El movimiento de estos cationes en las células produce un potencial negativo extracelular en el registro. [12]

La mayoría de los PE registrados son de campo lejano, ya que los generadores están en regiones tan profundas que los electrodos no puede obtener un registro de campo cercano. Es posible que un complejo de ondas esté conformado por ondas individuales generadas por estructuras anatómicas muy separadas unas de otras. [12]

La amplitud de los potenciales de campo lejano es pequeña, debido a la distancia entre el generador y los electrodos de registro, el potencial es más susceptible a la atenuación por el cuero cabelludo y otros tejidos. [12]

1.4.3. Características

Los PE consisten en una serie de ondas en respuesta a un estímulo. Cada una de estas ondas tiene las siguientes características: [12]

- ▶ Polaridad (positiva o negativa).
- ▶ Latencia.
- ▶ Amplitud.
- ▶ Forma de onda.

Polaridad

Se refiere al potencial positivo o negativo entre dos electrodos conectados al sistema de registro. La relación entre los cambios de potencial eléctrico en los electrodos y las deflexiones hacia arriba y debajo de las ondas en los PE dependen de (a) cómo se conectan los electrodos al sistema de registro y (b) la convención de polaridad usada en el sistema de registro (Figura 1.7).

Latencia

La latencia es el tiempo transcurrido entre el inicio del estímulo y la respuesta observable. Generalmente es medida desde el inicio del estímulo hasta el punto de mayor amplitud positiva o negativa de una deflexión, también es posible medir la latencia entre

deflexiones, llamada latencia interpicos, ésta representa el tiempo de conducción entre las estructuras que generan esas deflexiones (Figura 1.7).

Amplitud

La amplitud es la distancia vertical que representa una diferencia de voltaje, ésta puede ser medida como (a) amplitud pico que representa la diferencia de voltaje entre un pico o valle y el nivel de referencia, y como (2) amplitud pico a pico, es la distancia vertical entre picos sucesivos de polaridad opuesta. (Figura 1.7).

Forma de onda

La forma de los PE puede ser característica dependiendo del tipo de estimulación, sin embargo las formas varían considerablemente entre individuos en ausencia de patología.

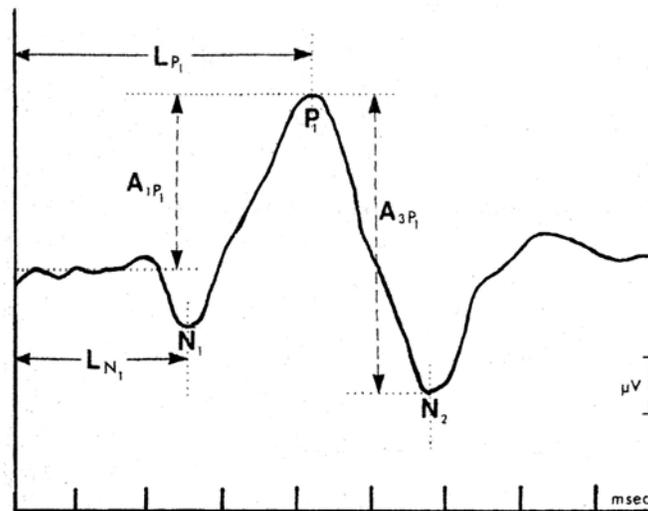


Figura 1.7: Características generales de los PE.
P, N → Polaridad (Positiva, Negativa), A → Amplitud, L → Latencia.
Modificado de [12]

Variabilidad

Los PE registrados en un individuo de forma consecutiva sin modificar las condiciones de registro o estímulo, pueden diferir. Los PE registrados bajo las mismas condiciones en diferentes individuos pueden diferir aún más. La variabilidad intraindividual (con el mismo individuo) e interindividual (entre individuos) es muy importante en el diagnóstico clínico, porque la capacidad de detectar anomalías decrece con el incremento de la variabilidad: mientras menor sea el rango de variación de un PE, mayor será la oportunidad de detectar leves anomalías.

1.4.4. Generadores de potenciales evocados

La localización de los generadores de los PE es difícil. Es atractivo pensar que una forma de onda compleja está compuesta de ondas individuales, cada una de ellas generadas por una determinada estructura neuronal a lo largo de la ruta a través del sistema nervioso. Lamentablemente, éste no suele ser el caso. El movimiento de las cargas a través del cerebro es tridimensional y puede producir una forma de onda compleja, incluso con un solo generador. Múltiples generadores pueden incrementar aún más este efecto. [12]

En general, si la respuesta es de gran amplitud y distribución localizadas, el generador está cerca del electrodo de registro. Si la respuesta es de baja amplitud y amplia distribución, es probable que el generador se encuentre más alejado y por lo general en el tejido subcortical profundo. Hasta el momento, los generadores de la mayoría de los PE sólo se han determinado de forma aproximada. [12]

Numerosos estudios se han realizado con el fin de identificar los generadores de los PE. Tres tipos de generadores parecen contribuir en los registros: (1) PE corticales, (2) PE subcorticales y (3) PE registrados en los nervios periféricos. [12]

- ▶ Los PE corticales se deben en gran medida a la suma espacial y temporal de potenciales postsinápticos inhibitorios y excitatorios, generados en las membranas de las células nerviosas en el soma y dendritas en respuesta a una señal de entrada producida por un estímulo. El potencial crea flujos de corriente que penetran en la superficie de la corteza, cráneo y cuero cabelludo, con lo que producen campos eléctricos detectables por los electrodos de superficie.
- ▶ Los PE subcorticales son probablemente una mezcla de dos componentes: (1) potenciales postsinápticos generadas en grupos de neuronas de relevo subcortical, y (2) potenciales de acción de tractos axonales. El primer componente, consiste en generadores estacionarios de campos eléctricos, probablemente responsable de los potenciales subcorticales que se pueden registrar con latencia similar en diversos sitios distantes de los electrodos. El segundo componente, consiste en la propagación de ondas de despolarización, esto podría explicar por qué algunos PE subcorticales aparecen con retrasos de hasta unos pocos milisegundos en diferentes sitios de grabación.
- ▶ Los PE registrados en nervios sensoriales se deben a una onda de despolarización propagada a lo largo de la membrana de las fibras nerviosas. Cuando pasa bajo un electrodo de registro superficial, la onda produce una desviación negativa que puede ser precedida y seguida de desviaciones positivas de menor amplitud. El potencial de acción compuesto puede incluir más desviaciones generadas por fibras de grupos de menor velocidad de conducción, pero estas desviaciones son de baja amplitud, debido a una mayor dispersión temporal de impulsos más lentos.

1.4.5. Potenciales evocados somatosensoriales

Los potenciales evocados somatosensoriales (PES) consisten en una serie de ondas que reflejan la activación secuencial de las estructuras nerviosas a lo largo de las vías somatosensoriales (columna dorsal-lemnisco medial y anterolateral). Aunque los PES pueden ser provocados por la estimulación mecánica, los estudios clínicos utilizan estimulación eléctrica en los nervios periféricos, lo que proporciona una mayor y más robusta respuesta. Los sitios de estimulación utilizados para diagnóstico clínico con PES son el nervio mediano en la muñeca, el nervio peroneal común en la rodilla, y/o la parte posterior del nervio tibial en el tobillo. Los electrodos de registro se colocan sobre el cuero cabelludo, la columna vertebral, y los nervios periféricos próximos al sitio de estimulación. La vía lemnisco-dorsal es el principal generador de PES dentro del sistema nervioso central. [12, 14]

Los PES se utilizan para el diagnóstico clínico en pacientes con enfermedades degenerativas, en el pronóstico de los pacientes en coma, vigilancia intraoperatoria, enfermedades desmielinizantes, entre otras. El registro de PES anormales puede ser el resultado de una disfunción a nivel de los nervios periféricos, plexo y raíces espinales, médula espinal, tronco cerebral, proyecciones tálamo-corticales, o la corteza somatosensorial. Dado que existen múltiples vías aferentes paralelas (por ejemplo, las vías anteriores espinal-tálamicas y extensiones dentro de la columna dorsal de la médula espinal), los registros de los PES pueden ser normales, incluso en pacientes con déficit sensorial. [15]

Los PES consisten en una serie de ondas que están relacionadas con la activación secuencial de estructuras neuronales a lo largo de la vía nerviosa somatosensorial. La mayoría de los PES son producidos por descargas eléctricas aplicadas a los nervios de las extremidades. Pueden ser registrados simultáneamente con electrodos colocados a lo largo de la vía somatosensorial. La estimulación de diferentes nervios periféricos produce PES con diferentes latencias y distribuciones de las ondas. [12]

Usualmente los PES de las extremidades superiores se obtienen por la estimulación del nervio mediano en la muñeca, y son registrados con electrodos de superficie sobre la clavícula, en el cuello, y en el cuero cabelludo; mostrando la actividad generada en el plexo braquial, porción superior de la médula espinal, y la corteza somatosensorial, respectivamente. Mientras que en los miembros inferiores, los PES son obtenidos por estimulación del nervio tibial posterior en el tobillo o en el nervio común de la rodilla, son registrados sobre las vértebras lumbares, torácicas inferiores, y en el cuero cabelludo; estos potenciales muestran la actividad de la cauda equina, porción baja de la médula espinal, y la corteza somatosensorial, respectivamente. Registros desde las vértebras torácicas superiores y las cervicales, generalmente no proporcionan registros fiables en la estimulación de miembros inferiores. [12, 16]

1.4.6. Estimulación del Nervio Tibial Posterior en el Tobillo

Las descargas eléctricas aplicadas en los nervios periféricos es el tipo de estímulo más utilizado en la práctica clínica, éstas pueden hacerse por medio de electrodos de superficie o de aguja. Las latencias pueden ocurrir dentro de 50 ms después del estímulo en sujetos normales. [12]

Sitio de estimulación

En la estimulación por electrodos de superficie, la piel en contacto con los electrodos debe ser limpiada y someterse a una ligera abrasión, y los electrodos deben recubrirse con gel conductor. La impedancia debe ser menor a $10k\Omega$ para reducir artefactos de estimulación. [12, 15]

Para la estimulación los electrodos deben colocarse a lo largo de la trayectoria del nervio. El electrodo proximal de estimulación debe ser conectado en la terminal negativa del estimulador (cátodo), colocarse a la mitad entre el borde medio del tendón de Aquiles y el borde posterior del maléolo medio. Mientras el electrodo distal es conectado a la terminal positiva (ánodo). El ánodo debe ubicarse a 3 cm distales al cátodo. (Figura 1.8) [12, 15]

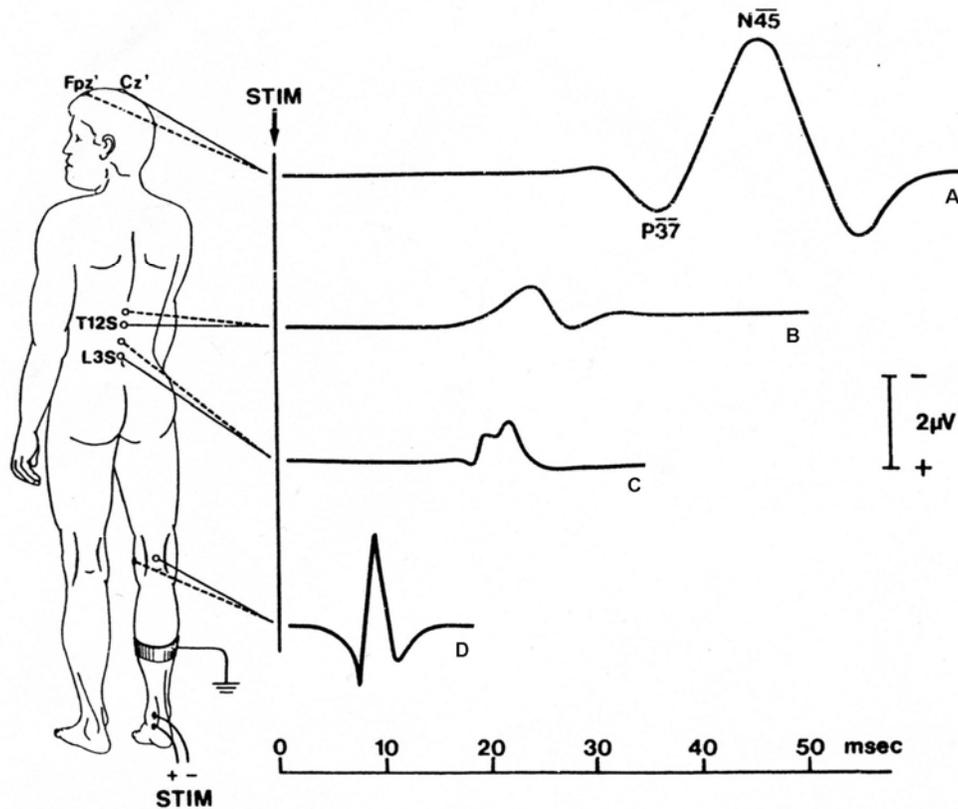


Figura 1.8: Montaje para PES con estimulación en el nervio posterior del tobillo. Trazos A) cortical, B) torácico, C) lumbar, D) fosa poplítea. Líneas sólidas, cátodo. Líneas discontinuas, ánodo. Modificado de [12]

Intensidad de estímulo

Para la estimulación de nervios mixtos, la intensidad es determinada por el umbral motor, esto es, una intensidad suficiente para producir una flexión plantar visible de los dedos del pie; para esto se emplean generalmente estímulos por corriente en el rango de 5-15mA utilizando electrodos de superficie, y corrientes menores para estimulación con electrodos de aguja. [12, 15]

Duración del estímulo

La duración del pulso eléctrico más utilizada en la estimulación de nervios mixtos es 200 μ s, un menor tiempo de estímulo tiende a estimular en mayor proporción a la porción motora del nervio mixto. [12, 15]

Frecuencia de estimulación

Los PES transitorios se obtienen con frecuencias de entre 4-7 estímulos por segundo. Frecuencias de estímulo menores suelen emplearse para destacar hasta los últimos picos de las ondas en registros de la corteza. [12, 15]

Lateralización del estímulo

Generalmente se estimula un lado del cuerpo a la vez, para identificar anomalías a cada lado de la vía nerviosa. La estimulación simultánea de ambos lados del cuerpo, en conjunción con registros unilaterales en la corteza somatosensorial, puede desenmascarar lesiones que no son detectadas mediante estimulación contra lateral. Sin embargo, la estimulación bilateral puede ocultar anomalías lateralizadas en estructuras subcorticales. [12]

La estimulación simultánea sólo es recomendada si las velocidades de conducción de los nervios periféricos son iguales, debido a que, un retardo en la vía aferente puede influir en la supresión de los PES registrados en la corteza somatosensorial y con esto sugerir problemas en la conducción en el sistema nervioso central. [12]

1.5. Fisiopatología de la lesión de la médula espinal

La lesión traumática de la médula espinal causa disfunción, con la pérdida de la función motora y sensitiva distal en la región caudal al punto de la lesión. Hay aproximadamente 400000 pacientes con lesión de la médula espinal en los Estados Unidos. La tasa de incidencia se estima en 1 de cada 1000 personas por año en los Estados Unidos, y los varones son cuatro veces más propensos que las mujeres a sufrir esta lesión. Las principales causas son accidentes vehiculares (46.9%), accidentes deportivos (8.7%), caídas (23.7%), lesiones por arma de fuego o cuchillo (13.7%), y otras causas (7%). Las lesiones se dividen en tres grupos por edades. El primero corresponde a personas jóvenes, entre los 16 y 25 años, que generalmente sufrieron la lesión a causa de una colisión de gran energía (accidente vehicular). El segundo consiste en personas mayores con estenosis espinal cervical causados por estrechamiento o espondilosis congénitas. Los pacientes en este grupo a menudo tienen la lesión con menor trauma y comúnmente no tienen fracturas vertebrales. El tercer grupo consiste de las personas con heridas de bala, que es la principal causa de lesión en muchas zonas urbanas. [17-18]

Hay cuatro tipos de lesión medular: 1) maceración, en la que la morfología de la médula está muy distorsionada, 2) laceración (heridas por arma de fuego o cuchillo); 3) contusión, que provoca hemorragia central en la médula y que puede formar cavidades en el tejido nervioso, y 4) sección, en la que no se presenta necrosis como en la contusión. En los dos primeros casos, la superficie de la médula es lacerada y una importante respuesta del tejido conectivo se provoca, mientras que en los dos últimos la superficie de la médula espinal no es violada y el componente del tejido conectivo es mínimo. De estos cuatro tipos de lesiones, las producidas por contusión representan del 25% al 40% de los casos y es una lesión progresiva. [17]

El modelo de lesión por contusión es el más comúnmente usado en la investigación de la lesión de la médula espinal. Dentro de los cuatro tipos de lesiones, el grado de lesión debe ser considerado, pues los modelos con lesiones incompletas se benefician más que los de lesión completa de acuerdo con el grado de recuperación que se puede obtener en las intervenciones experimentales. Es importante señalar que la lesión de la médula espinal clínicamente se presenta con mayor frecuencia como una lesión anatómicamente incompleta.

Los intentos para reproducir experimentalmente el daño medular dentro del laboratorio difieren del observado en el ser humano, debido a que el trauma se acompaña de fuerzas compresivas persistentes, la presencia de choque medular, lesiones asociadas en el accidente, que agravan la extensión del daño medular. Por otro lado existen diferencias en el metabolismo entre el hombre y los animales de experimentación, esto podría alterar los resultados observados, también, el ensayo de laboratorio requiere del empleo de anestesia, la cual podría interactuar con los tratamientos en estudio. El accidente traumático en el hombre necesita de diversas medicaciones para mantener su equilibrio clínico, que también podrían antagonizar con los efectos del tratamiento en cuestión. Además las terapias efectuadas en el laboratorio se practican de inmediato al daño medular, tal situación es muy difícil de realizar en el hombre. Pese a la dificultad para extrapolar los resultados obtenidos

con el modelo experimental, ésta no invalida los conceptos fisiopatológicos observados, ni la utilidad potencial del agente en estudio. [19]

Hay tres fases en la lesión de la médula espinal: aguda, secundaria, y crónica. En la fase aguda, que abarca desde momento de la lesión y se extiende hasta los primeros días, se desencadenan una variedad de procesos fisiopatológicos. Tras el impacto inicial, se destruye la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, ocasionando una alteración en la microvasculatura de la sustancia gris, induciendo hemorragias petequiales. Células sanguíneas y proteínas del suero invaden el área lesionada presentando edema. La destrucción de capilares causa isquemia, anoxia e hipoglucemia. La necrosis y la degradación de mielina de los axones dañados siguen 8-24 horas más, después de 48 horas los fagocitos sanguíneos se acumulan localmente para eliminar la mielina degenerada y otros residuos celulares. [17]

Los cambios en el flujo sanguíneo y la hipoperfusión afecta principalmente a la sustancia gris e induce la muerte neuronal primaria. La sustancia blanca es más resistente a los efectos de la isquemia e hipoxia, aunque se produce una hiperemia inicial e isquemia posterior. El edema se ve primero en la porción central del cordón espinal y se expande de manera centrífuga a la sustancia blanca [20]. En consecuencia, la parálisis puede extenderse a segmentos más altos. El muñón del axón proximal se retrae para formar la llamada retracción de los bulbos. Mientras el axón distal terminal se degrada (degeneración Walleriana). En el centro de la lesión se desarrolla una cavidad llena de fluido, un pseudoquiste. Esto es más acentuado en lesiones por contusión, pero se presenta también tras lesiones por sección. Alrededor de este pseudo quiste se forma una cicatriz, que consta de varios tipos celulares (cicatriz glial: astrocitos reactivos, microglía y fibroblastos) y componentes extracelulares (cicatriz fibrosa: deposiciones de la matriz extracelular, neuroglía). [21] (Figura 1.9)

Entre las 4-24 horas, el tejido que permanece viable cambia a un metabolismo oxidativo originando acidosis láctica. Durante los siguientes minutos después de la lesión, las células nerviosas dañadas responden con una serie de descargas de potenciales de acción. Estos potenciales se acompañan de desregulación iónica, se pierde el potencial de membrana y por lo tanto se despolarizan las neuronas y células gliales. Esto activa los canales presinápticos de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje y como resultado se liberan aminoácidos excitatorios en el espacio extracelular [22]. La despolarización incrementa la concentración de sodio (Na^{+}) y calcio (Ca^{2+}), y disminuye la concentración de potasio (K^{+}) intracelular, esto perturba la excitabilidad y la transmisión sináptica. El calcio es crucial: regula la permeabilidad para el sodio y potasio durante la excitación neuronal, controla la actividad de muchas enzimas críticas y el almacenamiento de neurotransmisores en las vesículas sinápticas. (Figura 1.9)

En la etapa secundaria, continúa la muerte celular por isquemia, cambios electrolíticos y edema. La hipoperfusión que se desarrolla en la sustancia gris se extiende a la sustancia blanca circundante, en sentido rostral y caudal, ésta enlentece o bloquea por completo la propagación de los potenciales de acción, contribuyendo al choque medular. La isquemia, debida a una disminución en la perfusión, es seguida de una fase de hiperemia, provocada por una reducción del pH perivascular, vinculada a la acumulación de

metabolitos ácidos tales como el lactato. Esta reperfusión aumenta el daño celular, por el influjo de radicales libres y otros tóxicos. Liberación de radicales libres superóxidos, óxido nítrico, que destruyen las membranas celulares, con la consiguiente muerte celular. Los radicales libres pueden además dañar directamente la integridad del tejido nervioso vascular, las proteínas celulares y los ácidos nucleicos. [17]

En situaciones normales las terminaciones axonales segregan pequeñas cantidades de glutamato, que se ligan a los receptores de neuronas postsinápticas estimulándolas a descargar impulsos. En contraste la liberación de glutamato en mayor cantidad como consecuencia de la ruptura de las membranas neuronales, axones y astrositos, hiperexcitan a las células vecinas. La acumulación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, responsable de la acción sobre receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) y no NMDA en neuronas y células gliales, dicha acción facilitaría el influjo de Ca^{2+} a la célula y su muerte, proceso conocido como excitotoxicidad. [23] (Figura 1.9)

Esta hiperexcitación celular desencadena la liberación de radicales libres que a su vez atacan las membranas y otros componentes celulares generando la muerte de neuronas vecinas y oligodendrocitos, células responsables de la producción de mielina en el SNC. La destrucción de oligodendrocitos explicaría porqué los axones no comprometidos por el trauma inicial, se desmielinizan y en consecuencia son incapaces de conducir los impulsos nerviosos después de la lesión. [19] (Figura 1.9)

Por último, en la fase crónica, que ocurre en el curso de días hasta años después de la lesión, continúa la apoptosis en ambas direcciones (anterógrada y retrógrada); se alteran receptores y canales iónicos en la expresión y en los niveles de activación, se produce cicatrización e inmovilización de la columna sobre todo en lesiones penetrantes; la desmielinización produce déficit de conducción; los macrófagos fagocíticos desaparecen del área lesionada y dejan un quiste carente de células rodeada de glía reactiva (en alrededor de un 20% de los pacientes), y se continúa con la presencia de cavidades llenas de líquido y que conduce a espasticidad y alteraciones sensoriales (siringomielia); cerca y en los axones preservados se presenta una respuesta regenerativa de crecimiento lateral de prolongaciones, pero no van más allá de 1 mm; los circuitos neuronales se encuentran alterados debido a los cambios en estímulos inhibitorios y excitatorios de entrada, en muchos tipos de células se desarrolla hiperexcitabilidad permanente, lo que se traduce en los síndromes de dolor crónico. [24-25] (Figura 1.9)

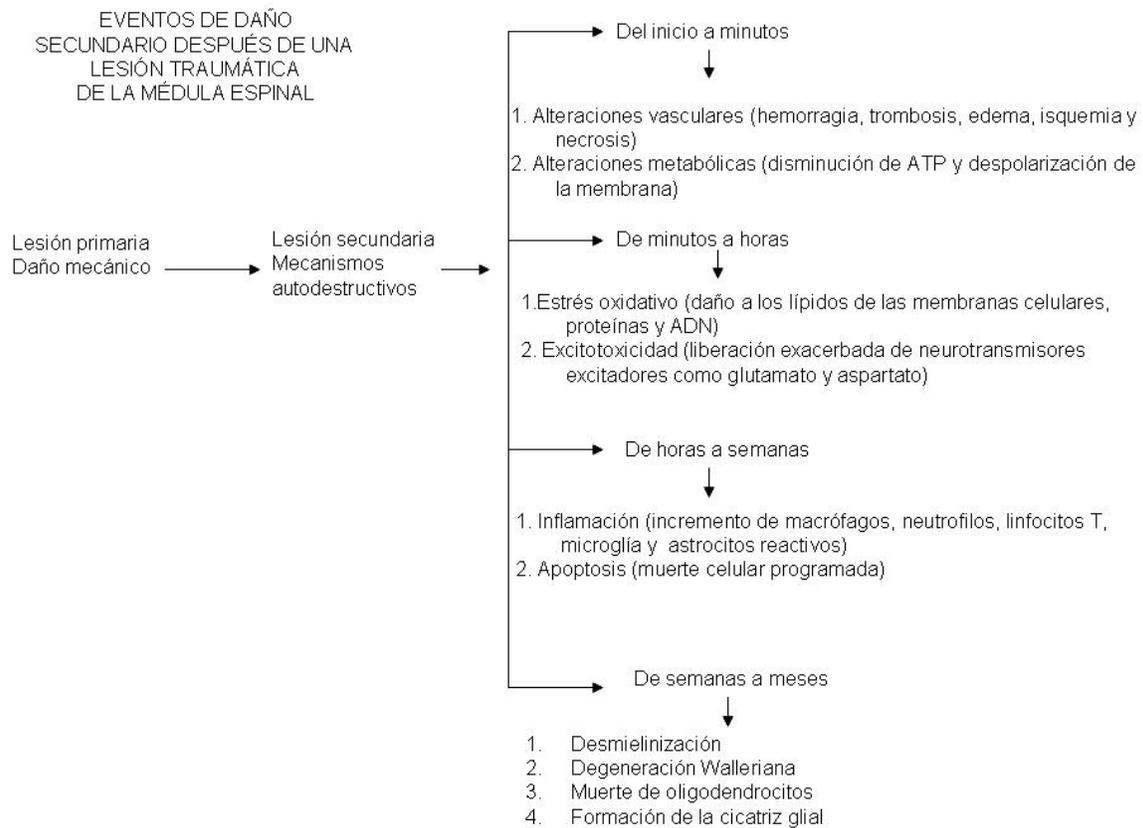


Figura 1.9: Principales eventos de daño secundario que se desencadenan después de una lesión traumática de la médula espinal. Modificado de [26]

1.6. Estrategias para restablecer la función de la médula espinal

Actualmente no se cuenta con ninguna estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica normal, debido a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario, así como a la baja capacidad de regeneración espontánea que se observa en el SNC.

Las estrategias terapéuticas actuales están enfocadas a proteger a las células nerviosas sobrevivientes después de la lesión (neuroprotección), en la recuperación de las pérdidas (neuroregeneración) y restablecimiento en las funciones perdidas.

1.6.1. Estrategias de neuroprotección

Se ha propuesto una gran variedad de estrategias terapéuticas (farmacológicas, administración de diversos factores tróficos, etcétera) enfocadas a detener los mecanismos fisiopatológicos desencadenados en la etapa aguda de la lesión.

1. Reducción de edema y de producción de radicales libres

La preocupación inmediata es la estabilización a través de la hemostasia y estabilización de la columna vertebral para evitar nuevos traumas. Una de las estrategias centrales de tratamiento agudo es la reducción del edema y/o la respuesta inflamatoria con corticosteroides, la más exitosa ha sido la metilprednisolona (MP), [27] actúa como antioxidante, inhibe la respuesta inflamatoria, y actúa como inmunosupresor [28-29] pero, puede agravar la necrosis neuronal, por lo tanto, un potente inhibidor de la peroxidación lipídica como el tirilazad mesilato (lazaroido) ha demostrado ser neuroprotector y tiene menos efectos secundarios que la MP. [30] Otros fármacos con propiedades antioxidantes son la ciclosporina A, EPC-K1, que es un diéster fosfato vinculado con vitaminas E y C (inhibe la activación de leucocitos y disminuye la lipoperoxidación), la melatonina, y altas dosis de naloxona, que han demostrado cierta eficacia en ensayos clínicos [31].

2. Inhibición de excitotoxicidad

Los antagonistas de receptores NMDA y no-NMDA [(Dizocilpina (MK-801) NBQX, riluzol] pueden ser útiles estrategias terapéuticas, pues inhiben la excitotoxicidad y la apoptosis [32-33]. La producción de óxido nítrico contribuyente a la muerte de células nerviosas. El tratamiento previo con N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ha demostrado mejorar la morfología celular [34]. Así también, la activación de receptores A1 de adenosina, ya sea por activación de adenosina o por agonista selectivo de receptores en un sitio específico. [35]

3. Reducción de inflamación

La inflamación es un mecanismo de reparación endógeno, pero, se ha demostrado que la cascada inflamatoria produce varias vías de degradación, como la vía de la prostaglandina. Agentes antiinflamatorios se han utilizado con cierto éxito. Administración de la citocina antiinflamatoria IL-10, a pesar de la mejora en el comportamiento del aparato locomotor que se registró (preservando la materia gris) [36] se ha retraído su uso [37]. Inhibidores de la ciclooxigenasa (COX)-2 han demostrado neuroprotección [38-40] en modelos de lesión por contusión. La hipotermia, ya sea medular o sistémica, proporciona protección a células nerviosas, disminuye la muerte celular y reduce la inflamación. El mecanismo puede estar relacionado con la inhibición en el aumento de las concentraciones extracelulares de aminoácidos excitatorios. [41-42]

4. Inhibición de apoptosis

Un enfoque consiste en la inhibición de caspasas, pues se cree que desempeñan un importante papel como mediador de la apoptosis [43-44]. Otra estrategia que ha recibido atención por su papel en la degradación celular, tanto en la necrosis como en la apoptosis es la calpaina. Calpains son activadas por Ca²⁺ por lo que juegan un papel importante en la degradación del citoesqueleto en células dañadas. Así, los inhibidores de la calpaina podrían reducir o retrasar la apoptosis [31]. Por último, la administración exógena de neurotrofinas ha sido considerada útil para el rescate de las células que han perdido apoyo trófico debido a la muerte de las proyecciones de las neuronas, innervación del objetivo, u

oligodendrocitos. Las neurotrofinas se han administrado con cierto éxito, incluyen el factor de crecimiento del nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). [45-49]

1.6.2. Estrategias de neuro-regeneración

Después de producirse una LTME se observa pobre regeneración espontánea. Se sabe que existen diversos eventos que contribuyen con este proceso, como la cicatriz glial, la inhibición de la remielinización, la propia muerte celular y la producción insuficiente de factores de crecimiento que permitan la regeneración axonal. [23]

5. *Desmielinización y déficit de conducción*

Se sabe que, con lesiones neuronales, se presenta un incremento en los potenciales de acción que se produce a causa de la liberación masiva de neurotransmisores. Esta liberación masiva, junto con los cambios iónicos, puede resultar en la muerte de las células nerviosas. La estrategia de inhibición depende de los canales de Na^+ , pues proporcionan la base iónica del potencial de acción. El bloqueador de los canales de Na^+ tetrodotoxina ha demostrado un rescate de tejido nervioso y proporciona un ambiente más adecuado para la recuperación [50]. En este sentido, es importante señalar que muchos de los axones son desmielinizados como resultado del daño secundario. El empleo de un bloqueador de los canales de K^+ mediados por voltaje, 4-aminopiridina (4-AP) se basa en que estos quedan expuestos internodalmante como resultado de la desmielinización, esto altera considerablemente las propiedades de conducción en los axones sobrevivientes [51-53].

Otra estrategia para la desmielinización es el trasplante de células que pueden producir nueva mielina y restablecer el déficit de conducción. Células que se han ensayado con cierto éxito en modelos animales incluyen: células del bulbo olfativo, oligodendrocitos, y las células de Schwann. [17]

6. *Regeneración axonal*

Las células nerviosas tienen la capacidad intrínseca necesaria para el crecimiento, en consecuencia, el entorno debe ser el responsable de un ambiente no propicio para la regeneración neuronal. Hay varias estrategias que en la actualidad están orientadas a proporcionar los ambientes permisivos para el crecimiento. Durante el desarrollo nervioso, una variedad de moléculas en la matriz extracelular promueven el crecimiento y orientación de los axones, estos posteriormente se inhiben en el SNC adulto. Las proteínas de la matriz extracelular están surgiendo como factores clave para regenerar neuronas.

7. *Transplante de células*

Después de la lesión, con la pérdida de las células nerviosas y de células que proporcionan la mielina para una conducción adecuada, la solución obvia sería

proporcionar células que puedan sustituir la pérdida de la función, servirían como fuente: células madre, células del bulbo olfativo [54], células de Schwann [55], ganglios de la raíz dorsal, nervio periférico. [56]

8. Implantes

Una lesión medular resulta en una cavidad que se extiende con el tiempo, lo que deja anatómicamente incompleto el sitio de lesión. Las fibras nerviosas que puedan mostrar regeneración o crecimiento de brotes, se encontrarán con una brecha física que requiere un puente con un ambiente favorable. Por tanto, puentes como células de Rafé, tejido fetal, material artificial han sido implantados con cierto éxito [55]. Las células de Rafé trasplantadas han demostrado capacidad de extender axones a través de la materia gris, formar sinapsis y disminuir la gliosis en el sitio. [57-60]

Implantes compuestos de las células de Schwann [55], e injertos de nervios intercostales [61] han demostrado regeneración axonal, siendo capaces de crecer a través de la brecha que produce la lesión. También, implantes de células del bulbo olfativo han demostrado que se alinean al tejido, emigran grandes distancias, y promueven la recuperación funcional y regeneración a través de sitio de la lesión [62]. Células nerviosas progenitoras humanas y células madre embrionarias se han utilizado en los modelos de lesión espinal y han demostrado recuperación funcional. [56, 63]

Los avances en el campo de los biomateriales han brindado la oportunidad de cerrar la brecha con materiales artificiales, como los hidrogeles biodegradables o combinaciones de hidrogeles y células [55], que puede promover la regeneración. Las propiedades deseadas de estos puentes sintéticos son proporcionar al mismo tiempo un sustrato físico para el tejido y el crecimiento axonal sin desencadenar reacciones antigénicas. Aunque este enfoque es reciente, existen grandes avances con el uso de los polímeros. [64]

9. Recuperación de la función a través de estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica funcional (FES) es una técnica que utiliza corrientes eléctricas para activar los nervios afectados por la lesión, hay una gran variedad de modalidades de FES, éstas se basan en estimulación transcutánea o directa de las terminaciones distales de los nervios. La FES contribuye a la disminución de las complicaciones médicas, tales como trombosis venosa, osteoporosis y fracturas de huesos se redujeron, así como también al fortalecimiento de las extremidades y para el acondicionamiento cardiovascular, ha tenido cierto éxito en términos de mejoras fisiológicas como el aumento de la masa muscular, mejora de la circulación de la sangre, función intestinal y de vejiga. [65]

10. Biomateriales para reparar la médula espinal

La falta de regeneración que se observa después de una lesión traumática de la médula espinal, ha llevado a desarrollar nuevas estrategias para tratar de reparar el tejido dañado. Los primeros reportes a nivel mundial señalan el uso de implantes de filamentos de carbón que sirvieran como puente para el crecimiento de los axones dañados en la médula

espinal de rata [66]. Implantaron un filamento de carbón en ratas sometidas a un modelo de sección completa de la médula espinal y observaron crecimiento axonal sobre y entre los filamentos, concluyendo que los filamentos de carbón servían como superficie para adherir de manera favorable los axones en crecimiento así como probablemente funcionaban como guía mecánica.

El uso de microesferas con factor de crecimiento nervioso (NGF) encapsulado en ovoalbúmina unida con polímeros biodegradables instaladas en el sitio de la lesión, [67] para favorecer los procesos de regeneración axonal. Esta tecnología se probó en células PC12 para determinar la bioactividad del NGF liberado. Los resultados demostraron que el NGF es bioactivo hasta por 91 días.

El Hidrogel biocompatible de poli[N-(2-hidripropil)metacrilamida] (PHPMA), que además tiene una región de adhesión celular de fibronectina Arg-Gly y Asp [68]. Este biomaterial se probó en un modelo de lesión de la médula espinal por hemisección, en ratas Sprague-Dawley. El hidrogel fue insertado en el interior de la médula espinal, posteriormente se cerró la duramadre. Los resultados demostraron que el polímero de hidrogel provee una estructura en tercera dimensión y una continuidad a través de la zona dañada, facilitando la migración y reorganización de las células. También se pudo observar angiogénesis y crecimiento axonal dentro de la microestructura y nuevo tejido en ella, así como crecimiento axonal dirigiéndose a la zona supraespinal dentro del segmento de la médula espinal reconstruido. En este trabajo también se observó que la presencia del hidrogel disminuye la necrosis y la formación de cavidades, por lo que los autores señalan que este polímero podría ayudar en la reparación de la médula espinal lesionada.

El uso de polímeros en forma de tubos que guíen y sirvan de puente entre la zona de transición a los axones en crecimiento [69]. Usando un polímero reabsorbible hecho de poli(D,L-ácido láctico) (PLA₅₀) con un co-polímero de peso molecular alto de poli(L-ácido láctico) mezclado con oligómeros al 10% de poli(L-ácido láctico) (PLA_{100/10}). Los polímeros se implantaron en el tejido nervioso de ratas adultas Fisher sometidas a una sección completa de la médula espinal y se hizo un seguimiento de 4 meses. Los resultados demostraron que desde las 2 semanas los tubos contenían tejido nervioso medular y vasos sanguíneos y se observó la mayor cantidad de axones mielinizados 1 mes después del implante. En este trabajo se concluye que existe crecimiento de fibras y mielinización dentro del implante hecho con el polímero PLA_{100/10}, 2 meses después del implante. Sin embargo, se observó un decremento de este fenómeno 4 meses después, por lo que los autores recomiendan más estudios para optimizar esta técnica.

Los filamentos hechos con poli-β-hidroxibutirato (PHB) y alginato de fibronectina + hidrogel es otro material biodegradable para facilitar el proceso de regeneración y dirigir a los axones en crecimiento después de una LTME [70], se observó que el implante de PHB reduce la muerte celular en un 50% en una sección del tracto rubroespinal a nivel de la vértebra L1. El uso de los componentes por separado no tiene efecto en la supervivencia de las neuronas. Asimismo, se adicionaron células de Schwann neonatales en los trasplantes de PHB, observando regeneración de los axones dentro del implante y a lo largo del tejido nervioso, sugiriendo que el uso de estos biomateriales, más las células de Schwann, puede servir como soporte neuronal con un incremento de la regeneración después de una LTME.

También se ha propuesto el uso de tubos de hidrogel hechos de poli(2-hidroxietil metacrilato-co-metil metacrilato) (p(HEMA-co-MMA)), como potenciales canales guías del crecimiento axonal en el sistema nervioso central. Las características de estos tubos son: suavidad y flexibilidad con semejanza a un gel con macro-poros interconectados entre las capas, que se controla por una formulación química [71].

Sin embargo, se ha demostrado que la degradación de estos polímeros puede causar una reacción inflamatoria, aunque algunos de ellos son inmunológicamente inertes, especialmente resistentes dentro del sistema nervioso [72-73]. En algunos polímeros la adhesión de los axones a estos compuestos es pobre [74], al utilizar redes recubiertas con una matriz de laminina, se logró que una gran cantidad de axones en crecimiento se unieran a la matriz. Se han desarrollado biomateriales con capacidad para unir péptidos (factores tróficos, fármacos, etc.) encapsulados, que se liberan lentamente [75]. En los polisacáridos también se ha encontrado una aplicación de ingeniería para reparar el tejido dañado. El ácido hialurónico puede facilitar la regeneración axonal [76]. Se han desarrollado polímeros que son solubles en agua y con capacidad para adherirse al tejido [77]. Las fibras de colágena han servido como guía y soporte para el crecimiento axonal [78], asimismo, se han probado en combinación con otros materiales para inducir regeneración [79]. El uso de materiales que sean biocompatibles para restaurar el tejido nervioso dañado ha avanzado rápidamente desarrollando materiales que funcionan como puentes para reparar la médula espinal. Aunque parece difícil utilizar esta tecnología, podría ser factible dados los recientes avances en la ciencia de biomateriales.

1.7. Polímeros semiconductores

Los polímeros semiconductores son materiales formados por largas cadenas de hidrocarburos con dobles enlaces alternos o conjugados; los cuales reúnen las propiedades de los polímeros tradicionales y de los metales, por tanto presentan características especiales e interesantes, que involucran el transporte de cargas eléctricas.

Los polímeros conductores son un subgrupo del amplio y antiguo grupo de conductores eléctricos orgánicos e inorgánicos. Según las notas históricas, en 1862 H. Letheby, del College of London Hospital, mediante la oxidación anódica de anilina en ácido sulfúrico, obtuvo un material parcialmente conductor que probablemente era polianilina. A esta sustancia se la denominó anilina negra y fue muy utilizada en tintes de todo tipo e imprentas. [80]

Casi un siglo después, en 1958, Ziegler y Natta sintetizaron poliacetileno mediante la polimerización de acetileno en hexano, usando además un catalizador (catalizador Ziegler-Natta). El material resultante era un polvo que tenía una estructura altamente cristalina y regular, y que también era negro.

A principios de los setenta, el descubrimiento de que un polímero inorgánico explosivo, el polisulfuronitruro (SN)_x, era superconductor a temperaturas extremadamente bajas representó un gran salto en el interés por este tipo de polímeros. Sin embargo, también a principios de los setentas, fue el poliacetileno el que sin duda centró la atención en este campo de investigación. Un investigador llamado Shirakawa quería sintetizar poliacetileno con el método tradicional de Ziegler-Natta, pero, debido a un error, agregó mil veces más catalizador que el requerido. En lugar de obtener un polvo oscuro y opaco, obtuvo una película con apariencia de aluminio y pegadiza. Así, aunque la función del catalizador es favorecer la reacción de polimerización, una cantidad excesiva de este reactivo provocó importantes cambios en la estructura del polímero. A partir de aquí, Shirakawa adaptó el método de Ziegler-Natta para la obtención de películas de poliacetileno. No obstante, pese a su apariencia metálica, este poliacetileno no era un material conductor, sino semiconductor. [81, 82]

En 1975 Heeger y MacDiarmid estudiaban las posibles propiedades metálicas del (SN)_x, pero después de conocer a Shirakawa se interesaron por el poliacetileno. Gracias a la experiencia anterior que tenía con el (SN)_x, MacDiarmid quiso modificar el poliacetileno con vapor de yodo, cloro o bromo. Después de exponerlo, el poliacetileno mostraba una conductividad eléctrica que representaba un incremento (especialmente en el caso del yodo) de nueve órdenes de magnitud respecto al material original. Este tratamiento con halógenos se denominó dopado, debido a su analogía con el dopado de semiconductores.

La forma dopada de poliacetileno tenía una conductividad de $10^5 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$, un valor mayor que cualquier otro polímero hasta entonces conocido. Como comparación, se puede citar que la conductividad del teflón (aislante) es de $10^{-16} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$, mientras que la de la plata o el cobre (buenos conductores) es de $10^8 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$. [80]

Después de muchos años dedicados al estudio de los polímeros conductores los Profesores Heeger, MacDiarmid y Shirakawa fueron galardonados con el Premio Nobel de Química del año 2000 “por el descubrimiento y desarrollo de los polímeros conductores”.

Desde entonces se ha comprobado que más de cien polímeros y derivados son capaces de conducir la corriente eléctrica, algunos incluso sin ser dopados.

Este aumento de conductividad se debe principalmente a la adición de ciertas cantidades de otros productos químicos (dopado), también influye la presencia de dobles enlaces conjugados que permiten el paso de un flujo de electrones.

La técnica de dopado consiste en el agregado de átomos que ayudan a aumentar las propiedades eléctricas. Estos átomos pueden actuar cediendo electrones libres a los enlaces poliméricos o sustrayendo electrones, lo que equivale a generar cargas positivas o huecos. En ambos casos la cadena del polímero se torna eléctricamente inestable y, al aplicar una diferencia de potencial, los electrones se desplazan por el polímero.

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. Los polímeros semiconductores poseen una amplia gama de conductividades que se ven afectadas por el porcentaje de dopaje, concentración de las cadenas de material, asimetría del polímero, dirección en que debe conducirse, etc.

1.7.1. Propiedades de los polímeros semiconductores

Las propiedades de los materiales están fuertemente determinadas por el arreglo tridimensional de los átomos o moléculas que lo constituyen. Este ordenamiento puede cambiar, por ejemplo cuando se flexiona un metal, sin alterar significativamente las propiedades. En cambio, los polímeros semiconductores son moléculas cuya disposición atómica no puede cambiar sin que la molécula altere sus propiedades. Sin embargo, la disposición de una cadena polimérica a la vecina sí puede ser alterada.

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 conductores son en general degradables. Por otra parte, la cantidad de diferentes materiales que pueden producirse a partir de metales y semiconductores inorgánicos está determinada por los materiales puros y sus aleaciones. Ésta es necesariamente limitada. Contrariamente, la cantidad de compuestos orgánicos diferentes que se pueden sintetizar es técnicamente infinita.

En la Tabla 1.2 se muestra una comparación de las propiedades de materiales inorgánicos (metales, semiconductores) y polímeros conductores.

Tabla 1.2. Comparación de las propiedades de materiales electrónicos inorgánicos y polímeros conjugados.

Propiedad	Material inorgánico (metales y semiconductores)	Polímeros conjugados (polímeros semiconductores)
Conductividad	Alta	Baja
Estructura	Atómica	Molecular
Resistencia térmica	Buena	Pobre
Resistencia química	Buena	Pobre

1.7.2. Síntesis de polímeros semiconductores

Los polímeros conductores pueden ser sintetizados por los siguientes métodos: [83]

- ▶ Químico
- ▶ Electroquímico
- ▶ Fotoquímico
- ▶ Metátesis
- ▶ Emulsión concentrada
- ▶ Inclusión
- ▶ Polimerización de estado sólido
- ▶ Polimerización por plasma
- ▶ Pirólisis
- ▶ Enzimática

Pero pueden ser sintetizados y dopados por métodos químicos, electroquímicos o por polimerización por plasma.

Método Químico

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

La síntesis consiste en hacer pasar el monómero por un recipiente de vidrio cuyas paredes están recubiertas del catalizador, se formará una película del grosor de una hoja de papel que se despega de las paredes del recipiente y se lava con agua. El dopado puede realizarse haciendo pasar el polímero por una disolución con el dopante.

Método Electroquímico

Empleando técnicas electroquímicas la síntesis y el dopado se producen simultáneamente. Se introducen dos electrodos metálicos en una disolución que contenga el

dopante y el monómero que más tarde constituirá el polímero. Pueden realizarse dos tipos de dopado, tipo n o tipo p. Para el dopado tipo p se extraen electrones de los monómeros adyacentes al electrodo positivo, así la polimerización se produce sobre el electrodo. Al ser deficiente de electrones, el polímero atraerá hacia sí los iones negativos. En el caso de la conductividad tipo n el proceso es contrario, es decir, se extrae un electrón de uno de los dobles enlaces generando un radical catión, el cual no es estable, pero arrancando un segundo electrón se forma un catión. Este catión puede desplazarse por la cadena pasando de un doble enlace a otro conduciendo, de este modo, la electricidad. La extracción de electrones, u oxidación, puede continuar formando más de un catión por cadena. Sin embargo los materiales tienden a ser neutros, tal y como nos indica el principio de electroneutralidad, y un material lleno de cargas positivas necesita ser compensado por algo. Dado que la oxidación del material se lleva a cabo en una celda electroquímica alguno de los componentes de dicho sistema tendrá esa responsabilidad. Los electrodos están fijos y el disolvente es habitualmente neutro, pero debido a este último hecho se añade un electrolito que permite la conducción iónica a través del disolvente. Este electrolito (una sal o a veces un ácido) está formado por especies positivas (cationes) y negativas (aniones), siendo estas últimas las que compensarán las cargas positivas generadas en nuestro polímero (los cationes se desplazarán al electrodo contrario para compensar las cargas negativas ahí generadas manteniéndose nuevamente el principio de electroneutralidad).

Empleando técnicas electroquímicas la síntesis y el dopado se producen simultáneamente. Se introducen dos electrodos metálicos en una disolución que contenga el dopante y el monómero que más tarde constituirá el polímero. Para el dopado p se extraen electrones de los monómeros adyacentes al electrodo positivo, así la polimerización se produce sobre el electrodo. Al ser deficiente de electrones el polímero atraerá hacia sí los iones negativos. En el caso de la conductividad tipo n el proceso es el contrario.

Pero también se puede dopar un polímero después de haberlo sintetizado por medios electroquímicos. Se hace uniendo unas cintas de polímero a un electrodo sumergido en una disolución que contenga el ión dopante.

1.8. Polimerización por plasma

Los polímeros obtenidos mediante métodos convencionales de polimerización química o electroquímica se producen a gran escala en la industria y tienen un gran número de aplicaciones en el campo de los textiles, plásticos y materiales eléctricos. Debido a la uniformidad de la cadena polimérica que tienen poseen una buena resistencia mecánica, y excelentes propiedades elásticas y plásticas. Sin embargo, la mayoría de los polímeros obtenidos mediante los métodos convencionales se caracterizan por una baja resistencia a la corrosión y un alto grado de solubilidad. [84]

En la polimerización por plasma no es necesario contar con un monómero con un doble enlace, una estructura aromática o una cadena insaturada como en los métodos tradicionales. Prácticamente todo el carbono se puede polimerizar por plasma. Debido a las altas energías (en comparación con la unión de energía de las moléculas) en el plasma (los

electrones, los iones, especies reactivas) puede darse la destrucción de la estructura inicial del monómero y un nuevo compuesto se obtiene a partir de las moléculas elementales.

La polimerización por plasma es la formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado (plasma) compuesto de partículas altamente reactivas, moléculas, iones, y radicales. Se obtiene generalmente ionizando gases con ayuda de un campo eléctrico por radio frecuencia, de microondas, o mediante un filamento caliente, este proceso ha llamado la atención de científicos e ingenieros por ser un método poco convencional de polimerización. Por medio de esta técnica se puede sintetizar un polímero, el cual se deposita sobre todas las superficies que están expuestas al plasma.

Este es un método efectivo para la preparación de películas delgadas con estructura densa y entrecruzada que se puede usar como capa aislante o semiconductor, como recubrimiento protector, como membrana permeable, etc. [85]

La polimerización por plasma se lleva a cabo en el interior de la cámara tubular de vidrio bajo condiciones de vacío. En el proceso de polimerización por plasma, los reactivos (monómeros, polímeros, dopantes) ingresan en la cámara de reacción. Los componentes comienzan en estado líquido o sólido, en recipientes separados de la cámara. Se convierten en gas e ingresan en la cámara por acción del vacío generado.

El proceso para ionizar el gas se lleva a cabo en la cámara de reacción con la ayuda de un campo eléctrico creado por un generador de radio frecuencia. El polímero se forma a partir de las partículas reactivas resultantes de la ionización del gas (iones, electrones, fotones, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras) bajo la influencia del plasma. Las partículas ionizadas interactúan con la superficie del sustrato y entre ellas, recubriendo y depositándose como película delgada de material. No se requiere de intermediarios químicos para que ocurra la oxidación. La oxidación es promovida por el impacto de los electrones libres que se encuentran a lo largo del campo eléctrico que colisionan con las moléculas del monómero.

Las ventajas y desventajas del uso de la polimerización por plasma:

Ventajas:

- ▶ El monómero reacciona para producir el polímero sin introducir ningún compuesto químico oxidante. [86]
- ▶ El polímero se deposita sobre cualquier superficie expuesta al plasma.
- ▶ En la síntesis ocurren ramificaciones y entrecruzamientos con otras cadenas modificando las propiedades químicas y físicas de los materiales, tienen una baja solubilidad y buena resistencia a la corrosión.
- ▶ Excelente resistencia a la mayoría de los productos químicos.
- ▶ Las películas tienen buena adhesión a superficies plásticas y metálicas.
- ▶ La polimerización por plasma puede mejorar selectivamente las propiedades de la superficie de otros materiales mientras la mayor parte de las características siguen siendo las mismas. [87]

- ▶ Debido a las condiciones en la cámara de reacción durante la síntesis, el material y las superficies expuestas al plasma se esterilizan.

Desventajas:

- ▶ El costo de los equipos.
- ▶ Las superficies recubiertas tienen baja resistencia a la abrasión.
- ▶ Baja tasa de depósito de polímero.
- ▶ El proceso no se puede realizar en forma masiva

1.9. Polímeros por plasma en aplicaciones biomédicas

El uso de materiales sintéticos, o materiales naturales modificados para aplicaciones biomédicas es extenso. Estos materiales se conocen como *biomateriales*, los cuales han sido exhaustivamente investigados por grupos académicos y por la industria, generando un gran interés para la ciencia. Ver tabla 1.3 [88]

Los biomateriales se emplean con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que están expuestos de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo, aunque también pueden estar localizados fuera del cuerpo.

Tabla 1.3: Biomateriales en aplicaciones biomédicas

Aplicación	Número usado al año
Oftalmológica	
Lentes intraoculares	1'400,000
Implantes después de enucleación	5,000
Cardiovascular	
Injertos	250,000
Válvulas	75,000
Marcapasos	130,000
Reconstructiva	
Prótesis de seno	100,000
Prótesis de nariz y barbilla	10,000
Prótesis peniana	40,000
Prótesis dental	20,000
Ortopedia	
Cadera	90,000
Rodilla	65,000
Hombros y articulaciones	50,000
Otras áreas	
Catéteres	200'000,000
Equipo diálisis	16'000,000
Suturas	20'000,000

Los biomateriales son analizados bajo dos aspectos: biocompatibilidad, es decir, la interacción existente entre el biomaterial y el tejido vivo, y que reemplace satisfactoriamente las funciones del tejido que suplanta.

La polimerización por plasma ofrece un método efectivo para la generación de biomateriales y/o el mejoramiento de los ya existentes, debido a que las respuestas biológicas a los biomateriales están en gran parte controladas por la composición química y estructural de la superficie. El tratamiento por plasma puede modificar las características de las superficies. [87]

Algunas de las aplicaciones sugeridas para biomateriales por plasma son las siguientes: prótesis vasculares [89], superficies compatibles con la sangre [90], lentes intraoculares [91], superficies para cultivo celular [92], electrodos implantables [93], oxigenadores de sangre [94], catéteres [95,96], modelos de superficies para la exploración con sistemas biológicos [97].

2. Justificación

Una de las estrategias para el tratamiento de lesiones de la médula espinal es el uso de polímeros para tratar de restablecer la función nerviosa, en este sentido, el empleo de polímeros biocompatibles ha avanzado rápidamente, desarrollando materiales que funcionan como puentes para reparar la médula espinal, sin embargo, éstos son sintetizados por métodos químicos o electroquímicos, lo que podría interferir con sus efectos benéficos, ya que se ha demostrado que la degradación de éstos puede causar una reacción inflamatoria.

Los polímeros sintetizados por plasma presentan una estructura química diferente a los obtenidos mediante síntesis química o electroquímica, ya que presentan una mayor adherencia, e incremento de entrecruzamientos y prolongaciones, además de no requerir otros elementos durante su síntesis.

Por otra parte, el monitoreo de la actividad motora es un indicador del restablecimiento de la función nerviosa. Existen diferentes herramientas para evaluar esta función, como son las escalas conductuales que valoran la calidad de la marcha, si bien estas escalas proporcionan un indicador de integridad de la médula espinal, sólo evalúa la función motora de manera cualitativa ya que se utiliza un criterio observacional. Otra herramienta de evaluación de la función nerviosa es el monitoreo neurofisiológico de la médula espinal a través de PES, pues proporciona una medida cuantitativa de la actividad bioeléctrica de la médula espinal.

De manera adyacente se observará la cantidad de tejido preservado como un indicador del efecto neuroprotector y de la integración del polímero al tejido nervioso a través de un estudio histológico.

Con base en lo anterior, en este proyecto de investigación se propone utilizar implantes de polímeros sintetizados por plasma como tratamiento en la lesión de la médula espinal, y el monitoreo de la evolución de la lesión a través de PES y la escala conductual BBB para evaluar la evolución en la calidad de la marcha.

3. Hipótesis

Si las características físicas y químicas de tres polímeros derivados del pirrol sintetizados por plasma, inciden sobre la recuperación de la función nerviosa perdida después de una LPSC de la médula espinal, entonces se observará el restablecimiento de la señal nerviosa e incremento en la cantidad de tejido preservado en los animales con implante polimérico al ser comparados con un grupo control.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de tres implantes poliméricos sintetizados por plasma sobre la función nerviosa y la cantidad de tejido preservado en un modelo de LPSC de la médula espinal de ratas.

4.2. Objetivos particulares

Caracterización los polímeros a través de: análisis infrarrojo, conductividad eléctrica, y análisis morfológico y elemental.

Evaluar la recuperación funcional de ratas sometidas a un modelo de LPSC de la médula espinal en un grupo control y tres grupos con transplante de PPy, PPy/I y PPy/PEG por medio de PES.

Evaluar la recuperación funcional de ratas sometidas a un modelo de LPSC de la médula espinal en un grupo control y tres grupos con transplante de PPy, PPy/I y PPy/PEG por medio de una escala de evaluación motora BBB.

Evaluar el efecto neuroprotector de tres implantes poliméricos sintetizados por plasma, con base en la cantidad de tejido preservado en un modelo de LPSC de la médula espinal de ratas.

5. Materiales y métodos

5.1. Síntesis de polímeros

Empleando la técnica de polimerización por plasma, se sintetizaron 3 películas delgadas de material: Polipirrol (PPy), Polipirrol/Yodo (PPy/I) y Polipirrol/Polietilenglicol (PPy/PEG).

Los polímeros fueron sintetizados en un reactor de plasma consistente en un vidrio tubular en una configuración tipo capacitor, de 9cm de diámetro y 20cm de longitud; la distancia entre los electrodos fue de 15cm, aplicándose una señal de radiofrecuencia de 13.5MHz y potencia promedio de 18W; se mantuvo una temperatura constante de 365 K, a una presión promedio de 1.5×10^{-2} Torr con un potencial de 700V y con tiempo efectivo de reacción de 300min. Ver figura 5.1.

En la síntesis del PPy se empleó el monómero de Pirrol en estado líquido (Aldrich, 99%), reaccionando entre sí en la cámara de reacción. En la síntesis del PPy/I se utilizaron cristales de Yodo como dopante (Aldrich, 99.8%), el monómero Pirrol y el Yodo se mezclaron libremente dentro de la cámara de reacción, bajo las condiciones antes mencionadas. Para la obtención de PPy/PEG se empleó Polietilenglicol (Aldrich) en estado líquido como copolímero, éste y el monómero Pirrol se mezclaron libremente dentro de la cámara de reacción.

Todos los materiales fueron introducidos al reactor en su fase de vapor con la ayuda de la bomba de vacío.

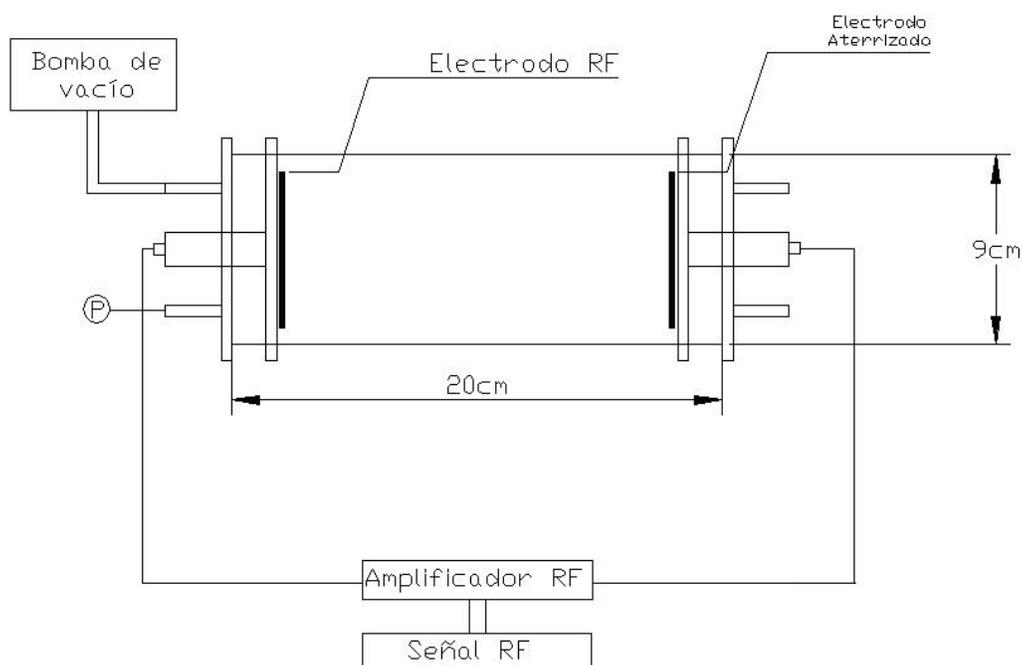


Figura 5.1: Esquema de reactor de plasma (modificado de [85])

5.1.1. Fabricación de los implantes

Una vez sintetizadas las películas, cada uno de los polímeros se desprendió de las paredes de la cámara de reacción con acetona, conservando 1cm² de la película para análisis infrarrojo (IR) y morfológico; el resto del material se pulverizó en un mortero y compactó con una prensa hidráulica a una presión de 9 Ton durante 10 min para crear dos pastillas (Ø1.5cm y 0.1cm de espesor) para la medición de resistencia eléctrica, y elaboración del implante, ajustándolos a la médula espinal de cada animal.

5.1.2. Características del material

Para caracterizar los materiales se realizaron análisis de infrarrojo, medición de conductividad eléctrica con condiciones de humedad y análisis morfológico.

Análisis infrarrojo

El análisis de composición por infrarrojo se realizó a cada una de las muestras con un espectrofotómetro Perkin Elmer 2000, usando 32 exploraciones por muestra.

Conductividad

Se realizó la medición de conductividad en función de la humedad para conocer el transporte de carga en los polímeros semiconductores, se implementó dentro de una cámara sellada de vidrio en la que se hicieron las medidas de resistencia para conocer la conductividad de los polímeros a diferentes condiciones de humedad relativa con el fin de comprender su comportamiento al ser implantados (Figura 5.2.).

Para evaluar la resistividad en función de la humedad relativa, se vertió agua en la cámara y se introdujo un higrómetro de pelo de caballo. La cámara se calentó de manera uniforme hasta el punto de ebullición del agua para que el material absorbiera el máximo de humedad y se hicieron las mediciones a una humedad relativa aproximadamente del 50% y del 100%.

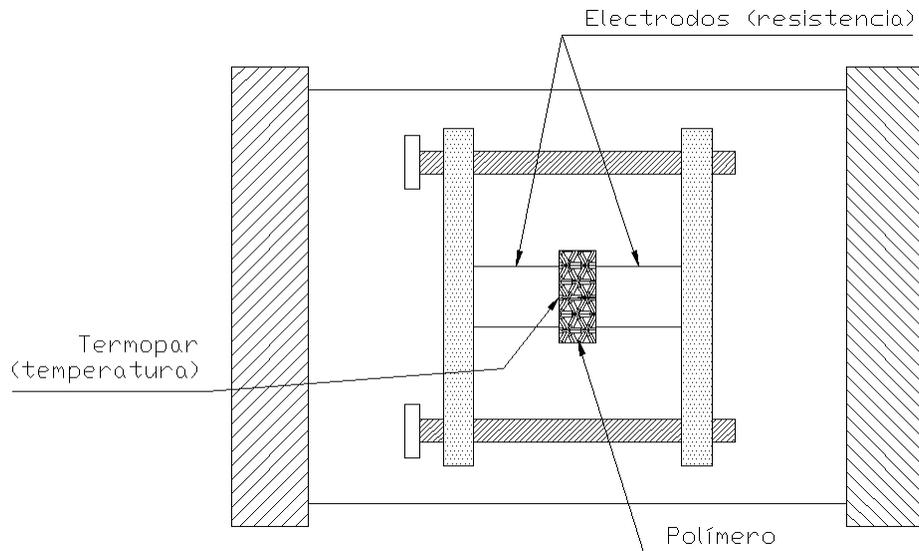


Figura 5.2: Esquema del dispositivo experimental para la medición de conductividad en condiciones de humedad

Análisis morfológico y elemental

Las características morfológicas de los materiales fueron observadas con un microscopio electrónico de escaneo Philips XL-30, para aumentar la magnificación de las imágenes las muestras fueron cubiertas con una fina capa de oro. El microscopio fue acoplado con una sonda de espectroscopia de dispersión de energía (Sapphire EDAX NXL-30), para el análisis elemental.

5.2. Diseño experimental

Se utilizaron 22 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas entre 12–14 semanas de edad con peso corporal de entre 220-260g, a las cuales se les implantaron electrodos intracraneales y se realizó un registro de PES previo a la LPSC, se dividieron aleatoriamente en 4 grupos como sigue:

- ▶ Grupo control: Formado por 6 ratas a las cuales se les practicó una LPSC de la médula espinal a nivel de la 9^a vértebra torácica (T9).
- ▶ Grupo PPy: Formado por 5 ratas a las cuales se les practicó una LPSC de la médula espinal a nivel de T9 y se les implantó una pastilla de PPy.
- ▶ Grupo PPy/I: Formado por 6 ratas a las cuales se les practicó una LPSC de la médula espinal a nivel de T9 y se les implantó una pastilla de PPy/I.
- ▶ Grupo PPy/PEG: Formado por 5 ratas a las cuales se les practicó una LPSC de la médula espinal a nivel de T9 y se les implantó una pastilla de PPy/PEG.

Un día después de la LPSC se realizaron evaluaciones de la calidad de la marcha con la escala BBB y el registro de PES una vez por semana durante ocho semanas. Los animales fueron sacrificados al finalizar el estudio y se tomaron muestras de tejido de la zona de la LPSC y los cerebros para estudios histológicos.

5.3. Técnicas Quirúrgicas

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 (Anexo A).

5.3.1. Implante de electrodos

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (77.5mg/Kg de peso corporal) y Xilacina (12.5mg/Kg de peso corporal). Después de la anestesia se realizó la asepsia de la zona quirúrgica, y los animales fueron montados en un equipo estereotáxico, se les practicó una incisión sagital sobre el cráneo y se separaron los músculos hasta dejar expuesto el cráneo.

Una vez limpia la zona, se raspó y blanqueó el cráneo con Peróxido de Hidrógeno, para evidenciar la localización del punto Bregma; después se practicaron tres trépanos, dos de ellos en las coordenadas: anteroposterior = -1.3mm y lateral = 1.8mm, y otro por delante del punto Bregma que se utilizó como referencia (Figura 5.3)

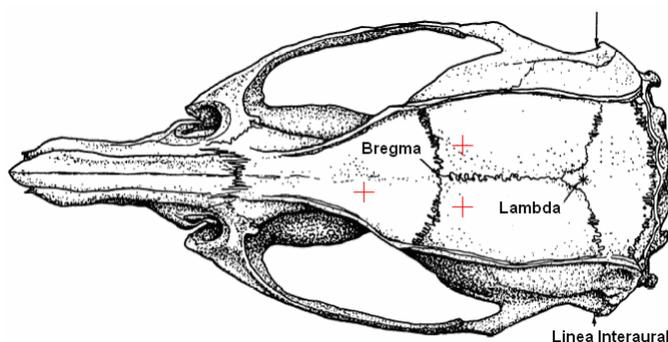


Figura 5.3: Vista dorsal esquemática del cráneo de una rata, localización de los electrodos (cruces en rojo), (modificado de [98]).

Una vez hechos los trépanos, se fijaron los electrodos de aguja, fabricados con alambre de acero inoxidable (Rhodes, 0.1mm), quedando ubicados por encima del límite de las cortezas motora primaria (M1) y somatosensorial de los miembros inferiores (S1HL) en cada uno de los hemisferios cerebrales, como se muestra en la figura 5.4.

Se fijaron al cráneo dos tornillos de acero inoxidable para sujetar el arreglo de electrodos y se soldaron los tres electrodos a una matriz de conectores, se ajustaron con

resina epóxica para mantenerlos alineados y una vez unidos se fijaron de forma sagital al cráneo con acrílico dental (Arias, acrimin autocurable).

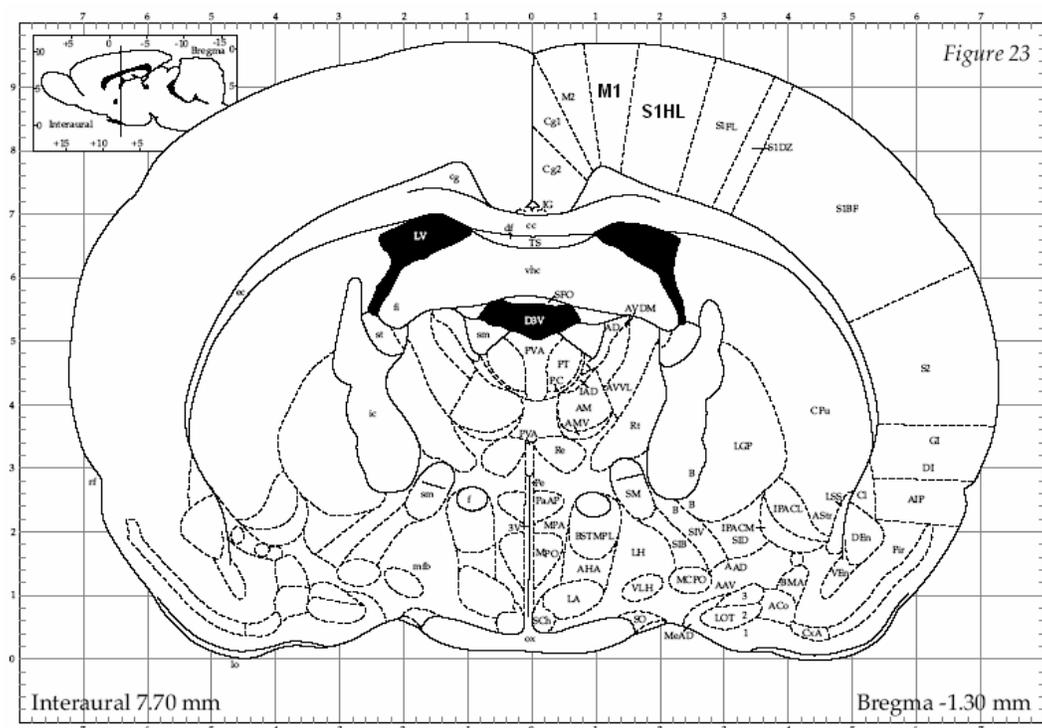


Figura 5.4: Corte coronal esquemático del cerebro de una rata [98] M1: Corteza motora primaria, S1HL: Corteza somato-sensorial de los miembros inferiores.

5.3.2. Lesión por sección completa e implante de polímero

Previa asepsia, los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (77.5mg/Kg de peso corporal) y Xilacina (12.5mg/Kg de peso corporal), en condiciones de asepsia, los animales fueron sometidos a una cirugía en la que se practicó una incisión sagital en la piel seguida de una disección de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas del nivel torácico 8 a 10 (T8, T9 y T10). Se extirpó la apófisis espinosa T9 y T10 y se realizó una laminectomía extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios conservando las meninges. Una vez concluida la laminectomía se procedió con la LPSC de la médula espinal practicando un corte longitudinal en meninges de aproximadamente 5mm de largo, posteriormente un corte transversal completo de la médula espinal para dejar desconectada la parte cefálica de la caudal por debajo del nivel de la lesión, afectando al tren inferior, se verificó con un gancho microquirúrgico que ningún cordón nervioso quedara conectado. [99]

Una vez terminado el proceso de LPSC se introdujo de forma transversal un trozo de pastilla del polímero, según el grupo que correspondiera, de 3mm de diámetro aproximadamente. Posteriormente se suturaron en tres planos meninges, músculo y piel.

Después de la cirugía todos los animales recibieron los cuidados postoperatorios pertinentes, y agua y alimento a libre demanda.

5.4. Registro de potenciales evocados somatosensoriales

Se utilizó un equipo Nicolet Viking IV®. Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (38.75mg/Kg de peso corporal) y Xilacina (6.25mg/Kg de peso corporal) se obtuvieron dos registros contralaterales por hemisferio cerebral en cada sesión.

Para obtener los PES se aplicó un pulso cuadrado de estimulación por corriente, con una frecuencia de 3.1 Hz y un ancho de pulso de 0.2 ms en el nervio tibial posterior detrás del tobillo con electrodos de superficie. La intensidad del estímulo fue ajustada hasta producir un ligero movimiento en los dedos de la pata estimulada en un rango de 3-10 mA. La respuesta fue registrada con los electrodos implantados intracranealmente (Figura 5.5). Se empleó un filtro pasa banda de 20-300 Hz, promediando 100 respuestas con una ventana de análisis de 100 ms. [100-105]

Todos los animales fueron registrados antes de la LPSC de la médula espinal para comprobar la integridad de la médula espinal y la correcta colocación de los electrodos, y al día siguiente del procedimiento para corroborar la ausencia de PES; posteriormente se realizaron registros una vez por semana durante ocho semanas. También se realizaron registros de las extremidades superiores antes de la LPSC, un día después de ésta y una vez al mes de las extremidades superiores, estimulando el nervio mediano de la muñeca y registrando con los mismos parámetros, para comprobar la señal adquirida de los electrodos.

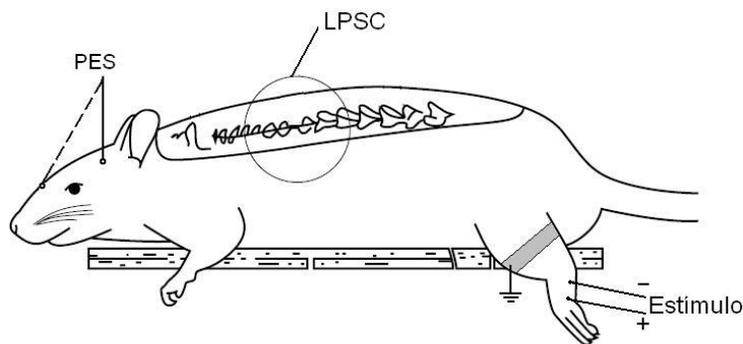


Figura 5.5: Esquema de montaje de PES. Línea sólida: electrodo activo; línea punteada: electrodo referencia.

Una vez obtenidos todos los PES de los animales, se extrajeron los archivos con los datos de los registros del equipo Nicolet Viking IV®, éstos se analizaron con el editor hexadecimal WinHex, se acondicionaron y se transformaron de formato hexadecimal a decimal para ser tratados con el software Matlab 6.5®.

Se tomaron mediciones de amplitud y latencia para las ondas N1 y P1 (ver figura 5.7.A) que fueron medidas para los potenciales previos a la lesión, pero, debido a la dificultad para determinar las características de estas ondas después de la lesión, se

implementó una distribución tiempo-frecuencia (espectrograma) empleando la Transformada de Fourier de Tiempo Corto (STFT) (ecuación 5.1) con una ventana de Hanning de 32 muestras con el fin de resaltar las características de las componentes de la señal. Se midieron los parámetros equivalentes en la representación del tiempo: potencia pico (amplitud) y tiempo pico (latencia). [103, 106-108]

$$STFT(t, \omega) \Big|_{t=n\Delta t, \omega=\frac{2k\pi}{N\Delta t}} = STFT(n, k) = \sum_{i=0}^{N-1} s(i) \omega(i-n) e^{-\frac{j2ki\pi}{N}} \quad \text{ecuación 5.1}$$

Donde $s(t)$ es el PES, $w(n)$ es una secuencia de ventana, Δt intervalo de muestreo, N es la longitud de la señal.

Después se utilizó el cálculo de la Correlación Cruzada Bidimensional Normalizada (CCBN) que es una técnica ampliamente usada para el reconocimiento de patrones en imágenes. [109-111]. Esta técnica permite encontrar réplicas de una subimagen patrón $w(x,y)$ de tamaño $K \times L$ dentro de una imagen $f(x,y)$ de tamaño $M \times N$, mientras que $K \leq M$ y $L \leq N$. (ver figura 5.6)

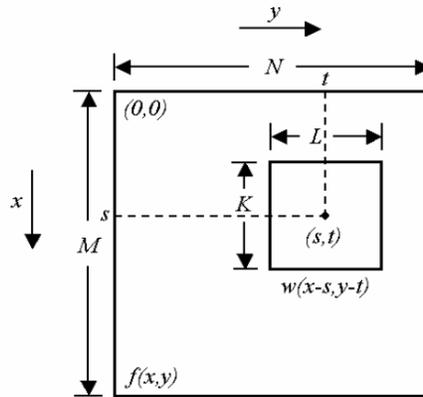


Figura 5.6: Esquema de coordenadas para el cálculo de la correlación entre la imagen original y el patrón

El coeficiente de correlación ρ entre la imagen $f(x,y)$ y el patrón $w(x,y)$ en la coordenada (s,t) se define como la ecuación 5.2.

$$\rho(s,t) = \frac{\sum_{x=0}^{K-1} \sum_{y=0}^{L-1} (f(x,y) - \bar{f}(x,y)) (w(x-s, y-t) - \bar{w})}{\left[\sum_{x=0}^{K-1} \sum_{y=0}^{L-1} (f(x,y) - \bar{f}(x,y))^2 \right]^{1/2} \left[\sum_{x=0}^{K-1} \sum_{y=0}^{L-1} (w(x-s, y-t) - \bar{w})^2 \right]^{1/2}} \quad \text{ecuación 5.2}$$

Donde $s = 0, 1, \dots, M-1$ y $t = 0, 1, \dots, N-1$, \bar{w} es el valor medio de los píxeles del patrón y $\bar{f}(x,y)$ es el valor medio de $f(x,y)$ en la región coincidente. El coeficiente es igual a 1 si el patrón w es igual a la región de análisis de la imagen f , e igual a cero si w no guarda relación alguna. [110]

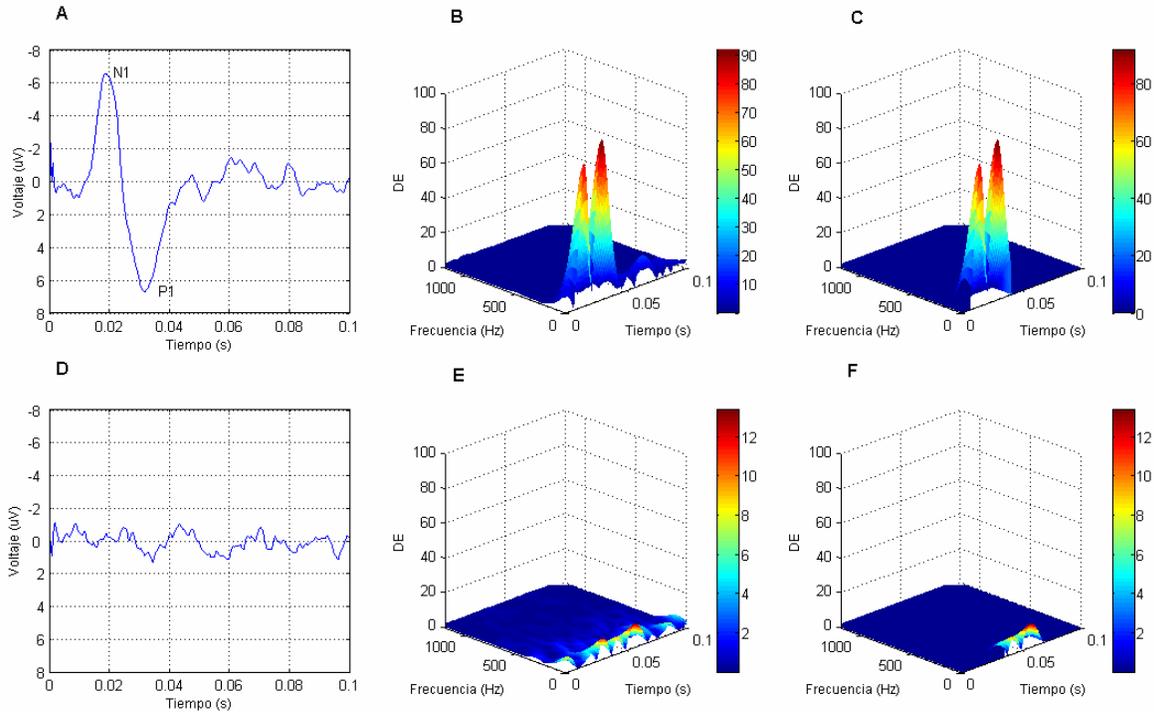


Figura 5.7: Método de detección de PES con representación tiempo-frecuencia utilizando la correlación cruzada bidimensional normalizada. (A) PES previo a la LPSC; (B) Representación tiempo-frecuencia de A; (C) Patrón recortado de B; (D) PES cuatro semanas después de la LPSC; (E) Representación tiempo-frecuencia de D; (F) Potenciales encontrados en E con el patrón C.

Puesto que la técnica de CCBN es capaz de identificar patrones en imágenes y dado que un espectrograma puede considerarse una imagen, se empleó ésta técnica para determinar las características de la señal en los registros posteriores a la LPSC (amplitud y latencia), tomando como patrón en cada caso el registro previo a la LPSC de cada rata (comprendiendo las ondas N1 y P1) y considerando los siguientes criterios:

1. Se tomaron en consideración las áreas reconocidas con coeficiente $\rho \geq 0.8$
2. Si no se localizaba una zona con coeficiente $\rho \geq 0.8$ se realizaba una inspección visual de los espectros para determinar la localización de las ondas, descartando las regiones de frecuencias superiores a 300Hz y/o menores a la latencia medida en los registros previos a la LPSC, ponderando después los picos de intensidades más altas del espectro.

5.5. Evaluación funcional

La evaluación funcional se realizó por medio de la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan), la cual evalúa la marcha con base a las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo a través de 22 grados de recuperación motora; donde el grado 0 representa la ausencia de movimiento y el grado 21 una marcha normal (Anexo B).

Los animales fueron evaluados al siguiente día de la LPSC y posteriormente se realizó una vez por semana durante dos meses, siendo el tiempo en el cual los eventos debidos a la lesión permiten observar el efecto del tratamiento. Las evaluaciones se realizaron cegadas al tratamiento.

5.6. Estudio histológico

Tras concluir el tiempo de estudio, todos los cerebros y médulas fueron analizados histológicamente, para ello, previa anestesia vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (77.5mg/Kg de peso corporal) y Xilacina (12.5mg/Kg de peso corporal) los animales fueron sometidos a una toracotomía, a continuación, mediante una punción en el vértice cardiaco se procedió a la perfusión vía intracardiaca con 200ml de solución salina más 500 u.i. de heparina, seguido sin interrupción de 400ml de formaldehído. Ambas soluciones a una velocidad de 30ml/min. Al término de esto se extrajo un segmento de 1.5cm de la médula espinal a partir del epicentro de la lesión y el cerebro, ambos se colocaron en un frasco con el mismo fijador.

El tejido de la médula espinal fue deshidratado en alcoholes graduales y se aclaró con xileno y se incluyó en moldes de parafina. Se realizaron cortes longitudinales secuenciales a partir del canal ependimario (10 μ m de espesor) con un microtomo, en un intervalo de 10 cortes obteniéndose 4 muestras. Los cortes se pasaron a un baño de flotación y se colocaron en laminillas para ser tratados con el procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris. (Anexo C).

El cerebro fue congelado con nitrógeno, con un microtomo se realizaron cortes coronales de 10 μ m a partir de la huella dejada por los electrodos en la corteza, obteniendo 3 cortes, después se colocaron en laminillas para ser teñidos por la técnica de Cresilo de Vogt (Anexo D), una vez obtenidas las laminillas se observaron las estructuras anatómicas en los cortes y se compararon con un mapa de las estructuras anatómicas de la rata [98], para confirmar que los electrodos estaban en el sitio planeado.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un sistema equipado el software de IM1000, una cámara digital 300 FX, dos microscopios Leica MZ6 y DM E.

5.7. Estadística

A todos los datos se les realizó una prueba de estadística descriptiva, así como, la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para determinar si se utilizaba una estadística paramétrica o no paramétrica. Posteriormente, para analizar los valores de las pruebas motoras evaluadas con la escala BBB y las sensitivas con PES se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett y para analizar la cantidad de tejido preservado se utilizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett, utilizando el software SPSS 15.0.

6. Resultados

6.1. Síntesis de Polímeros

Análisis Infrarrojo

La Figura 6.1 A contiene los espectros IR de transmitancia para todos los polímeros. El espectro incluye los picos característicos del pirrol sintetizado por plasma. Los espectros se componen principalmente de tres bandas de absorción. La primera de ellas se encuentra entre $2400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ y puede estar asociada con los enlaces C-H, N-H y O-H de los polímeros en diferentes configuraciones. Esta región es más amplia en el PPy/I debido a que los enlaces O-H en este polímero se originan al final con la oxidación atmosférica. Por otra parte, el PPy/PEG tiene dos fuentes de enlace O-H, la proporcionada por la estructura del Etilenglicol y la suministrada por la oxidación atmosférica. En esta banda se destacan las vibraciones de las aminas primarias (C-NH₂) provenientes de la estructura del Pirrol alrededor de 3338 cm^{-1} para el PPy y PPy/PEG (Figura 6.1 B y C) y 3167 cm^{-1} para enlaces aromáticos en el PPy/I (Figura 6.1 C) y la absorción centrada en 2920 cm^{-1} puede ser asignada a la saturación de cadenas alifáticas C-H, esta absorción sugiere la presencia de fragmentos de Pirrol incluidos en macromoléculas.

Las vibraciones alrededor de 2200 cm^{-1} corresponden a los grupos de nitrilo, C≡N, sugiriendo también la fragmentación de algunos anillos del monómero y la nitración parcial de estos fragmentos. El nitrógeno que participa en este proceso proviene de las moléculas de Pirrol y de la interacción atmosférica. Esta absorción es más intensa en PPy/I (Figura 6.1 C) y disminuida en el PPy/PEG (Figura 6.1 D).

La segunda banda de absorción se encuentra entre $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. Se puede encontrar la presencia de grupos C-N, C=C y C=O entre $1600\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$. Los picos alrededor de 1610 cm^{-1} pertenecen al grupo de aminas primarias, secundarias y terciarias. En el PPy/PEG, el pico principal en esta banda es a causa de la influencia del oxígeno en las moléculas de PEG. Sin embargo, en el PPy/I, esta banda está más cerca de 1600 cm^{-1} , donde predominan las aminas de las moléculas heterocíclicas.

La tercer banda de absorción se localiza entre $400\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, está asociada con las sustituciones en anillos del Pirrol, con el crecimiento de los polímeros, con ramificación parcial y entrecruzamiento de las cadenas, relacionado con la anchura del pico. Este complejo de absorción indica la creación de redes.

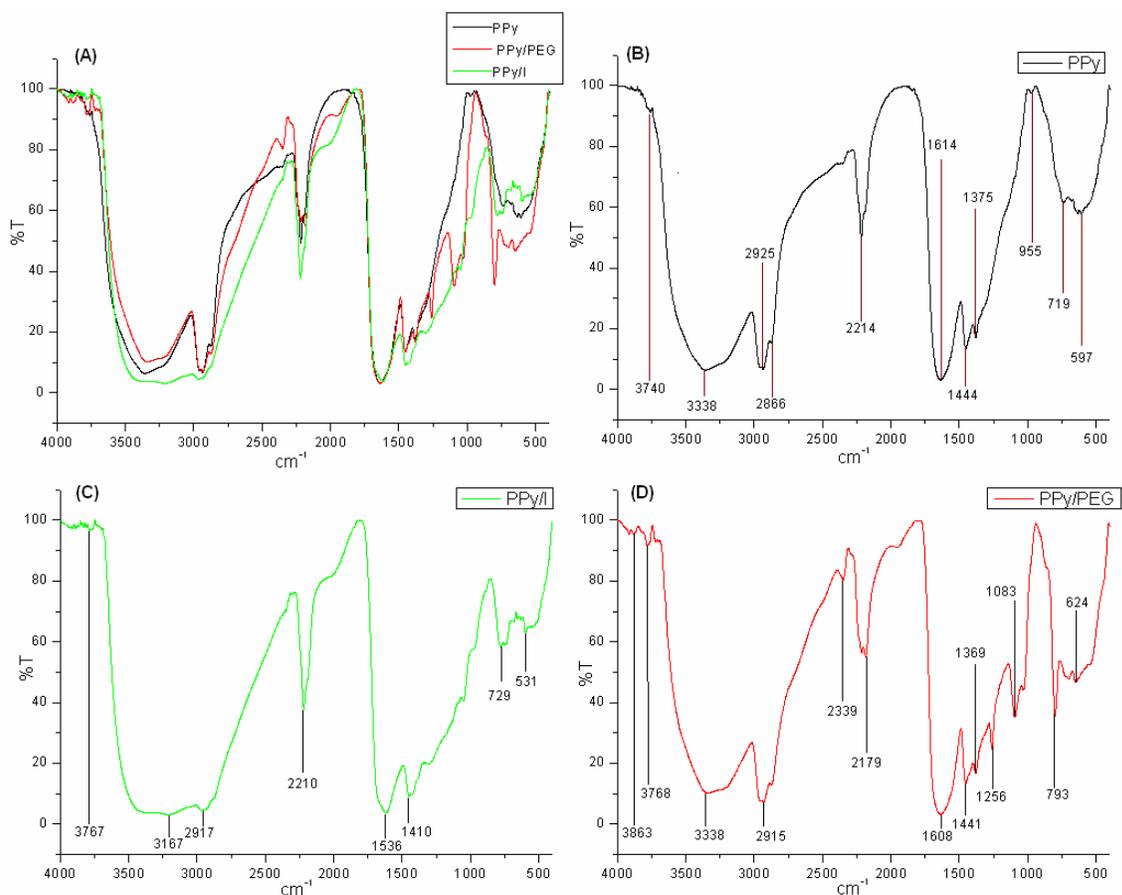


Figura 6.1: Espectro de transmitancia IR de los materiales. (A) Todos los materiales; (B) Transmitancia IR PPy; (C) Transmitancia IR PPy/I; (D) Transmitancia IR PPy/PEG.

Conductividad

El polímero PPy a temperatura ambiente y a 50% de humedad relativa (HR) presentó una resistencia de 390M Ω , resistividad de 35G Ω cm y conductividad de 28.57pS/cm. A HR del 90% presentó una resistencia de 16M Ω , resistividad de 1.43G Ω cm y conductividad de 696pS/cm.

El polímero PPy/I a temperatura ambiente y al 40% de HR mostró una resistencia de 2.46M Ω , resistividad de 243.36M Ω cm y conductividad de 4.1nS/cm. Al aumentar la HR al 88% el material presentó una resistencia de 8.5K Ω , resistividad de 840.88K Ω cm y conductividad de 1.189 μ S/cm.

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

Tabla 6.1: Características eléctricas de los Polímeros en condiciones de humedad

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

Análisis morfológico y elemental

La morfología se realizó con un microscopio electrónico de barrido marca Philips XL30. Los polímeros fueron sintetizados por capas delgadas consecutivas, muy posiblemente debido a pequeñas variaciones en las condiciones termodinámicas del sistema, fundamentalmente por variaciones en la presión. Por tal motivo, los espesores de las capas son diferentes y no siguen una tendencia definida.

La figura 6.2.1A muestra el perfil de PPy que está formado por dos capas sólidas, una de aproximadamente 3.7 μm y la otra de 1.1 μm. Ambas están separadas y presentan superficie rugosa con formación de gránulos y líneas distribuidos en forma heterogénea en el material, como se puede ver en la figura 6.2.1B.

El perfil de PPy/I se presenta en la figura 6.2.2A donde se aprecian dos capas delgadas y compactas de aproximadamente 1.5 μm de espesor. La superficie del polímero es rugosa con pliegues que a una ampliación mayor se ven como bordes sin orden como en la figura 6.2.2B. En esta figura El PPy/I tiene predominantemente la morfología del PPy.

El copolímero PPy/PEG presenta una morfología diferente a la de los polímeros anteriores, ver figura 6.2.3A. La parte superior de una capa está formada por una gran cantidad de pequeños grumos. El espesor de las capas está aproximadamente entre 1.2 y 1.5 μm. Es posible que la parte grumosa sea originada por la presencia del PEG y la parte compacta por el PPy. Esto se puede apreciar también en la Figura 6.2 3B.

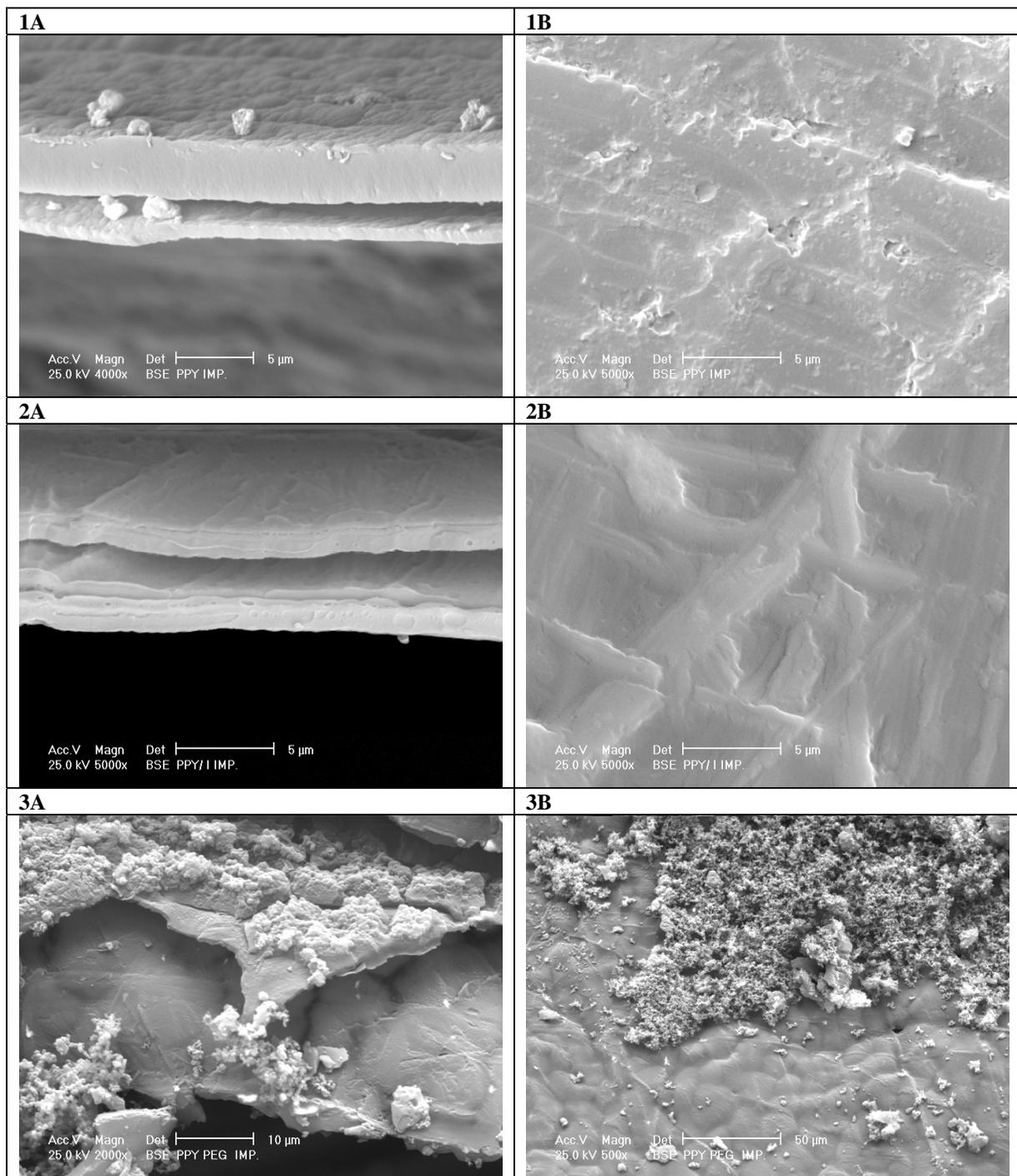


Figura 6.2: Microfotografías representativas de los polímeros. (1) PPy (A: 4000X, B: 5000X); (2) PPy/I (A: 5000X, B: 5000X); (3) PPy/PEG (A: 2000X, B: 500X)

Para el análisis elemental se observaron el Carbono, Nitrógeno, Oxígeno y Yodo. El Carbono y Nitrógeno forman parte de la estructura de los monómeros utilizados (Pirrol y Etilenglicol). El Oxígeno por otra parte, sólo está presente en el Etilenglicol. El Yodo sólo fue utilizado como dopante para el PPy/I.

La tabla 6.2 muestra el porcentaje en peso de cada elemento analizado que constituye el material. La proporción de oxígeno en el PPy/PEG se origina por dos fuentes, la estructura del monómero y la oxidación proveniente de la reacción de radicales libres en el polímero con el oxígeno atmosférico. La fracción de yodo en PPy/I es casi la mitad del peso total del polímero. Algunos de los átomos podrían estar químicamente relacionados con el polímero y otros entre las cadenas sin estar vinculados a un sitio específico en la estructura.

Tabla 6.2: Análisis elemental de los polímeros (expresados en porcentaje de peso)

Elemento	PPy	PPy/I	PPy/PEG
Carbono	57.50	37.60	60.14
Nitrógeno	26.82	11.97	28.53
Oxígeno	15.68	6.77	11.33
Yodo	0	43.66	0
Total	100	100	100

6.2. Registro de Potenciales Evocados Somatosensoriales

Después de las ocho semanas de estudio, se obtuvieron los cortes histológicos de los cerebros de las ratas y se corroboró que estuvieran localizados en el sitio correcto (entre la corteza somatosensorial de las extremidades inferiores y la corteza motora). Cuando los electrodos no estaban correctamente colocados los animales fueron excluidos del estudio.

En la figura 6.3 se muestra un corte coronal representativo, donde se aprecian las huellas dejadas por los electrodos (flechas), la corteza somatosensorial de las extremidades inferiores (ovalado negro) y la corteza motora (ovalado rojo).

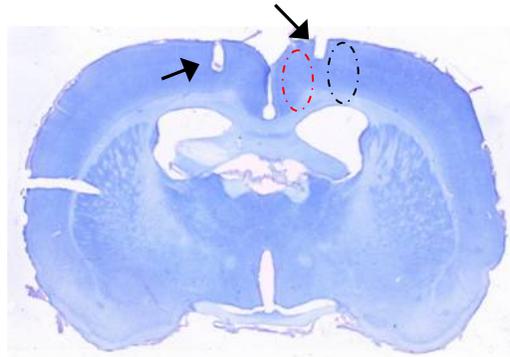


Figura 6.3: Corte coronal histológico de la zona de implante de electrodos. Las flechas señalan las huellas dejadas por los electrodos, línea punteada roja: corteza motora, línea punteada negra: corteza somatosensorial de las extremidades inferiores. Amplificación 1X.

Se registraron PES estimulando las extremidades superiores (el nervio mediano de la muñeca) con los parámetros descritos en la sección 5.4 para comprobar la integridad de los electrodos durante el estudio. En la figura 6.4 se muestran PES representativos obtenidos de un animal, para los cuales se midieron los parámetros de amplitud y latencia en el dominio del tiempo para las ondas mostradas (I y II).

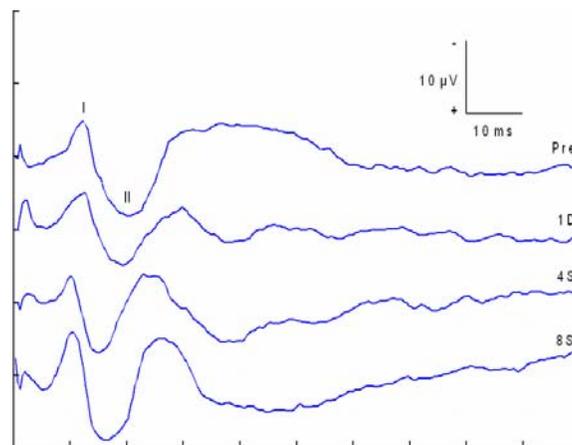


Figura 6.4: Potenciales evocados somatosensoriales representativos estimulado las extremidades superiores. Pre: Previo a la LPSC, 1D: un día después LPSC, 4S: cuatro semanas después LPSC, 8S: ocho semanas después

Los PES con estímulo de las extremidades superiores no mostraron diferencias estadísticas significativas (ANOVA de medidas repetidas) en ninguno de los parámetros (amplitud y latencia).

Al término del estudio se realizaron las mediciones de amplitud y latencia de los potenciales N1 y P1. En la figura 6.5 se muestran registros previos a la lesión, un día después de la lesión y una vez por semana durante los dos meses de estudio, estimulando las extremidades inferiores. En esta misma figura se observa que en condiciones normales los picos de las ondas N1 y P1 aparecen aproximadamente entre 22-34 ms con una amplitud de 4.6 μV y 5.6 μV respectivamente, pero después de la LPSC la señal decrece demasiado en amplitud, y se dificulta la determinación de los parámetros de amplitud y latencia en el dominio del tiempo.

La tabla 6.2 muestra los datos como: media (\pm desviación estándar), para las ondas N1 y P1 previo a la LPSC de los registros con estimulación en las extremidades inferiores.

Tabla 6.2: Medición de PES previo a LPSC (media (desviación estándar))

	Amplitud	Latencia
N1	4.59 μV (\pm 1.83)	22.13ms(\pm 4.71)
P1	5.59 μV (\pm 2.08)	34.15ms(\pm 4.56)

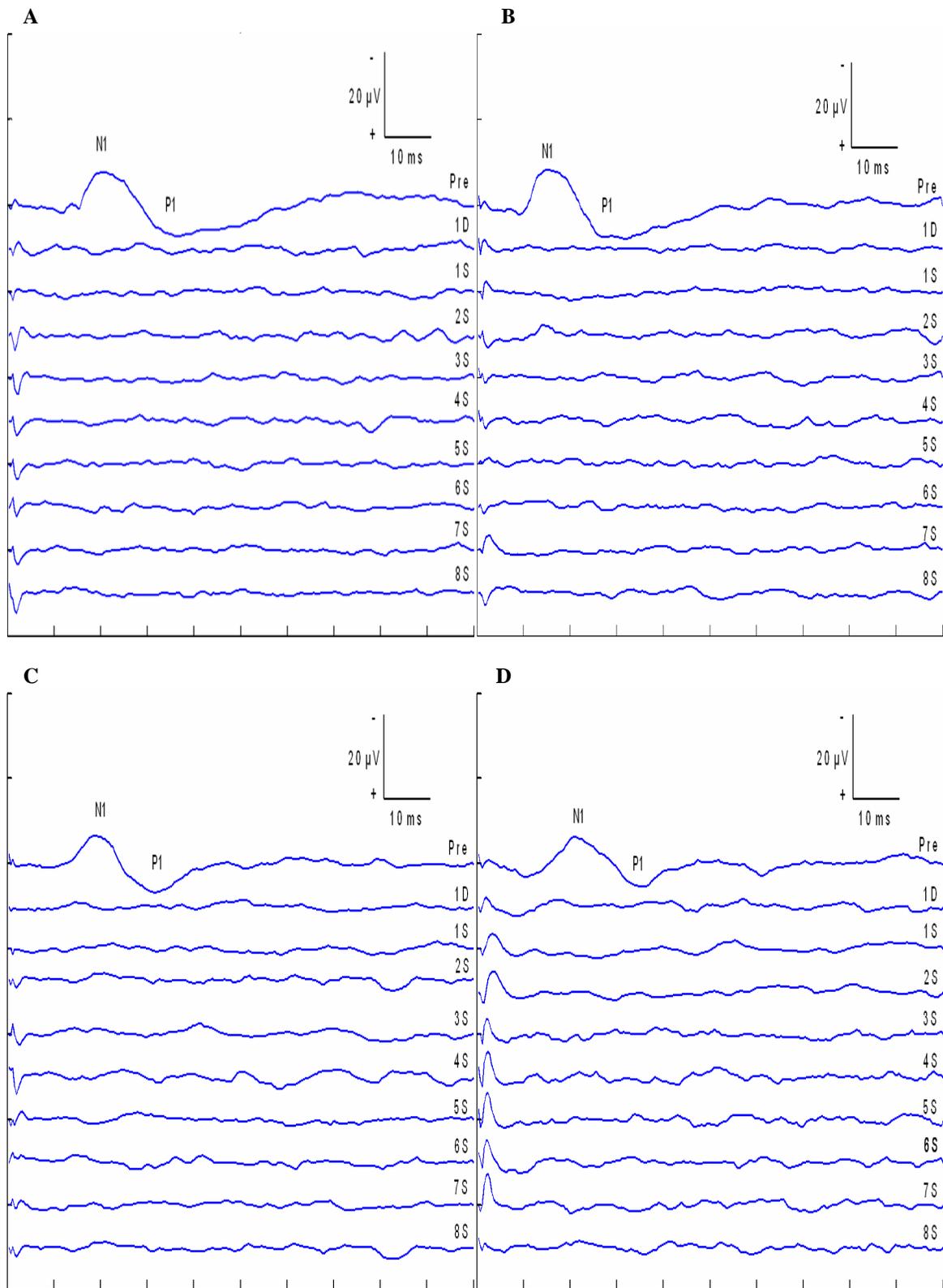
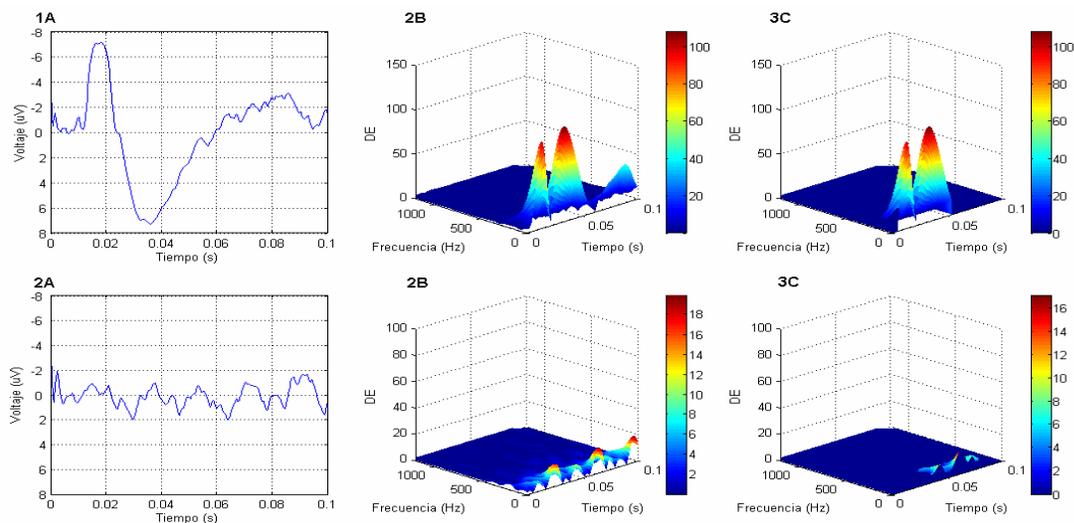


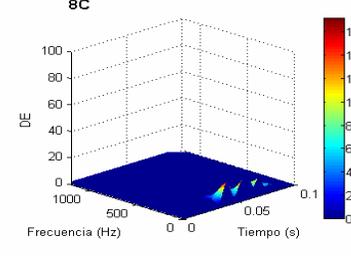
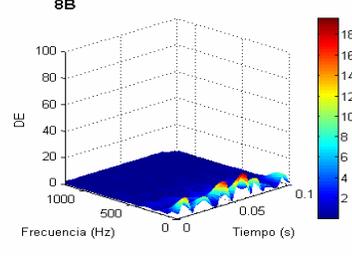
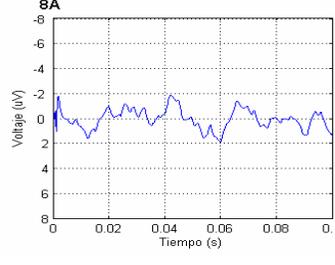
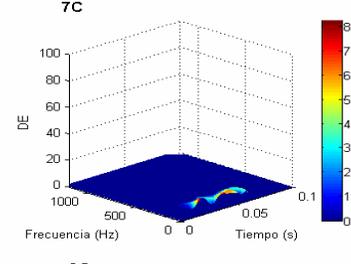
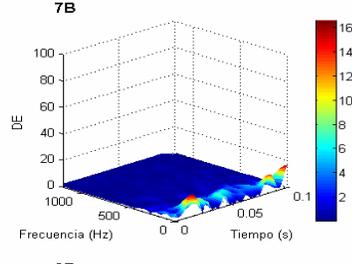
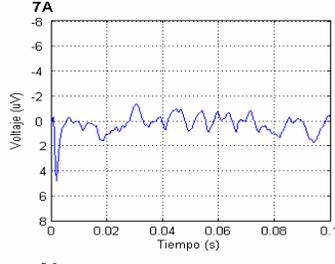
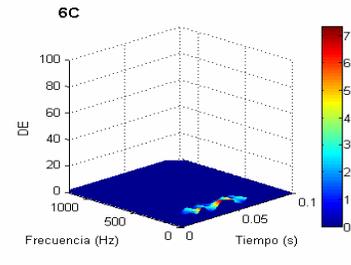
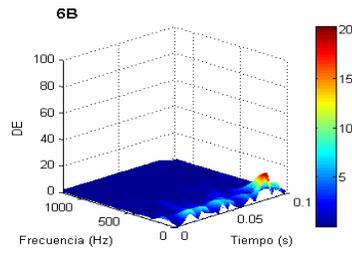
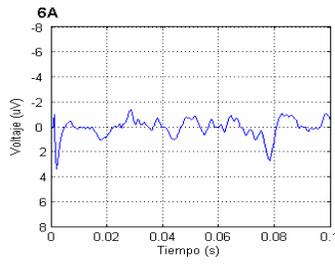
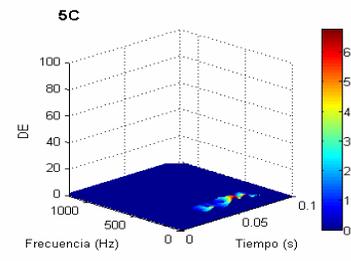
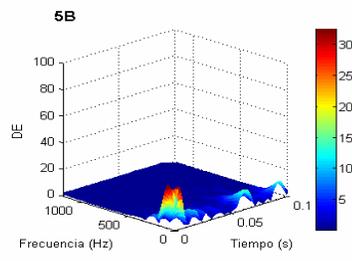
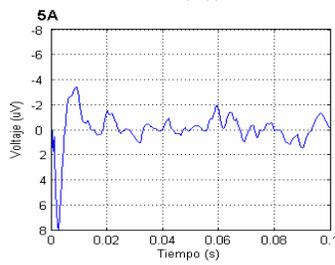
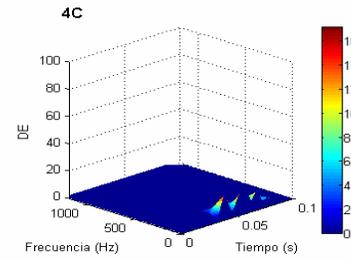
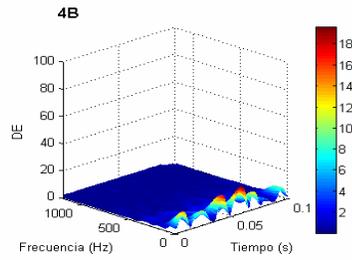
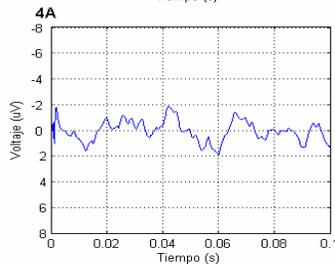
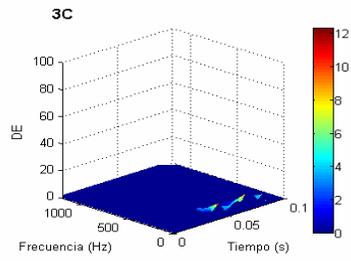
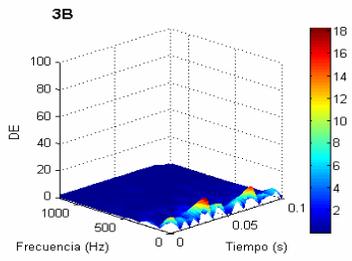
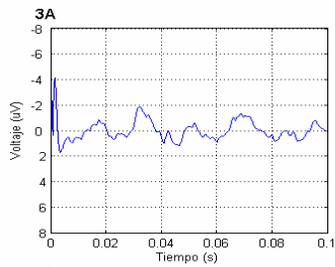
Figura 6.5: Potenciales evocados representativos de cada grupo durante el estudio. (A) Control; (B) PPy; (C) PPy/I; (D) PPy/PEG. Pre: Previo LPSC, 1D: 24 horas después de LPSC, 1S: una semana después, 2S: dos semanas después, 3S: tres semanas después, 4S: semanas después, 5S: cinco semanas después, 6S: seis semanas después, 7S: siete semanas después, 8S: ocho semanas después

Se obtuvieron los espectrogramas de todos los PES registrados y se midieron los parámetros equivalentes en el dominio de la frecuencia, potencia pico (amplitud) y latencia (tiempo pico), tomando como plantilla el espectro de las ondas N1 y P1 en el espectrograma del registro previo a la LPSC para cada rata y aplicando la CCBN, las mediciones se tomaron a partir de los picos más altos del segmento encontrado con los criterios planteados en la sección 5.4.

Las siguientes figuras (6.6, 6.7, 6.8 y 6.9) muestran ejemplos del análisis tiempo-frecuencia (espectrograma) utilizando la CCBN durante las etapas del estudio (organizados por filas 1-10). La distribución tiempo-frecuencia de los PES (columna central en estas figuras, B) se presenta como una malla bidimensional con el tiempo en el eje x , la frecuencia en el eje y , y la intensidad en escala de color relativo (barra a la derecha del espectrograma). En la columna izquierda de las figuras se muestran los PES en el dominio del tiempo, mientras que en la columna derecha se presenta el patrón de los picos a localizar después de la lesión (sub-figuras 3C) y debajo de ésta el patrón correspondiente de los picos localizados en el espectrograma para cada caso.

En los espectrogramas se destacan dos picos correspondientes a las ondas N1 y P1 en el dominio del tiempo, que se vieron alterados después de la lesión. Los picos decrecen en amplitud y se dispersa la energía en el espectro; se observa que en condiciones normales, es decir, previo a la sección completa, los picos se encontraban alrededor de 16.04ms(3.55) después de la estimulación y con una potencia pico de 76.24(24.38) para la onda N1, mientras que para la onda P1 los parámetros del tiempo pico fueron de 32.69ms(4.39) y 78.41 (32.43) en la potencia pico. Los picos en la representación tiempo-frecuencia son más fáciles de identificar que a partir de la forma de onda en el dominio del tiempo. Sin embargo, localizar el punto central de los picos es más difícil debido a la limitación de la resolución en el tiempo, en la representación tiempo-frecuencia.





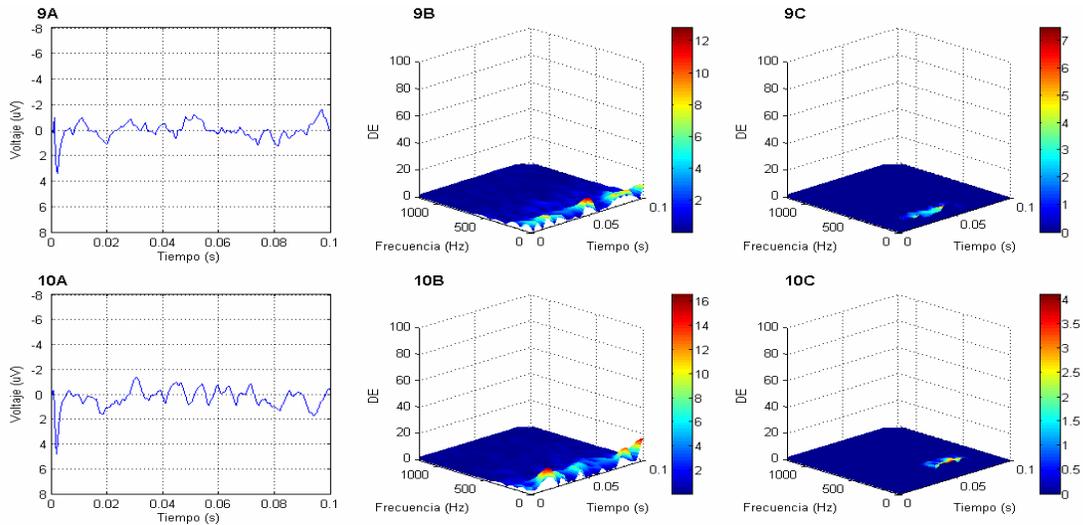
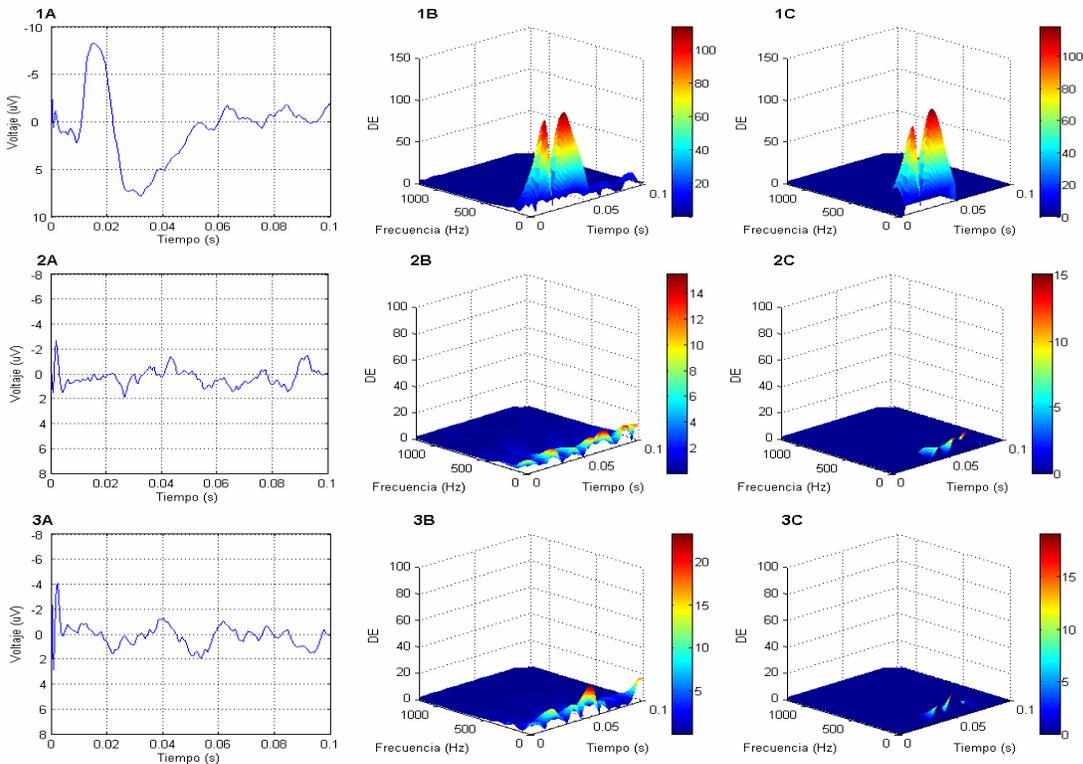
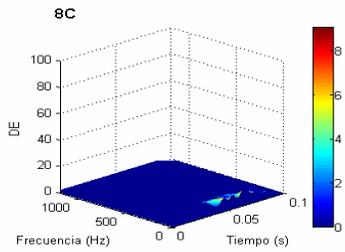
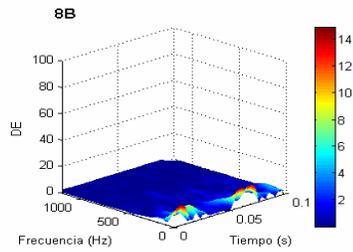
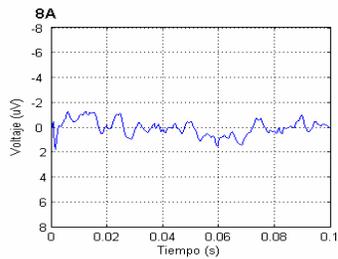
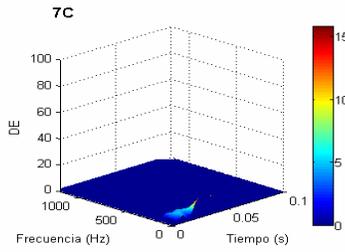
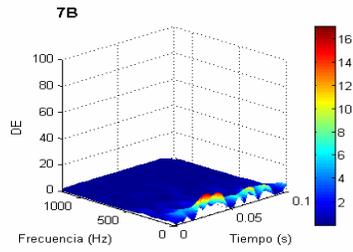
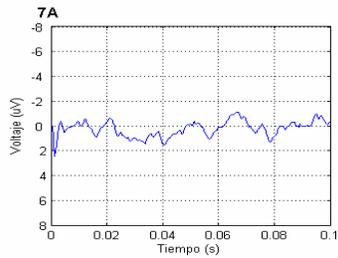
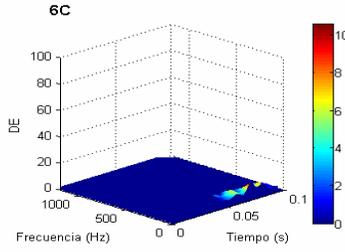
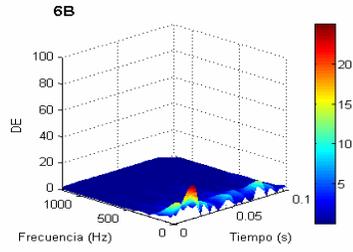
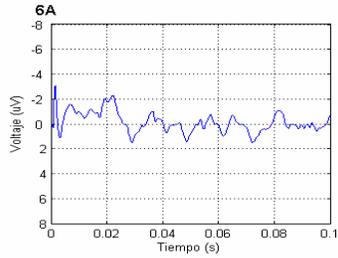
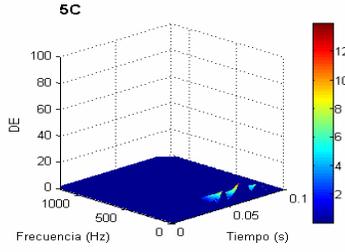
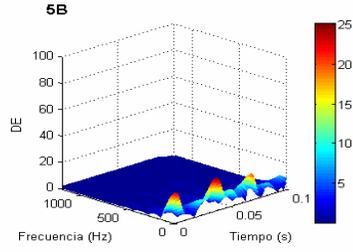
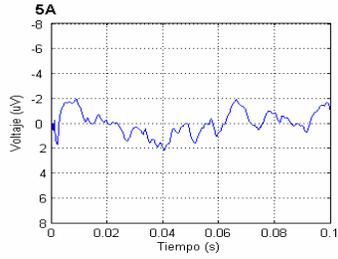
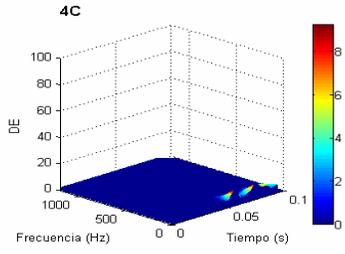
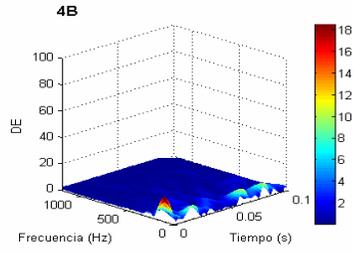
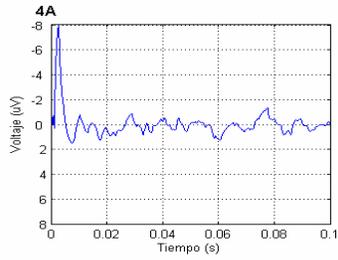


Figura 6.6: Detección de los potenciales evocados somatosensoriales utilizando la correlación cruzada bidimensional normalizada de los espectrogramas de un animal representativo del grupo control. (A) PES (representación en el dominio del tiempo); (B) Espectrograma (representación tiempo-frecuencia) de A; (C) Potenciales encontrados. (1) Previo a LPSC; (2) un día después LPSC; (3) una semana después LPSC; (4) dos semanas después LPSC; (5) tres semanas después LPSC; (6) cuatro semanas después LPSC; (7) cinco semanas después LPSC; (8) seis semanas después LPSC; (9) siete semanas después LPSC; (10) ocho semanas después LPSC.





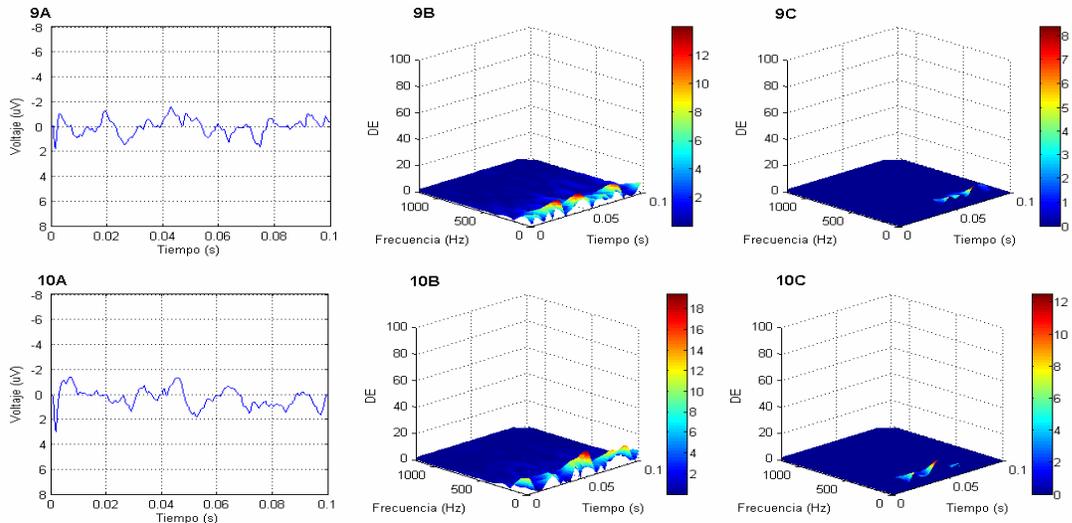
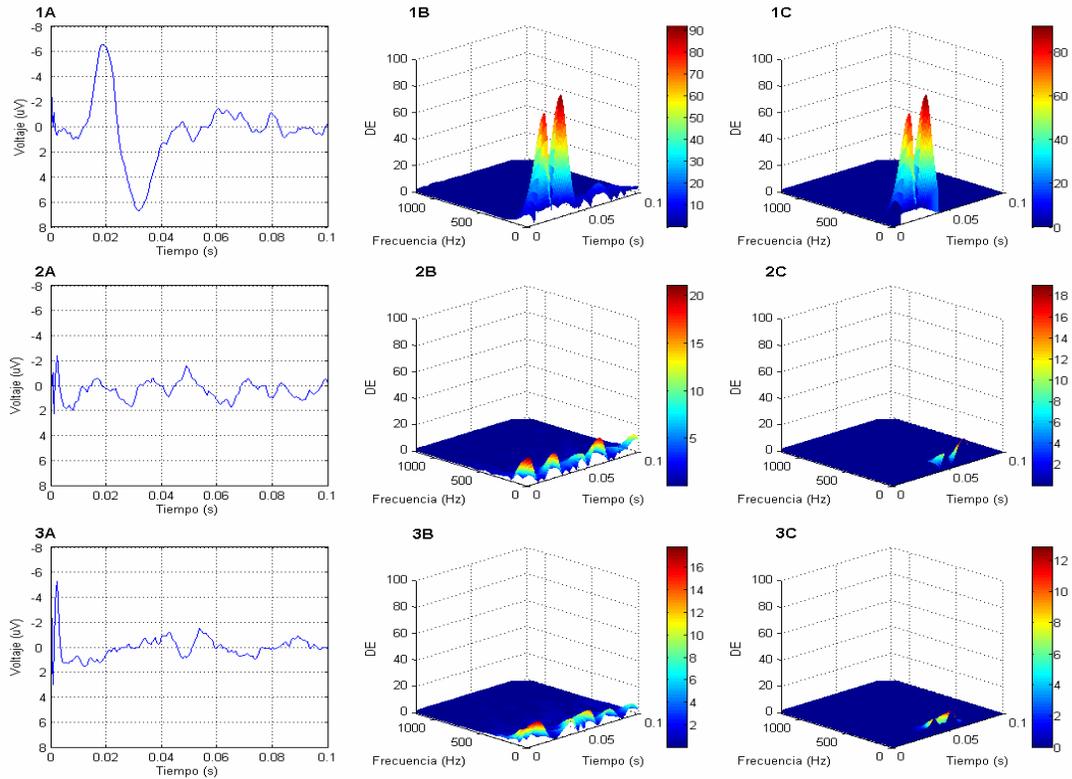
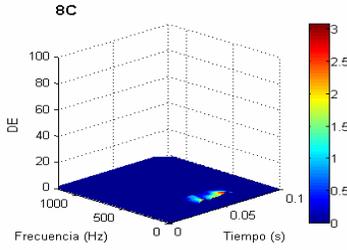
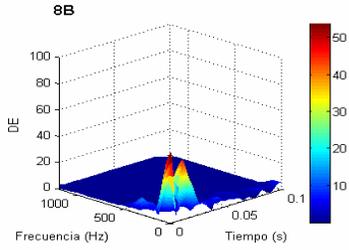
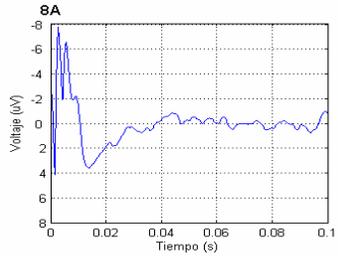
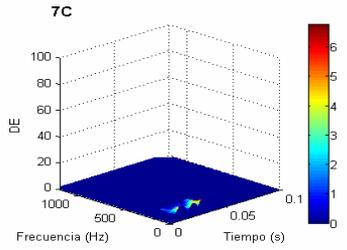
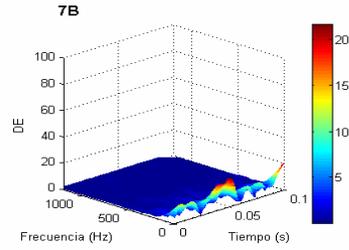
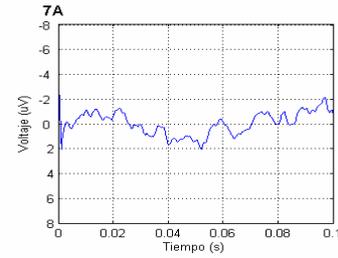
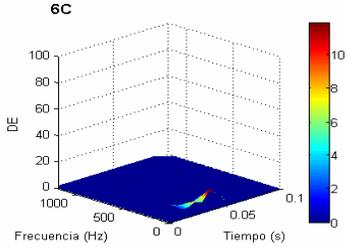
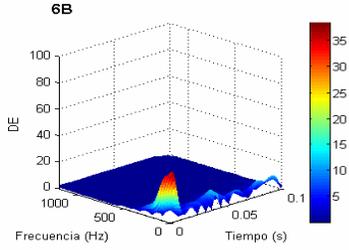
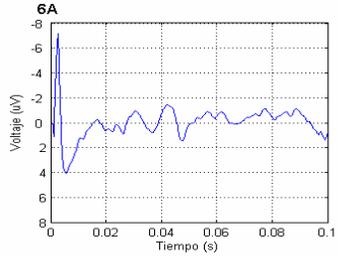
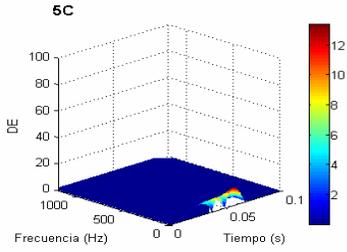
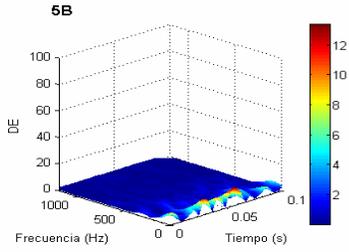
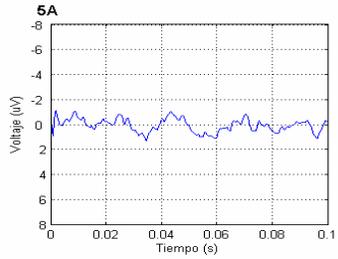
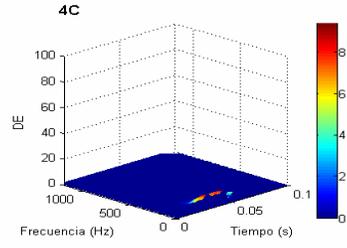
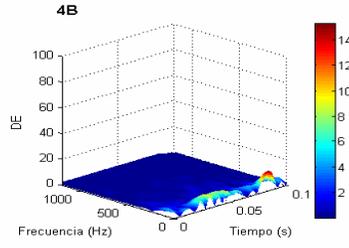
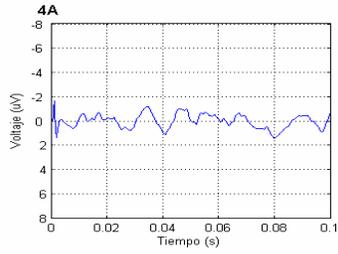


Figura 6.7: Detección de los potenciales evocados somatosensoriales utilizando la correlación cruzada bidimensional normalizada de los espectrogramas de un animal representativo del grupo PPy. (A) PES (representación en el dominio del tiempo); (B) Espectrograma (representación tiempo-frecuencia) de A; (C) Potenciales encontrados. (1) Previo a LPSC; (2) un día después LPSC; (3) una semana después LPSC; (4) dos semanas después LPSC; (5) tres semanas después LPSC; (6) cuatro semanas después LPSC; (7) cinco semanas después LPSC; (8) seis semanas después LPSC; (9) siete semanas después LPSC; (10) ocho semanas después LPSC.





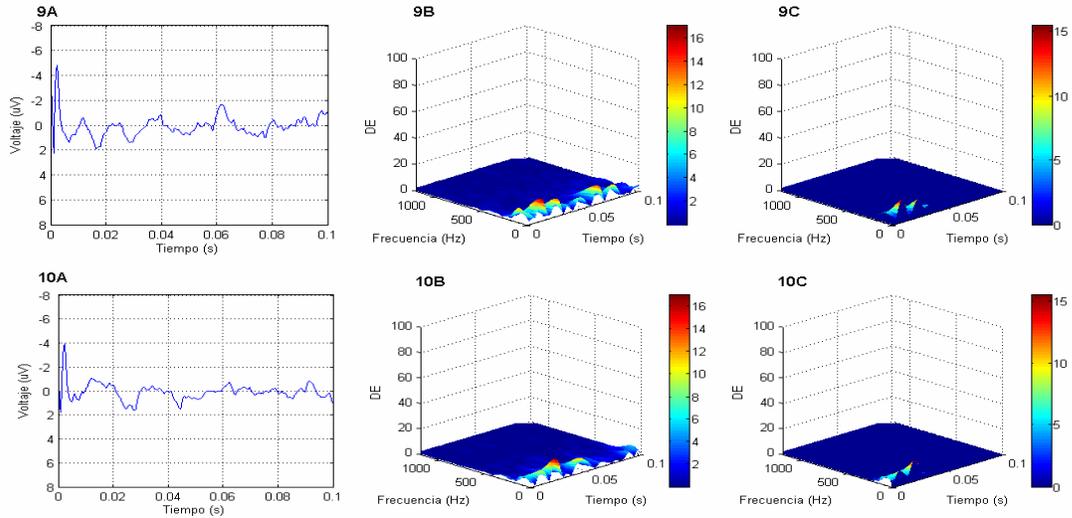
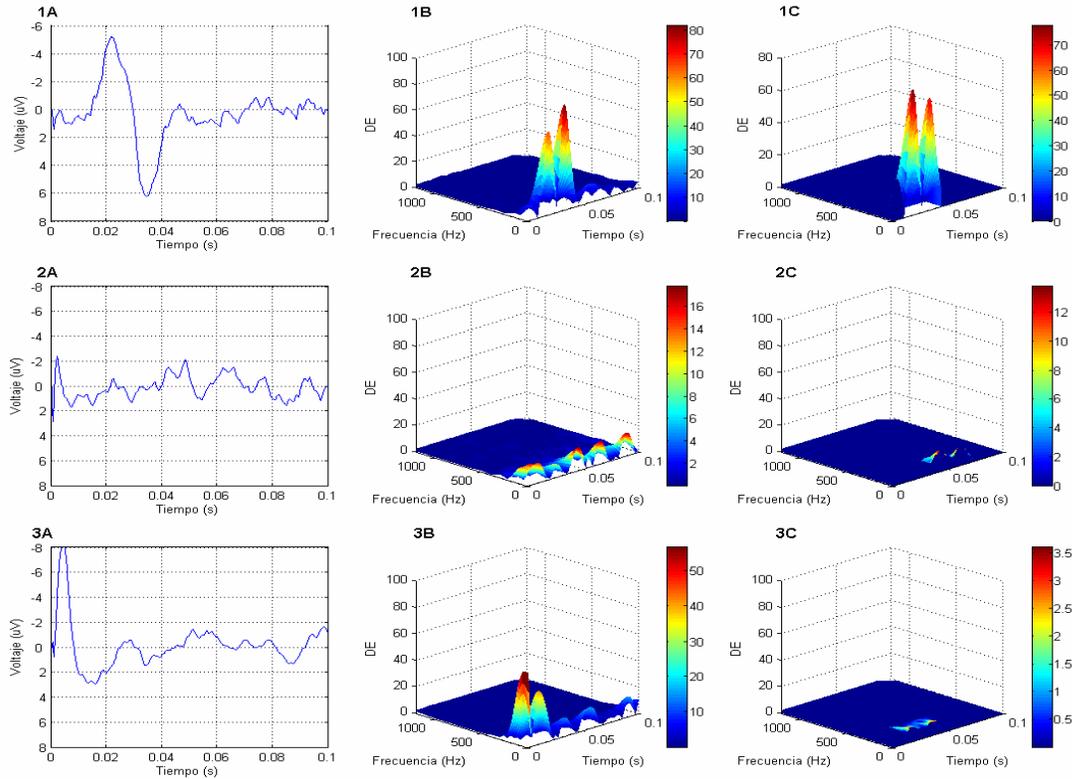
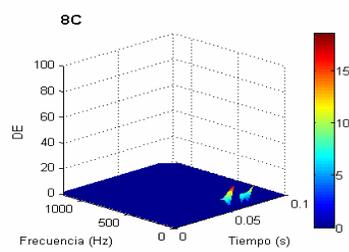
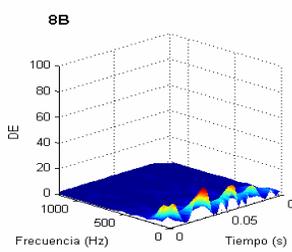
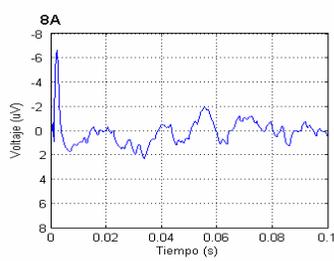
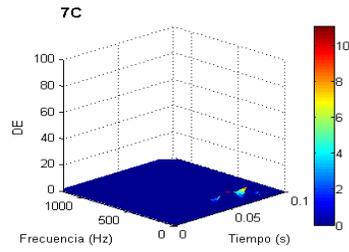
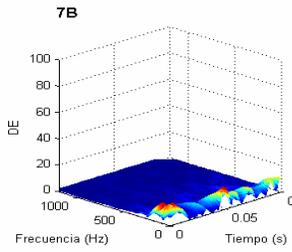
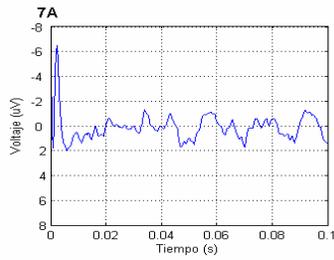
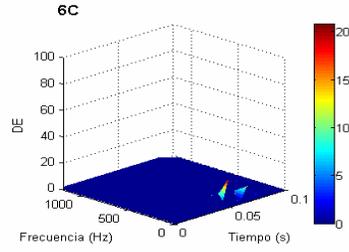
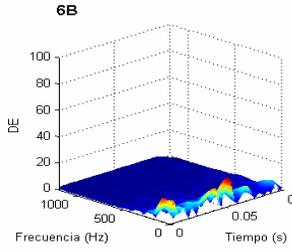
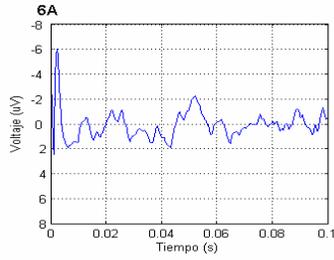
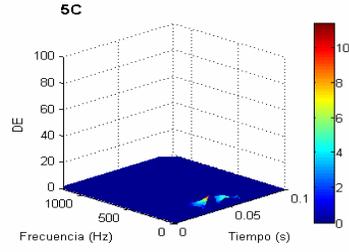
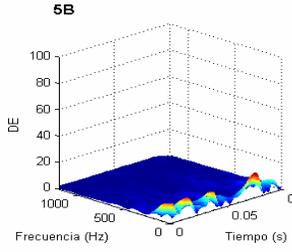
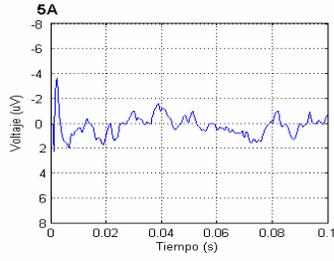
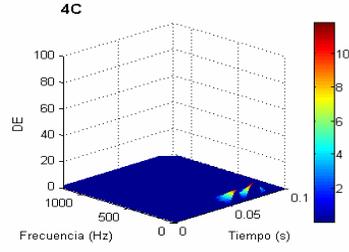
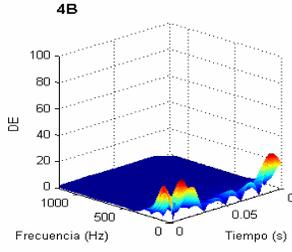
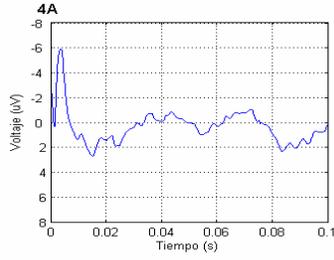


Figura 6.8: Detección de los potenciales evocados somatosensoriales utilizando la correlación cruzada bidimensional normalizada de los espectrogramas de un animal representativo del grupo PPy/I. (A) PES (representación en el dominio del tiempo); (B) Espectrograma (representación tiempo-frecuencia) de A; (C) Potenciales encontrados. (1) Previo a LPSC; (2) un día después LPSC; (3) una semana después LPSC; (4) dos semanas después LPSC; (5) tres semanas después LPSC; (6) cuatro semanas después LPSC; (7) cinco semanas después LPSC; (8) seis semanas después LPSC; (9) siete semanas después LPSC; (10) ocho semanas después LPSC.





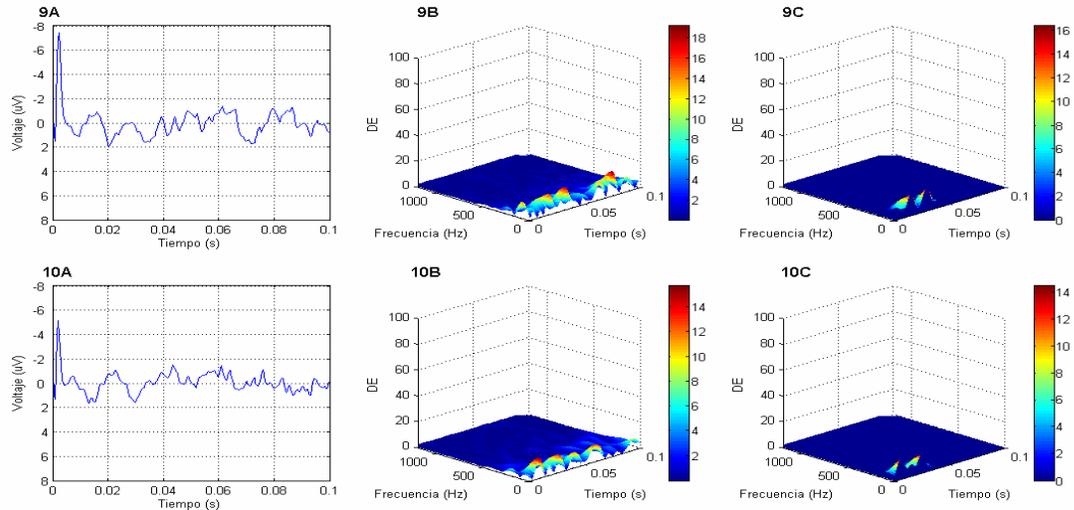


Figura 6.9: Detección de los potenciales evocados somatosensoriales utilizando la correlación cruzada bidimensional normalizada de los espectrogramas de un animal representativo del grupo PPy/PEG. (A) PES (representación en el dominio del tiempo); (B) Espectrograma (representación tiempo-frecuencia) de A; (C) Potenciales encontrados. (1) Previo a LPSC; (2) un día después LPSC; (3) una semana después LPSC; (4) dos semanas después LPSC; (5) tres semanas después LPSC; (6) cuatro semanas después LPSC; (7) cinco semanas después LPSC; (8) seis semanas después LPSC; (9) siete semanas después LPSC; (10) ocho semanas después LPSC.

Una vez obtenidas las mediciones de potencia pico (amplitud) y tiempo pico (latencia) para las ondas N1 y P1, mediante diagramas de cajas se identificaron los valores atípicos y extremos, se desestimaron los valores extremos encontrados en algunos casos y se tomó la media de los valores restantes debido a posibles identificaciones erróneas de los picos, se expresaron los datos en porcentaje, tomando como 100% las mediciones realizadas previo a la sección completa, después se realizó un análisis estadístico ANOVA de medidas repetidas para cada uno de estos parámetros (Figuras 6.10-6.13).

La figura 6.10 muestra el porcentaje de reducción de la potencia pico (amplitud) para la onda N1, se observa el decremento de la potencia pico (mayor al 50%) en todos los grupos de estudio después de la lesión por sección completa, también se aprecian oscilaciones alrededor del 20% de la amplitud previo a la sección, así como un incremento notable del grupo PPy en la tercera semana de evaluación, pero, inferior al 40%; ningún grupo alcanza una diferencia estadísticamente significativa.

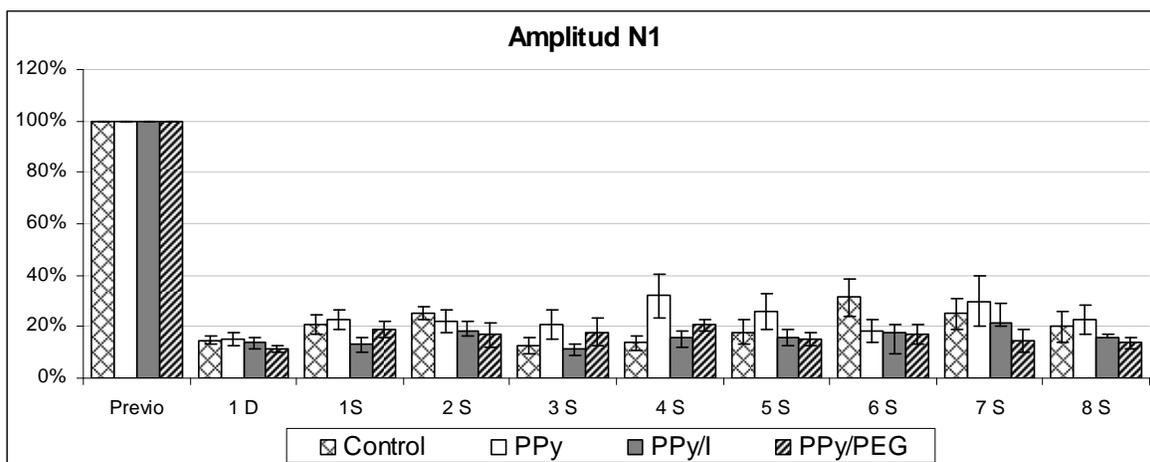


Figura 6.10: Amplitud (potencia pico) de la onda N1. Control: LPSC (n=6), PPy: LPSC más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: LPSC más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: LPSC más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Previo: previo a LPSC, 1D: un día después LPSC, 1S: una semana después de LPSC, y hasta 8S: ocho semanas después de LPSC. Los resultados están expresados en porcentaje \pm E.E. Análisis de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett.

Las mediciones de tiempo pico (latencia) para la onda N1 (figura 6.11) muestran un incremento mayor al 100% para todos los grupos después de la sección completa, así como oscilaciones que van de 240% hasta 370% para el grupo control, para el grupo PPy se observaron oscilaciones desde 150% hasta 250% con un mínimo en la séptima semana de evaluación, mientras que el grupo PPy/I mostró variaciones desde 190% hasta 265% con un mínimo en la cuarta y quinta semana de evaluación, para el PPy/PEG se observaron variaciones desde 170% hasta 280% teniendo un mínimo en la séptima semana de evaluación. Con este parámetro se observó una diferencia estadísticamente significativa del grupo PPy al ser comparado con el grupo control (* $p < 0.05$).

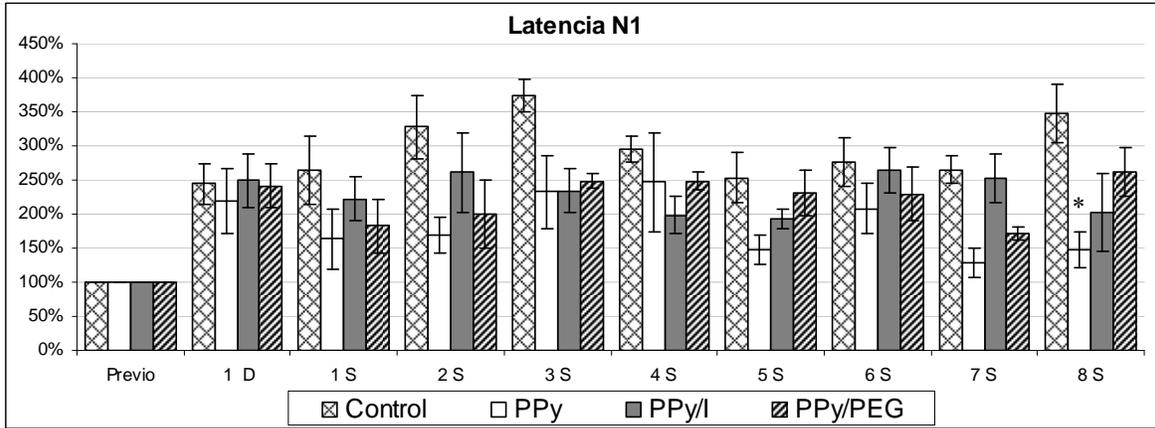


Figura 6.11: Latencia (tiempo pico) de la onda N1. Control: LPSC (n=6), PPy: LPSC más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: LPSC más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: LPSC más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Previo: previo a LPSC, 1D: un día después LPSC, 1S: una semana después de LPSC, y hasta 8S: ocho semanas después de LPSC. Los resultados están expresados en porcentaje \pm E.E. Análisis de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

Para la onda P1 las mediciones de potencia pico (amplitud) se muestran en la figura 6.12, se observa una disminución de la amplitud del 80% después de la sección completa con variaciones para todos los grupos alrededor del 20%, también se observó un incremento sobresaliente, mayor del 40% para el grupo PPy/I en la cuarta semana de evaluación, sin embargo ningún grupo resultó estadísticamente significativo al ser comparado con el grupo control.

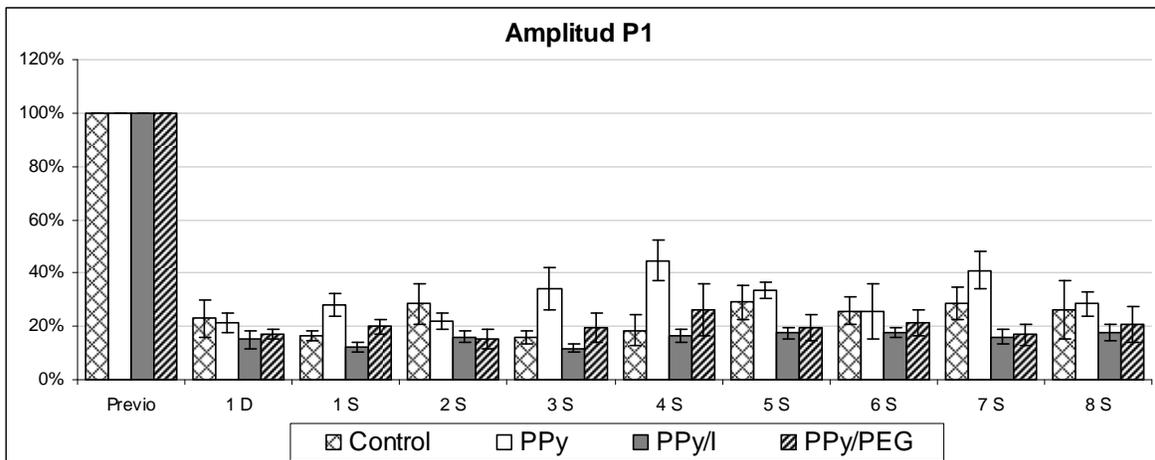


Figura 6.12: Amplitud (potencia pico) de la onda P1. Control: LPSC (n=6), PPy: LPSC más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: LPSC más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: LPSC más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Previo: previo a LPSC, 1D: un día después LPSC, 1S: una semana después de LPSC, y hasta 8S: ocho semanas después de LPSC. Los resultados están expresados en porcentaje \pm E.E. Análisis de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett.

Las mediciones de tiempo pico (latencia) para la onda P1 se muestran en la figura 6.13, en esta se observa un incremento mayor al 50% después de la sección completa de la médula espinal, las mediciones del grupo control muestran variaciones desde 170% hasta 240% con un mínimo observado un día después de la sección y en la quinta evaluación,

para el grupo PPy se observaron oscilaciones entre 130% y 160% con mínimos en la primera, segunda, séptima y octava semanas de evaluación, el PPy/I mostró variaciones entre 125% y 175% con un mínimo en la cuarta semana de evaluación, mientras que para el grupo PPy/PEG se observaron oscilaciones entre 130% y 180% mostrando un mínimo en la séptima semana de evaluación. Con la medición de la latencia para la onda P1 se observó una diferencia estadísticamente significativa para los grupos PPy y PPy/I al ser comparados con el grupo control (* $p < 0.05$).

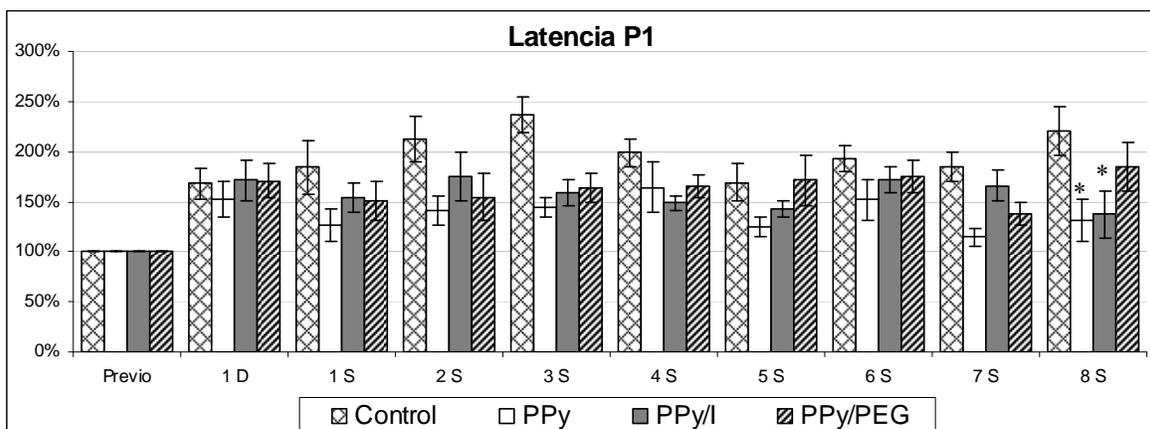


Figura 6.13: Latencia (tiempo pico) de la onda P1. Control: LPSC (n=6), PPy: LPSC más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: LPSC más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: LPSC más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Previo: previo a LPSC, 1D: un día después LPSC, 1S: una semana después de LPSC, y hasta 8S: ocho semanas después de LPSC. Los resultados están expresados en porcentaje \pm E.E. Análisis de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

6.3. Evaluación funcional

En la evaluación funcional se observó una recuperación de 2.43 y 2.5 veces mayor en los animales implantados con PPy (4.60) y PPy/I (4.67) respectivamente con respecto al grupo control (2.17) ($p < 0.05$).

En los tres grupos que recibieron implante, la recuperación funcional indica que los animales tienen función nerviosa voluntaria, pues los grupos tratados con PPy y PPy/I alcanzaron el grado 4 en la escala BBB que fue estadísticamente significativa ($*p < 0.05$) al ser comparada con el grupo control, esto indica el desarrollo de movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera (cadera, rodilla y tobillo), mientras que el grupo tratado con PPy/PEG alcanzó el grado 3, que indica la presencia de movimiento amplio de dos articulaciones (Figura 6.14). Sin embargo, el grupo tratado con PPy/PEG no resultó estadísticamente significativo al ser comparado con el grupo control.

Al realizar una comparación entre tratamientos no se encontró diferencia estadística significativa.

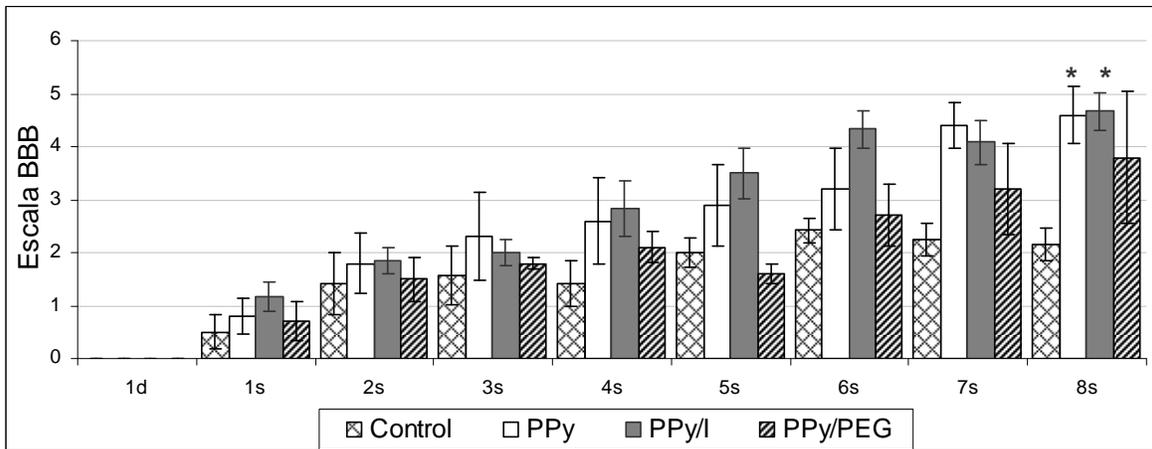
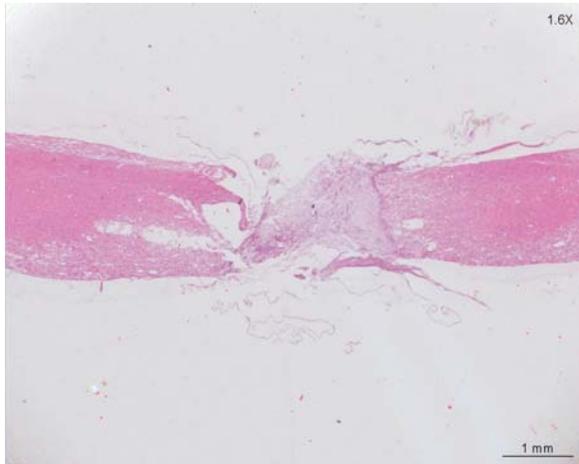


Figura 6.14: Recuperación motora evaluada con la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan). Control: sección completa de la médula espinal (n=6), PPy: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Los resultados están expresados como medias \pm E.E. El análisis de ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

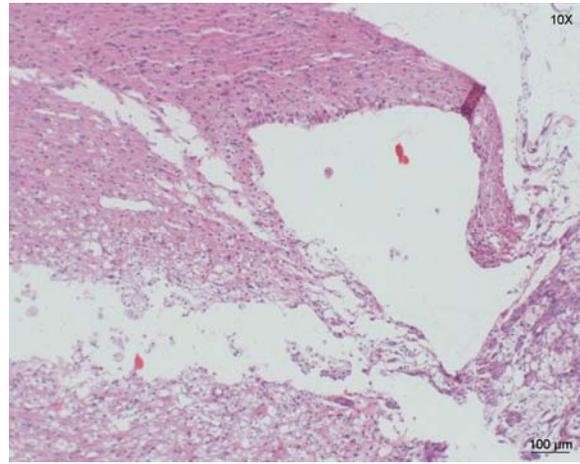
6.4. Estudio histológico

Dos meses después de la lesión por sección completa, los animales fueron sacrificados para analizar el tejido preservado de la médula espinal. En el tejido de animales que recibieron los implantes, se observa una buena integración de los materiales y proliferación celular (Figura 6.15 (2), (3), (4)). En el grupo implantado con PPy/I hay pocas cavidades en la interfaz médula-polímero. El grupo implantado con PPy/PEG presenta quistes en la zona del implante, pero no en la zona periférica, mostrando preservación del resto de tejido (Figura 6.15 (4)). Microfotografías de animales del grupo control presentaron quistes de tamaños variables y la zona de lesión parece extenderse a la sustancia blanca y gris adyacente (Figura 6.15 (1)).

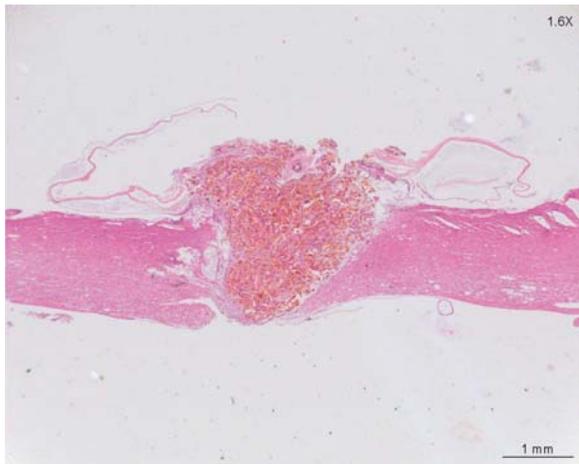
1A



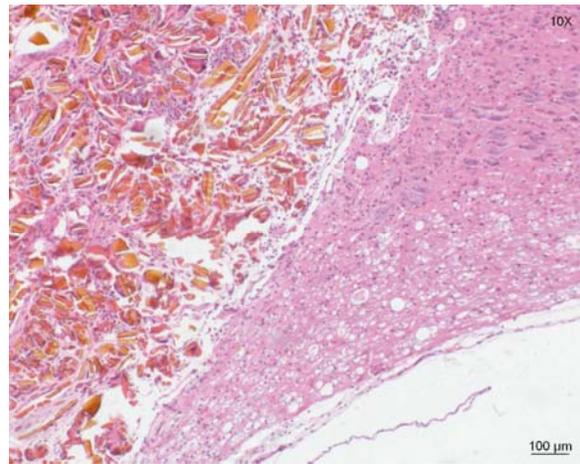
1B



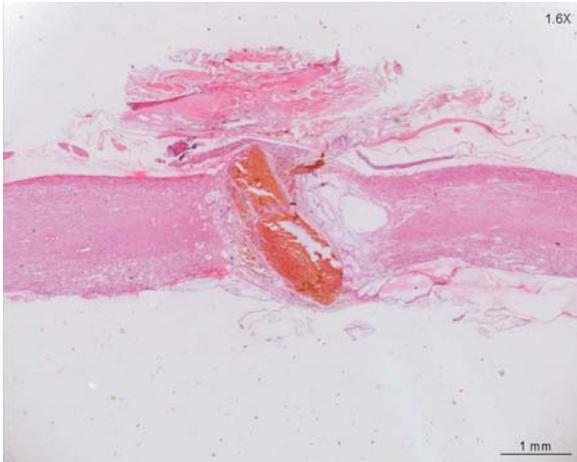
2A



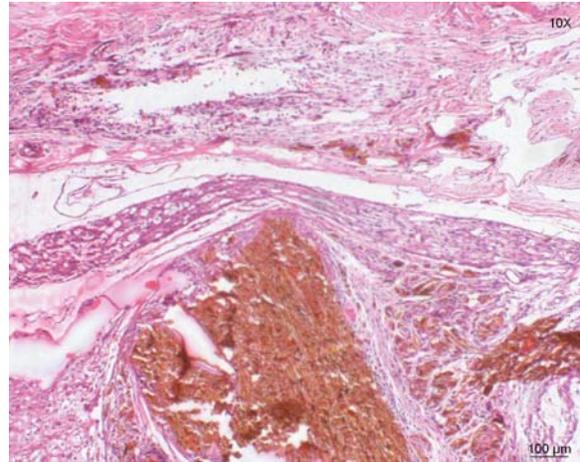
2B



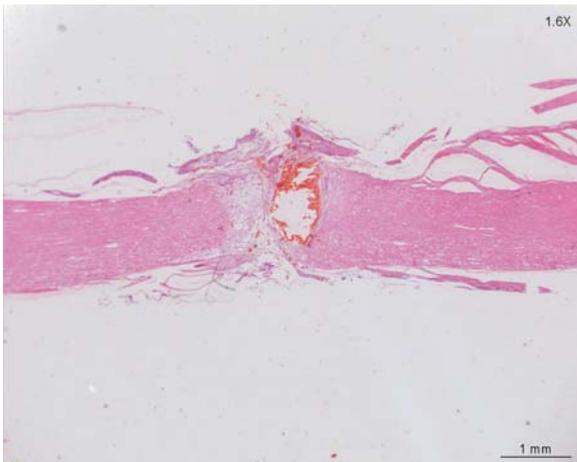
3A



3B



4A



4B

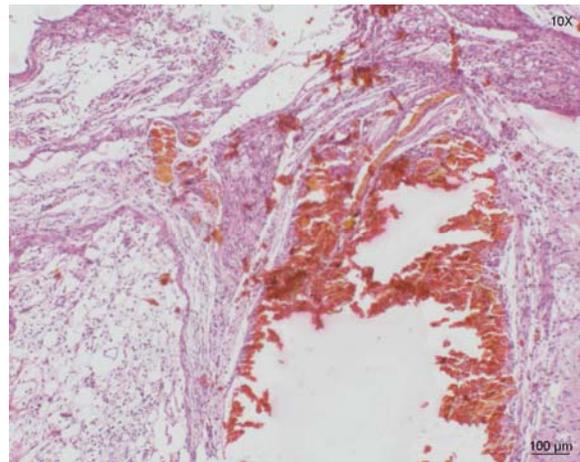


Figura 6.15: Cortes histológicos longitudinales de la médula espinal en el epicentro de la lesión. (1) Control (A: 1.6X, B: 10X); (2) PPy (A: 1.6X, B: 10X); (3) PPy/I (A: 1.6X, B: 10X); (4) PPy/PEG (A: 1.6X, B: 10X)

Se observa la presencia de respuesta inflamatoria en la sustancia gris y blanca, y en la zona del implante, esta respuesta fue mayor en el grupo control.

El análisis de tejido preservado se cuantificó para cada grupo y se muestra en la Figura 6.16. La media del porcentaje del tejido preservado se analizó en un área total de 52mm^2 . En el grupo control fue del 17.37%, mientras que en los grupos implantados con PPy 24.92%, PPy/I 24.12% y PPy/PEG 21.94% y las medias fueron 9.03 mm^2 , 12.96 mm^2 , 12.54 mm^2 y 11.41 mm^2 respectivamente con una $p < 0.05$ para el grupo PPy y PPy/I de un análisis de ANOVA, seguido por el test de Dunnett.

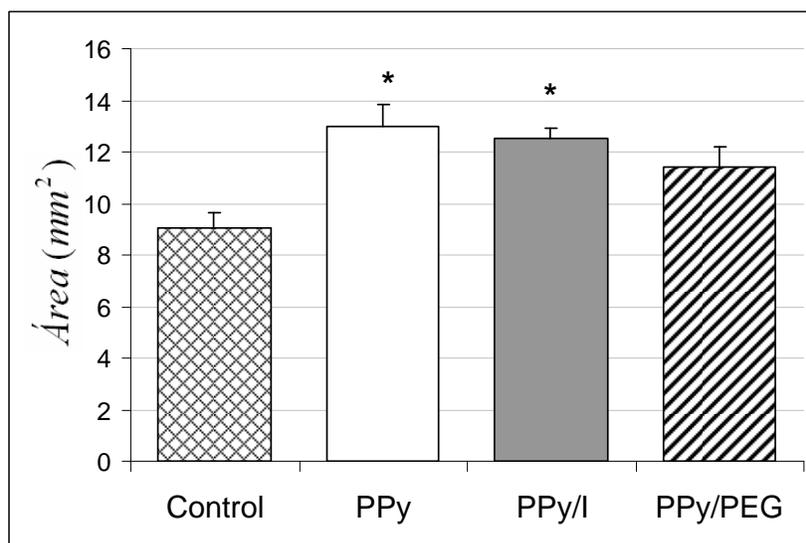


Figura 6.16: Análisis de tejido preservado. Control: sección completa de la médula espinal (n=6), PPy: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol (n=5), PPy/I: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol/Yodo (n=6), PPy/PEG: sección completa de la médula espinal más implante de Polipirrol/Polietilenglicol (n=5). Los resultados están expresados como medias \pm E.E. ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

7. Discusión

En el presente trabajo se evaluaron las características eléctricas, morfológicas y de composición elemental de tres polímeros semiconductores sintetizados por plasma (PPy, PPy/I y PPy/PEG) en un modelo de LPSC de la médula espinal en ratas, monitoreando la transmisión de la señal nerviosa mediante PES, la recuperación motora utilizando la escala BBB y la cantidad de tejido preservado. Los resultados muestran que los implantes de PPy y PPy/I favorecen la recuperación funcional y la preservación del tejido nervioso teniendo efecto neuroprotector ocho semanas después de una LPSC de la médula espinal.

La polimerización mediante plasma permite promover la polimerización sin la intervención de agentes catalizadores, y sólo intervienen en la reacción los monómeros iniciales y especies químicas derivadas de estos, así la potencial respuesta inflamatoria está limitada a la provocada por sustancias derivadas de la combinación de monómeros [112], por otro lado, estos polímeros (PPy, PPy/I y PPy/PEG) tienen la ventaja de ser no-biodegradables y por tanto no hay degradación de material que pueda provocar una mayor respuesta inflamatoria dando lugar a pérdida progresiva de tejido y cavitación quística (Figura 6.15), [112] estas ventajas se vieron reflejadas en la biocompatibilidad de los materiales, ya que, no se observó mortalidad durante el experimento en los animales debido al implante.

Los espectros de IR de los tres polímeros muestran picos característicos de pirrol, con diferencias en la configuración de los elementos constituyentes, el espectro sugiere la presencia de fragmentos de pirrol incluidos en las macromoléculas, así como la rotura de anillos del monómero y su nitración parcial, los polímeros también presentan triples ligaduras en el espectro de IR en el intervalo $2210-2250\text{cm}^{-1}$ (Figura 6.1), que corresponden al grupo nitrilo $\text{C}\equiv\text{N}$ [112]. Estas triples ligaduras pueden actuar como atrapadores de radicales libres o antioxidantes permitiendo una mayor recuperación funcional, pues actuarían reduciendo el proceso de lipoperoxidación. El nitrógeno que participa en este proceso proviene del pirrol y de la interacción atmosférica. Se observa la presencia de oxígeno que es debida a la interacción atmosférica y en el caso del PPy/PEG a la porción proveniente de las moléculas de PEG. En este sentido, la mayor porción de oxígeno de todos los polímeros es la mostrada por el PPy (Tabla 6.2), debido a una mayor exposición al medio ambiente, esta cantidad de oxígeno extra puede tener efectos en la efectividad como neuroprotector. El análisis de los espectros también indica sustituciones del anillo de pirrol asociadas al crecimiento de los polímeros con entrecruzamientos y ramificaciones promoviendo la formación de redes [112, 113]. Este entrecruzamiento en los polímeros puede servir desde el punto de vista biológico, como una estructura tridimensional de apoyo en donde las células nerviosas pueden crecer. Sin embargo, una consecuencia indeseable de esta red polimérica es que altera la configuración eléctrica entre las cadenas y como resultado se produce una reducción de la conductividad eléctrica [114, 115]. Por otra parte, aún se debe estudiar el efecto del oxígeno ambiental sobre la oxidación de los polímeros después de la síntesis y el efecto de este sobre la recuperación de la función nerviosa.

En este punto, los dopantes aumentan la conductividad eléctrica en los polímeros mediante la adición de átomos con menor o mayor concentración de electrones, estos polarizan sitios a lo largo de las cadenas. *In vivo*, los dopantes no deberían aumentar la respuesta inflamatoria en los tejidos, uno de los dopantes que ha sido probado con éxito en el aumento de la conductividad eléctrica es el yodo. [114]

El PPy/I contiene átomos de yodo vinculados física y químicamente en la estructura, que cambia las propiedades físico-químicas del polímero resultando un material semiconductor con afinidad al agua [86]. Debido a esta afinidad, el PPy/I puede aumentar su conductividad eléctrica de 4.1nS/cm a 1.189 μ S/cm respecto al PPy que va de 28.57pS/cm a 696pS/cm en condiciones de humedad. El incremento en la conductividad eléctrica parece ser responsable de la preservación de la señal nerviosa observado en mayor grado en el grupo tratado con PPy/I (Figuras 6.10-6.13). Esta característica es muy importante en los sistemas biológicos, porque el agua es un componente esencial en los tejidos. Por otra parte, el PPy/PEG, mostró una gran resistencia (del orden de G Ω) y no es considerado un polímero semiconductor, sin embargo, es un polímero hidrofílico que tiene baja adhesión celular y ha demostrado propiedades neuroprotectoras, quizás debido a su capacidad para sellar las membranas celulares dañadas y reprimir el estrés oxidativo [116, 117], reduciendo el volumen de la cavidad dañada y produciendo recuperación funcional. [118, 119]

La morfología superficial del PPy y PPy/I tienen aglomerados característicos del PPy sintetizado por plasma [86]. La rugosidad es una importante característica del PPy y PPy/I, porque aumenta la superficie donde las células pueden interactuar con los polímeros. En contraste, el PPy/PEG tiene una superficie lisa con grumos (Figura 6.2-3A,B), posiblemente originados por la presencia del PEG. El porcentaje de los elementos analizados (carbono, nitrógeno, oxígeno y yodo) presentes en los polímeros mostró que el PPy y PPy/PEG contienen cantidades similares de carbono y nitrógeno, constituyentes en la estructura de los monómeros, mientras que el PPy contiene la mayor cantidad de oxígeno, debido a una mayor interacción con el medio ambiente; por otro lado la cantidad de yodo presente en el PPy/I es elevada en peso, pero, representa aproximadamente dos anillos de monómero, entretanto el nitrógeno a un anillo de pirrol, [112] con base en las propiedades químicas y físicas de los biomateriales y su interacción con el tejido nervioso, se pudo demostrar que son bien tolerados por el tejido de la médula espinal (Figura 6.15) y que no incrementa la mortalidad de los animales.

Por otra parte, en este estudio también se pudo establecer una metodología de registro de potenciales evocados somato sensoriales intracraneales y se observó que el tejido nervioso de la corteza tolera los electrodos pues no sufrió daño visible aún cuando permanecieron implantados durante dos meses (Figura 6.3), como lo muestran los registros adquiridos estimulando las extremidades superiores hasta las ocho semanas de su colocación (Figura 6.4). Por otra parte, la colocación de los electrodos entre las cortezas somatosensoriales de las extremidades inferiores y motora posibilita la implementación de PEM, sin embargo, estos registros no se llevaron a cabo debido al riesgo de lesión de la corteza a causa del estímulo, dificultad para obtener un registro adecuado y la incertidumbre del origen de los registros [120] (proveniente del músculo de interés o proveniente de otros músculos) como se observó en pruebas previas realizadas en este

estudio. Esta metodología sólo se había llevado a cabo en modelos de contusión y compresión con registros previo y posterior a la lesión [100, 103, 121]. Para poder implementar estos registros fue necesario establecer una nueva metodología, modificando las existentes para realizar el seguimiento de la lesión por sección de la médula espinal con PES registrados con electrodos intracraneales.

Los PES son ampliamente utilizados para el monitoreo de la integridad de la médula espinal durante procedimientos quirúrgicos [104, 122] y como indicadores del grado de recuperación después de una lesión de la médula espinal [123]. Esto se realiza comparando los parámetros de amplitud y latencia de los registros posteriores a la lesión con el registro previo a ésta [124]. El criterio que indica un posible daño es un decremento del 50% en la amplitud o un incremento del 10% en la latencia [103, 108, 125]. En este trabajo, los parámetros de amplitud y latencia de los PES después de la lesión no pudieron ser evaluados en el dominio del tiempo, pues después de la LPSC de la médula espinal, estos se abatieron y no permitieron distinguir las características del registro, debido a que el modelo de LPSC de la médula espinal es muy agresivo, por otro lado, la LPSC fue la única manera de crear un espacio en la médula espinal para insertar el polímero. Por ello se implementó una representación tiempo-frecuencia (espectrograma) de los registros [103, 108], con el fin de evidenciar los cambios en los PES, una vez obtenidos los espectrogramas se implementó una CCBN entre los picos obtenidos previo a la lesión y los registros posteriores para intentar medir los parámetros de amplitud (potencia-pico) y latencia (tiempo pico), [107, 110] los resultados mostraron que los parámetros de amplitud no tenían una diferencia estadística significativa entre los grupos con implante y el control en ninguno de los picos analizados, mientras que con la latencia se observó una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con PPy y el grupo control para el pico N1, y con el pico P1 se observaron diferencias con el grupo PPy y PPy/I al compararse con el grupo control ($p < 0.05$). Sin embargo, no se cuenta con estudios previos para comparar los datos obtenidos, así como tampoco se conocen con certeza los cambios que puede sufrir la forma de onda como para ser identificada con registros de PES en la corteza después de la LPSC.

La evaluación funcional de la calidad de la marcha mostró una mayor recuperación motora en los animales implantados con PPy y PPy/I, la mayor conductividad eléctrica de los polímeros puede ser responsable de que estos grupos mostraran una mayor recuperación al interactuar eléctricamente con el tejido nervioso y debido a la presencia de mayor cantidad de tejido nervioso preservado. A su vez, es posible que los estímulos eléctricos aplicados durante los registros de PES tengan un efecto sobre la recuperación, puesto que esta fue mayor aún en el grupo control comparado con otros estudios [126].

En los cortes histológicos se observa un efecto neuroprotector en los grupos con implante de PPy y PPy/I al presentarse una mayor cantidad de tejido preservado al ser comparados con el grupo control, así también se observa la separación en fragmentos del polímero pese a que fueron introducidos en forma de pastilla y entre éstos se aprecian células como: fibroblastos, macrófagos, células inflamatorias (polimorfos nucleares) presentes en menor cantidad que en el grupo control. Los resultados hacen de estos implantes de PPy materiales biocompatibles de acuerdo con lo reportado por [127, 128, 129]. La disminución en la respuesta inflamatoria que se traduce en una presencia menor de células del sistema inmune en todos los animales que recibieron implante de polímero,

puede deberse a que el polímero actúa como blanco de las células del sistema inmune y teniendo menor interacción con el tejido nervioso (Figura 6.15).

Los resultados del presente trabajo podrían ser tomados en cuenta para proponer a los polímeros derivados del pirrol como terapia de bioingeniería encaminada a reparar la médula espinal lesionada, sin embargo, se requiere de más estudios para demostrar los mecanismos específicos sobre los que intervienen.

8. Conclusiones

1. La conducción eléctrica de los polímeros de PPy y PPy/I debido a las características físicas y químicas de los materiales puede traducirse en un aumento de la recuperación funcional. (Sección 6.1 y Sección 6.3. Figura 6.14)
2. Los implantes de polímeros de PPy y PPy/I tienen un efecto neuroprotector en un modelo de LPSC de la médula espinal que se observa al conservar una mayor cantidad de tejido nervioso al ser comparado con el grupo control. (Sección 6.4. Figura 6.15 y 6.16)
3. Los grupos tratados con implantes de PPy y PPy/I muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la latencia pero no en la amplitud al ser comparados con el grupo control. (Sección 6.2. Figura 6.10-6.13)
4. Los implantes de PPy y PPy/I promovieron una mayor recuperación motora, después de la LPSC de la médula espinal al ser evaluada por medio de la escala BBB en comparación con el grupo control. (Sección 6.3. Figura 6.14)
5. Los polímeros sintetizados por plasma reducen la respuesta inflamatoria, al observarse una menor cantidad de células del sistema inmune en el sitio de lesión. (Sección 6.4 Figura 6.15)
6. El modelo de LPSC de la médula espinal no es el más adecuado para ser utilizado en conjunto con el registro de PES, pues resulta muy agresivo y deriva en dificultades para obtener los parámetros de los registros. (Sección 6.2 Figura 6.5)
7. El implante de electrodos intracraneales a largo plazo son de utilidad para implementar los registros de PES en un modelo crónico. (Sección 6.2 Figura 6.3, 6.4)
8. Las técnicas de representación tiempo-frecuencia y CCBN, empleadas para analizar y comparar los registros presentaron limitaciones para determinar las características los PES en un modelo de LPSC (Sección 6.2, Figura 6.6-6.9)

9. Perspectivas

1. Implementar una estrategia diferente de administración de los polímeros.
2. Explorar otro modelo de lesión de la médula espinal.
3. Explorar diversas herramientas para el estudio de la función nerviosa.
4. Identificar los tipos celulares que se presentan en el sitio de lesión.
5. Emplear técnicas de tinción de tejido que permitan reconocer mielina.
6. Evaluar el efecto de los polímeros en combinación con alguna estrategia de rehabilitación (estimulación eléctrica, fisioterapia).

10. Referencias

- [1] Guyton A.C. (1997) Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Editorial médica panamericana, Argentina
- [2] Guyton A.C., Hall J.E. (2001) Tratado de fisiología médica, 10ª edición. Editorial McGraw-Hill, México
- [3] Alcaraz R.V. (2001) Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. Editorial el manual moderno, México
- [4] Paulsen D.F. (1991) Histología básica. Editorial el manual moderno, México
- [5] Cummings B. (2003) Interactive Physiology. Pearson.
- [6] Peters A., Palay S. Webster H. (1976) Microglia in the fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Editorial Philadelphia W.B. Saunders.
- [7] Krstic R. (1989) Los tejidos del hombre y los mamíferos. Editorial Interamericana McGraw-Hill; México.
- [8] Carpenter R.H.S. (1996) Neurofisiología. Editorial el manual moderno, México.
- [9] Ross, Romrell, Kaye. (1997) Histología: texto y atlas color. 3ª edición. Editorial médica panamericana.
- [10] Díaz A.R. (2003) Efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la cintaza del óxido nítrico en tejido medular de rata. Tesis doctoral. UNAM, México D.F.
- [11] Siegel G.J., Agranoff B.W., Alberts R.W., Fisher S.K., Uhler M.D. (1998) Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. 6a edition, Lippincott Raven; New Cork; pp1104
- [12] Karl E.M. (1994) Spehlmann's Evoked potential primer: Visual, auditory, and somatosensory evoked potentials in clinical diagnosis. Butterworth-Heinemann
- [13] Iriarte F.J. (2007) Clínica Universitaria de Navarra: Potenciales evocados. Sitio web Clínica universitaria de Navarra
<http://www.cun.es/areadesalud/pruebas-diagnosticas/potenciales-evocados/>
- [14] Legatt A.D. (2006) Somatosensory evoked potentials: general principles. Sitio web eMedicine from WebMD
<http://www.emedicine.com/neuro/topic640.htm>
- [15] Burneo J.G. (2006) Somatosensory evoked potentials: clinical applications. Sitio web eMedicine from WebMD
<http://www.emedicine.com/neuro/topic344.htm>
- [16] Leon K L. (2007) intraoperative neurophysiological monitoring. Sitio web eMedicine from WebMD
<http://www.emedicine.com/neuro/topic102.htm>
- [17] Hulsebosch C.E. (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv. Physiol. Educ. **26**:238-255
- [18] National Spinal Cord Injury Statistical Center. University of Alabama at Birmingham. Annual Statistical Report. June, 2006
- [19] Rodríguez A. (2004) Lesión de la médula espinal: mecanismos del daño medular. Boletín depto. docencia e investigación IREP, vol. 8 N°1, Argentina
- [20] Dusart I., Schwab M.E. (1994) Secondary cell death and inflammatory reaction after

- dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **6**:712-724
- [21] Fawcett J.W., Asher R.A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**:377–391
- [22] Lee J.M., Zipfel G.J., Choi D.W. (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**:A7–A14
- [23] Díaz R.A., Guízar S.G., Ríos C.C. (2002) Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de la médula espinal. *Rev Med IMSS*; 40 (5): 437-455
- [24] Christensen M.D., Everhart A.W., Pickelman J.T., Hulsebosch C.E. (1996) Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain* **68**: 97–107
- [25] Christensen M.D., Hulsebosch C.E. (1997) Chronic central pain after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **14**:517–537
- [26] Bareyre F.M., Schwab M.E. (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci.* **26**: 555-563
- [27] Bracken M.B., Holford T.R. (1993) Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NAZIS. *J. Neurosurg.* **79**:500–507
- [28] Bracken M.B., Shepard M.J., Collins W.F., Holford T.R., Baskin D.S., Eisenberg H.M., Flamm E., Leo S.L., Maroon J.C., Marshall L.F., Perot P.L., Piepmeier J., Sonntag V.K.H., Wagner F.C., Wilberger J.L., Winn H.R., Young W. (1992) Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J. Neurosurg.* **76**: 23–31
- [29] Hall E.D., Braughler J.M. (1987) Non-surgical management of spinal cord injuries: a review of studies with the glucocorticoid steroid methylprednisolone. *Acta Anaesthesiol. Belg.* **38**:405–409
- [30] Hall E.D. (2001) Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success?. *J. Spinal Cord Med.* **24**:142–146
- [31] Blight A.R., Zimmer M.P. (2001) Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* **2**: 801–808
- [32] Haghighi S.S., Johnson G.C., de Vergel C.F., Vergel R.B.J. (1996) Pretreatment with NMDA receptor antagonist MK801 improves neurophysiological outcome after an acute spinal cord injury. *Neurol. Res.* **18(6)**:509-515
- [33] Liu S., Ruenes G.L., Yeziarski R.P. (1997) NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Res.* **756(1-2)**:160-167
- [34] Yüceer N., Attar A., Sargon M.F., Egemen N., Türker R.K., Demirel E. (2000) The early protective effects of L-arginine and N-nitro-L-arginine methyl ester after experimental acute spinal cord injury. A light and electron microscopic study. *J Clin. Neurosci.* **7**: 238–243
- [35] Phillis J.W., Goshgarian H.G. (2001) Adenosine and neurotrauma: therapeutic perspectives. *Neurol. Res.* **23**: 183–189
- [36] Bethea J.R., Nagashima H., Acosta M.C., Briceno C., Gomez F., Marcillo A.E., Loor K., Green J., Dietrich W.D. (1999) Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* **16**: 851–863

- [37] Takami T., Oudega M., Bethea J.R., Wood P.M., Kleitman N., Bunge M.B. (2002) Methylprednisolone and interleukin-10 reduce gray matter damage in the contused Fisher rat thoracic spinal cord but do not improve functional outcome. *J Neurotrauma* **19**: 653–666
- [38] Hains B.C., Yucra J.A., Hulsebosch C.E. (2001) Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398. *J Neurotrauma* **18**: 409–423
- [39] Resnick D.K., Graham S.H., Dixon C.E., Marion D.W. (1998) Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* **15**: 1005–1013
- [40] Yamamoto T., Nozaki-Taguchi N. (1996) Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res* **739**: 104–110
- [41] Hansbout R.R., Tanner J.A., Romero-Sierra C. (1984) Current status of spinal cord cooling in the treatment of acute spinal cord injury. *Spine* **9**: 508–511
- [42] Bricolo A., Ore G.D., Da Pian R., Faccioli F. (1976) Local cooling in spinal cord injury. *Surg Neurol* **6**: 101–106
- [43] Bredesen D.E. (2000) Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotrauma* **17**: 801–810
- [44] Eldadah B.A., Faden A.I. (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* **17**: 811–829
- [45] Jones L.L., Oudega M., Bunge M.B., Tuszynski M.H. (2001) Neurotropic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* **533**: 83–89
- [46] Kwon B.K., Tetzlaff W. (2001) Spinal cord regeneration: from gene to transplants. *Spine* **26**, Suppl 24: S13–S22
- [47] Lacroix S., Tuszynski M.H. (2000) Neurotrophic factors and gene therapy in spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* **14**: 265–275
- [48] Schwab M.E. (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* **295**:1029–1031
- [49] Stichel C.C., Muller H.W. (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog Neurobiol* **56**:119–148
- [50] Rosenberg L.J., Teng Y.D., Wrathall J.R. (1999) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline reduces glial loss and acute white matter pathology after experimental spinal cord contusion. *J Neurosci* **19**: 464–475
- [51] Hansbout R.R., Blight A.R., Fawcett S., Reddy K. (1993) 4-Aminopyridine in chronic spinal cord injury: a controlled, doubleblind, crossover study in eight patients. *J Neurotrauma* **10**:1–18
- [52] Hayes K.C., Potter P.J., Wolfe D.L., Hsieh J.T., Delaney G.A., Blight A.R. (1994) 4-Aminopyridine-sensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma* **11**:433–446
- [53] Segal J.L., Brunnemann S.R. (1998) 4-Aminopyridine alters gait characteristics and enhances locomotion in spinal cord injured humans. *J Spinal Cord Med* **21**:200–204
- [54] Lu J., Ashwell K. (2002) Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord. *Spine* **27**:887–892
- [55] Bunge M.B. (2001) Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist* **7**:325–339

- [56] Zompa E.A., Cain L.D., Everhart A.W., Moyer M.P., Hulsebosch C.E. (1997) Transplant therapy: recovery of function alter spinal cord injury. *J Neurotrauma* **14**:479–506
- [57] Bregman B.S., Kunkel-Bagden E. (1988) Effect of target and non-target transplants on neurons survival and axonal elongation after injury to the developing spinal cord. *Prog Brain Res* **78**: 205–211
- [58] Houle J.D. (1992) The structural integrity of glial scar tissue associated with a chronic spinal cord lesion can be altered by transplanted fetal spinal cord tissue. *J Neurosci Res* **31**:120–130
- [59] Houle J.D., Reier P.J. (1988) Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* **269**:535–546
- [60] Tessler A. (1991) Intraspinal transplants. *Ann Neurol* **29**:115–123
- [61] Cheng H., Yihai C., Olson L. (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* **273**:510–513
- [62] Ramon-Cueto A., Plant G.W., Avila J., Bunge M.B. (1998) Longdistance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* **18**:3803–3815
- [63] McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y., Liu S., Mickey S.K., Turetsky D., Gottlieb D.I., Choi D.W. (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* **5**:1410–1412
- [64] Geller H.M., Fawcett J.W. (2002) Building a bridge: Engineering spinal cord repair. *Exp Neurol* **174**:125–136
- [65] McDonald J.W., Sadowsky C. (2002) Spinal-cord injury. *Lancet* **359**:417–425
- [66] Khan T., Dauzvardis M., Sayers S. (1991) Carbon filament implants promote axonal growth across the transected rat spinal cord. *Brain Res.* 541: 139-145
- [67] Cao X., Schoichet M.S. (1999) Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders. *Biomaterials.* 20: 329-339
- [68] Woerly S., Pinet E., de Robertis L., Van Diep D., Bousmina M. (2001) Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials.* 22: 1095-1111
- [69] Oudega M., Gautier S.E., Chapon P., Fragoso M., Bates M.L., Parel J.M., Bunge M.B. (2001) Axonal regeneration into Schwann cell grafts within resorbable poly(alpha-hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal cord. *Biomaterials.* 22: 1125-1136
- [70] Novikov L.N., Novikova L.N., Mosahebi A., Wiberg M., Terenghi G., Kellerth J.O. (2002) A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials.* 23: 3369-3376
- [71] Dalton P.D., Flynn L., Shoichet M.S. (2002) Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels. *Biomaterials.* 23: 3843-3851
- [72] Marchant R.E., Anderson J.M., Dillingham E.O. (1986) In vivo biocompatibility studies. VII. Inflammatory response to polyethylene and to a cytotoxic polyvinylchloride. *J Biomed Mater Res.* 20: 37-50
- [73] Gautier S.E., Oudega M., Fragoso M., Chapon P., Plant G.W., Bunge M.B., Parel J.M. (1998) Poly(alpha-hydroxyacids) for application in the spinal cord: resorbability and biocompatibility with adult rat Schwann cells and spinal cord. *J*

- Biomed Mater Res. 42: 642-654
- [74] Rangappa N., Romero A., Nelson K.D., Eberhart R.C., Smith G.M. (2000) Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *J Biomed Mater Res.* 51: 625-634
- [75] Pechar M., Ulbrich K., Subr V., Seymour L.W., Schacht E.H. (2000) Poly(ethylene glycol) multiblock copolymer as a carrier of anti-cancer drug doxorubicin. *Bioconj Chem.* 11: 131-139
- [76] Seckel B.R., Jones D., Hekimian K.J., Wang K.K., Chakalis D.P., Costas P.D. (1995) Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res.* 40: 318-324
- [77] Campoccia D., Doherty P., Radice M., Brun P., Abatangelo G., Williams D.F. (1998) Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials.* 19: 2101-2127
- [78] Heffner C.D., Lumsden A.G., O'Leary D.D. (1990) Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. *Science.* 247: 217-220
- [79] Tong X.J., Hirai K., Shimada H., Mizutani Y., Izumi T., Toda N., Yu P. (1994) Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res.* 663: 155-162
- [80] Stenger-smith J.D. (1998) Intrinsically electrically conducting polymers. Synthesis, characterization, and their applications. *Progress in Polymer Science.* Vol. 23, p. 57-58
- [81] Carbajal M.D. (2000) Plásticos que conducen la electricidad. *Avance y Perspectiva.* Vol. 20, 43-45
- [82] Kungl. Vetenskapsakademien / the royal swedish academy of sciences. The Nobel Prize in Chemistry 2000: Conductive polymers
- [83] Kumar D., Sharma R.C. (1998) Advances in conductive polymers. review article. *Eur. Polym. J.* Vol. 34, no. 8, pp. 1053±1060
- [84] Aldea E. (1999) Plasma polymerization processes characteristics and applications. Ph. D. Thesis. Ministry of education institute of atomic physics. Bucarest
- [85] Morales J. (2001) Polimerización por plasma: tratamiento superficial y simulación del plasma. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México
- [86] Olayo R., Cruz G., Morales J. (1999) Films obtained by plasma polymerization of pyrrole; *Thin Solid Films* 342 119-126
- [87] Chua P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N. (2002) Plasma-surface modification of biomaterials; *Materials Science and Engineering R* 36 143–206
- [88] Park J. B. (1979) *Biomaterials: an introduction.* Editorial plenum press
- [89] Hoffman A.S., Ratner B.D., Garfinkle A.M., Reynolds L.O., Horbett T.A., Hanson S.R. (1985) *Polymers in medicine II –Biomedical and pharmaceutical applications;* Plenum Press
- [90] Yeh T.S., Iriyama Y., Matsuzawa Y., Yasuda H. (1987) *A.C.S. Polym. Mater. Sci. Eng.* 56, 715
- [91] Mateo N.B., Ratner B.D. *Transactions of the third World biomaterials Congress* 11, 351
- [92] Chinn J.A., Horbett T.A., Ratner B.D., Schway M.B., Haque Y., Hauschka S.D.; *J. Coll. Inter. Sci.* 127(1), 67
- [93] Nichols M.F., Hahn A.W., James W.J., Sharma A.K., Yasuda H.K. *Biomaterials*

- 2, 161
- [94] Charla A. S. (1979) *Artif. Organs* 3, 92
- [95] Akovali G., Hasirci N. (1984) *J. Appl. Polym. Sci.* **29**, 2617
- [96] Triolo P.M., Andrade J. D. (1983) *J. Biomed. Mater. Res.* **17**, 129
- [97] Haque Y., Ratner B.D. (1986) *J. Appl. Polym. Sci.* **32**, 4369
- [98] Paxinos G., Watson C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*; Fourth Edition, Academic Press
- [99] Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 12(1):1-21
- [100] Fehlings G.M., Tator C.H., Dean R.L., Piper I.R. (1988) Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 69:65-78
- [101] Cao Q., Zhang Y.P., Iannottia C., DeVries W.H., Xiao-Ming Xu, Shields C.B., Whittemore S.R. (2005) Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Experimental Neurology* 191 S3–S16
- [102] Yu K., Rong W., Li J., Jia L., Yuan W., Yie X., Shi Z. (2001) Neurophysiological evidence of spared upper motor conduction fibers in clinically complete spinal cord injury: discomplete SCI in rats. *J Neurol Sci* 189:23–36
- [103] Hu Y., Luk K.D., Lu W.W., Colmes A., Leong J.C.Y. (2001) Prevention of spinal cord injury with time-frequency analysis of evoked potentials: an experimental study. *J Neurol Psychiatry* 71:732-740
- [104] Jong-Pil P., Ki-Jeong K., Ji H.P., Chul-Kee P., Jong-Hoon K., Hyo J.K., Dohun L., Kyu H.H., Kyu-Chang W., Sun H.P. (2007) Simple measurement of spinal cord evoked potential: A valuable data source in the rat spinal cord injury model. *Journal of Clinical Neuroscience* 14 1099–1105
- [105] Fehlings M.G., Tator C.H., Linden R.D. (1989) The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 74:241-259
- [106] Oppenheim A.V., Schafer R.W. (2000) *Tratamiento de señales en tiempo discreto* 2ª edición. Madrid
- [107] Hu Y., Luk K.D., Lu W.W., Leong J.C. (2002) Comparison of time-frequency analysis techniques in intraoperative somatosensory evoked potentials (SEP) monitoring. *Computers in Biology and Machina* 32:12-23
- [108] Hu Y., Luk K.D., Lu W.W., Leong J.C. (2003) Application of time-frequency analysis to somatosensory evoked potential for intraoperative spinal cord monitoring. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:82-8
- [109] González R., Woods R. (1996) *Tratamiento digital de imágenes*. Addison-Wesley/Díaz de Santos
- [110] Laciár L.E., Jané R.J. (2005) Detección y análisis latido a latido de potenciales tardíos ventriculares mediante mapas espectro-temporales
- [111] Lewis J.P. Fast Normalized Cross-Correlation. *Industrial Light & Magic*. Sitio web www.idiom.com/~zilla/Work/nvisionInterface/nip.html
- [112] Olayo R., Rios C., Salgado-Ceballos H., Cruz G.J., Morales J., Olayo M.G., Alcaraz-Zubeldia M., Alvarez A.L., Mondragón L.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*

- [113] Mondragón L.R., Alvarez M.A., Morales G.A. (2004) Interfaz Neuro-Motora, Conector permanente para la extracción de señales neuro-motoras. Tesis de licenciatura IPN, México
- [114] Beattie M.S. (2004) Trends. Mol. Med. 10:580.
- [115] Cruz G.J. (1998) Estudio sobre la polimerización por plasma en materiales semiconductores. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México
- [116] 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
- [117] Nombra H., Tator C.H., Shoichet M.S. (2006) Bioengineered Strategies for Spinal Cord Repair. *Journal of neurotrauma* 23:3/4
- [118] Borgens R.B., Shi R., Bohnert D. (2002). Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. *J. Exp. Biol.* 205, 1–12
- [119] Laverty P.H., Leskovar A., Breur G.J. (2004). A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. *J. Neurotrauma* 21, 1767–1777
- [120] Merletti R., Knaflitz M., Peluca C.J. (1992) Electrically evoked myoelectric signals. *Critical reviews in biomedical engineering*, 19(4):293.340
- [121] Ming J.I. (2000) Effects of Core Body Temperature on Changes in Spinal Somatosensory-Evoked Potential in Acute Spinal Cord Compression Injury. *SPINE Vol 25, Num 15*, pp 1878–1885
- [122] Lam S.C.B. (2003) Fast signal processing techniques for surface somatosensory evoked potentials measurement. Tesis de maestría. Universidad de Hong Kong
- [123] Curt A., Dietz V. (1999) Electrophysiological recordings in patients with spinal cord injury: significance for predicting outcome. *International Medical Society of Paraplejia. Spinal Cord* 37:157-165
- [124] Luciana Pelosi., Lamb J., Grevitt M., Mehdian S.M.H., Webb J.K., Blumhardt L.D. (2002) Combined monitoring of motor and somatosensory evoked potentials in orthopaedic spinal surgery. *Clinical Neurophysiology* 113 1082–1091
- [125] Burke D., Nuwer M.R., Daube J., Fischer C., Schramm J., Yingling C.D., Jones S.J. (1999) Intraoperative monitoring. In: *Recommendations for the Practice of clinical neurophysiology: guidelines of the International Federation of Clinical Physiology (EEG Suppl 52)*, Amsterdam: Elsevier Science, 133–148
- [126] Mondragón R., Alvarez L., Morales A., Morales J., Olayo R., Díaz A., Ríos C., Cruz G., Olayo G., Salgado H. (2005) implante de polipirrol sintetizado por plasma en la médula espinal de ratas. XXVIII Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica. México
- [127] Zhang Z., Roy R., Dugre F.J., Tessier D., Dao L.H. (2001) *J. Biomed. Mater. Res.* 57 63
- [128] Jiang X., Tessier D., Dao L.H., Zhang Z. (2002) *J. Biomed. Mater. Res.* 15 62
- [129] Shi G., Rouabhia M., Wang Z., Dao L.H., Zhang Z. (2004) *Biomaterials* 25 2477

11. Anexos

A. 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 calificado y competente en la materia y deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

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

B. Escala BBB

La escala BBB evalúa 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 está caminando o pasos ocasionales ($\leq 50\%$), frecuentes (51% al 94%) o constantes (95% al 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.

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

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

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

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

Grado 14: Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de patas, principalmente al hacer contacto

con el piso o al despegar. También 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.

C. Procedimiento de tinción. Método de Hematoxilina y Eosina de Harris

FIJACIÓN:

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

SECCIONES:

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

SOLUCIONES:

- ▶ Alcohol ácido al 1%.
- ▶ Agua amoniacal.
- ▶ Solución saturada de carbonato de litio.
- ▶ Solución de eosina-floxina.

HEMATOXILINA DE HARRIS:

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

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

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinice las láminas e hidrate hasta llegar al agua destilada. Utilice “dezenkerice”, si es necesario antes de teñir.
2. Tiña en hematoxilina de Harris filtrada recientemente de 6-15min.
3. Lave en agua corriente de 2-5min.
4. Diferencie en alcohol ácido al 1%, de 1-2 remojones.
5. Lave levemente en agua corriente.
6. Coloque las 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 1-2min.
9. Contraste en la solución de eosina-floxina por 2min.
10. Deshidrate y aclare a través de 2 cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto, y luego xileno, 2min en cada cambio.
11. Montar con medio resinoso.

RESULTADOS:

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

D. Procedimiento de tinción. Método de cresilo de Vogt para sustancia de Nissl

FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%, estabilizada.

SECCIONES: Parafina, de 6 a 20 micrones.

SOLUCIONES

SOLUCIÓN MATRIZ DE VIOLETA "ECHT" DE CRESILO AL 2 %

Violeta "echt" de cresilo	2.0 g
Agua destilada	100 ml

SOLUCIÓN ESTABILIZADORA DE ACETATO DE SODIO

Acetato de sodio	2.0 g
Agua destilada	1000 ml
Acido acético, glacial	3 ml

SOLUCIÓN DIARIA DE VIOLETA "ECHT" DE CRESILO

Solución matriz de violeta "echt" de cresilo al 2%	1 ml
Solución estabilizadora	100 ml

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinice e hidrate hasta llegar al segundo cambio de alcohol absoluto.
2. Deje en reposo en alcohol absoluto por 2 horas.
3. Coloque en la solución diaria de violeta "echt" de cresilo de 40 a 60 minutos.
4. Diferencie rápidamente en alcohol al 95%.
5. Deshidrate y aclare a través de alcohol absoluto y xileno, 2 cambios c/u, 2 min. c/u.
6. Monte usando un medio resinoso.

RESULTADOS

Sustancia de Nissl	púrpura intenso
Núcleos	púrpura
Fondo	claro



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Ingeniería Biomédica**

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

**Evaluación del efecto de tres implantes poliméricos en la función nerviosa
en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas**

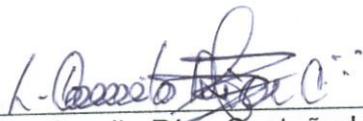
Presenta:

Rodrigo Mondragón Lozano

Asesoras:

**Dra. María Teresa García González
Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz**

Sinodales:



Dr. Camilo Ríos Castañeda
Presidente



Dra. Ma. Teresa García González
Secretaria



M. en I. Juan Manuel Cornejo Cruz
Vocal

México, Abril de 2009