



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

---

Maestría en Ciencias de la  
Producción y Salud Animal.

EFEECTO DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA  
ÓSEA SOBRE LA REGENERACIÓN AXONAL Y MEJORÍA DE LA  
FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN  
COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

## **T E S I S:**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS.

### **ALUMNA:**

VINNITSA BUZOIANU ANGUIANO.

### **TUTOR PRINCIPAL:**

DR. ISRAEL GRIJALVA OTERO IMSS.

### **COMITÉ TUTORAL:**

DRA. SARA CABALLERO CHACÓN FMVZ.

DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ IMSS.

JUNIO 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS:**

*Quiero agradecer primero a los animales que nos ayudaron a realizar este proyecto ya que sin ellos no habiéramos podido realizar nada.*

*Gracias al Dr. Israel Grijalva Otero por la ayuda en todo este tiempo, por ser la persona que ha creído en mí como estudiante y como investigadora y porque todo este tiempo me ha forjado como tal. Gracias a la Dra. Sandra Orozco Suárez por toda su ayuda, comprensión y por todas sus enseñanzas que me ha dado y sobre todo por la confianza que me dio para realizar todos mis trabajos.*

*A la Dra. Sara Caballero Chacón por estar en mi comité tutorial y por el apoyo que me brindó en el área del cultivo además de los buenos consejos que me dio.*

*Al Instituto Mexicano del Seguro Social por darnos la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.*

*Al programa de posgrado de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia por el apoyo que nos brindan a cada uno de los estudiantes de posgrado.*

*Al programa de becas de CONACYT y del IMSS.*

*A los doctores participantes del comité evaluador: Dra. Edda Sciutto Conde; Dr. Carlos Eduardo Santoscoy Mejía; Dra. Selva Rivas Aranciba y al Dr. Gabriel Guizar Sahagún.*

*Quiero agradecer a dios por la oportunidad para llevar a cabo todas mis metas en esta etapa de mi vida.*

*Gracias a mi papá por todo su apoyo y comprensión que me ha brindado siempre y sé que siempre confiara en mí y en mis decisiones gracias papá.*

*Gracias a mi mamá también por todo su apoyo y comprensión, por siempre estar ahí junto de mí y apoyarme en todas mis decisiones y porque sé que siempre me va a apoyar gracias.*

*A mis hermanos Janeth, Ivan, Berenice y Yaxkin por el apoyo incondicional que siempre me han brindado por ser su hermana menor y por sus consejos que cada uno me ha dado.*

*Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio Miguel, Stephie, Angelica, Rafael, David y Karina porque juntos hemos vivido cosas importantes, hemos aprendido, disfrutado además de su gran apoyo en esos momentos de frustración y lo más valioso su amistad gracias chicos.*

*A las Dras. Patricia Campos, Hermelinda Salgado, Iris Feria y Paola de la Torre porque nos han enseñado a trabajar y a con vivir como un grupo de trabajo y porque cada una de ellas nos ha apoyado en nuestras decisiones.*

*Y gracias a mis amigas Elisa, Iris, Maribel, Marisol y Liz por su gran apoyo que me han brindado todo este tiempo y por su gran amistad que es lo más valioso e importante para mí gracias.*

# INDICE

INDICE DE GRÁFICAS .....	2
INDICE DE FIGURAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS:.....	4
RESUMEN: .....	6
ABSTRACT:.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL.....	10
MECANISMOS DE LESIÓN PRIMARIA.....	11
Contusión medular:.....	11
Sección completa y hemisección medular:.....	11
Modelo fotoquímico:.....	12
Modelos excitotóxicos:.....	12
Compresión por clip: .....	12
EVENTOS SECUNDARIOS DE LESIÓN.....	13
Fase aguda:.....	13
Fase crónica:.....	20
ESTRATEGIAS PARA FAVORECER LA REGENERACIÓN Y LA FUNCIÓN.....	20
Trasplante de tejidos.....	21
Trasplante de células.....	21
Trasplantes con células de Schwann.....	22
Trasplante con células envoltantes de glía olfatoria (OEG).....	23
Trasplante de células troncales.....	24
ESTRATEGIAS PARA FAVORECER EL RECRECIMIENTO AXONAL A TRAVÉS DE PUENTES.....	28
Injertos de nervio periférico:.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	30
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	31
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
METODOLOGÍA.....	33
Cultivo celular:.....	33
Citometría de Flujo:.....	34
Procedimientos quirúrgicos:.....	34
Análisis funcional:.....	36
Inmunofluorescencia con Cd113:.....	37
TÉCNICA HISTOLÓGICA.....	37
Método de Kluver- Barrera:.....	37
Inmunofluorescencia con Neurofilamento:.....	38
Inmunofluorescencia con GAP-43, Neuritin y PBM:.....	38
ANÁLISIS DE IMÁGENES: .....	39
MORFOLOGÍA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:.....	39
Doble marcaje con S-100 y Cd117:.....	40

<i>ESTADÍSTICA:</i> .....	40
<i>CONSIDERACIONES ÉTICAS:</i> .....	40
<i>RESULTADOS.</i> ....	41
Caracterización de las células trasplantadas: .....	41
Análisis de la función locomotora.....	43
Análisis con Luxol Fast Blue. ....	46
Análisis de fibras con Neurofilamento.....	47
<i>REGENERACIÓN AXONAL Y REMIELINIZACIÓN AXONAL:</i> .....	49
Análisis de la inmunofluorescencia con gap-43. ....	49
Análisis de la inmunofluorescencia con Neuritin. ....	52
Análisis de la inmunofluorescencia con proteína básica de la mielina (PBM). ....	55
Análisis de la intensidad de fluorescencia con GAP-43.....	59
Análisis de la intensidad de fluorescencia con Neuritin. ....	61
Análisis de la intensidad de la fluorescencia con proteína básica de la mielina. ....	63
<i>ANÁLISIS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.</i> .....	66
Mielinización: .....	66
<i>DISCUSIÓN:</i> .....	70
<i>CONCLUSIONES.</i> ....	75
<i>PERSPECTIVAS.</i> ....	75
<i>BIBLIOGRAFIA:</i> .....	76

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA 1:</b> CAUSAS DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (McKINLEY Y COLS., 2006). ....	10
<b>GRAFICA 2.</b> ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN BASE A LAS ESCALA BBB. ....	44
<b>GRAFICA 3.</b> ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO GAP-43 EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	60
<b>GRAFICA 4.</b> ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO GAP-43 EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL.. ....	61
<b>GRAFICA 5.</b> ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO NEURITIN EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MEDULA ESPINAL. ....	62
<b>GRAFICA 6.</b> ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE FLORESCENCIA DEL EL ANTICUERPO NEURITIN EN LA ZONA DISTAL DE LA MEDULA ESPINAL. ....	63
<b>GRAFICA 7.</b> ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO PBM EN LA ZONA PROXIMAL. ....	64
<b>GRAFICA 8.</b> ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA DEL EL ANTICUERPO PBM EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL.....	65

## INDICE DE FIGURAS.

<b>FIGURA 1.</b> MECANISMOS FISIOPATOLÓGICO DE UNA LTME. (ACEVEDO GONZÁLEZ Y COLS., 2008) .....	14
<b>FIGURA 2.</b> MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD POR GLUTAMATO. (SCHWARTZ Y COLS., 2003) .....	16
<b>FIGURA 3.</b> MECANISMOS FISIOPATOLÓGICO DE UNA LTME. (ACEVEDO GONZÁLEZ Y COLS., 2008) .....	18
<b>FIGURA 4.</b> FORMACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN. (MIRSKY Y COLS., 2002).....	22
<b>FIGURA 5.</b> ORIGEN DE LAS CÉLULAS TRONCALES. (WATT Y DRISKELL 2010). .....	25
<b>FIGURA 6.</b> DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
FIGURA 7. CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS CEMO CON Cd34, Cd13 y Cd117.. .....	42
FIGURA 8. FOTOMICROGRAFÍA DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA IN VITRO. ....	43
<b>FIGURA 9.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE CÉLULAS CEMO INMUNOREACTIVAS CON LOS ANTICUERPOS Cd13 y Cd117. ....	45
<b>FIGURA 10.</b> FOTOMICROGRAFÍA DEL ACOPLAMIENTO DE TEJIDO DEL TRASPLANTE EN LA MÉDULA ESPINAL TEÑIDA CON LUXOL FAST BLUE. ....	46
<b>FIGURA 11.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON NEUROFILAMENTO EN MÉDULA ESPINAL.. .....	48
<b>FIGURA 12.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS A GAP-43, ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	50
<b>FIGURA 13.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS A GAP-43, ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	51
<b>FIGURA 14.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS Y CONOS DE CRECIMIENTO CON EL ANTICUERPO NEURITIN, ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	53
<b>FIGURA 15.</b> FOTOMICROGRAFÍAS DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON NEURITIN EN LA ZONA DISTAL DE LA MEDULA ESPINAL. ....	54
<b>FIGURA 16.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON PBM EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	56
<b>FIGURA 17.</b> FOTOMICROGRAFÍAS DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON PBM EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL .....	57
<b>FIGURA 18.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS DE LOS TRES ANTICUERPOS DE LA ZONA DE TRASPLANTE DE LA MÉDULA ESPINAL.. .....	58
<b>FIGURA 19.</b> FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.....	66
<b>FIGURA 20.</b> FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL GRUPO CON TRASPLANTE NPP.....	67
<b>FIGURA 21.</b> FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL DEL GRUPO CON TRASPLANTE DE NPP+CEMO.. .....	68
<b>FIGURA 22.</b> FOTOMICROGRAFÍA DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS POSITIVAS PARA S-100 y Cd13 EN EL GRUPO NPP+CEMO .69	

## LISTA DE ABREVIATURAS:

- I. AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido).
- II. ATP (Adenosil trifosfato).
- III. BDNF (Factor de crecimiento derivado de cerebro).
- IV. bFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos).
- V.  $CA^{2+}$  (Calcio).
- VI. CEG (Células embriológicas germinales).
- VII. CEMO (Células estromales de médula ósea).
- VIII. CFS (Factor estimulante de colonias).
- IX. CR3 (Receptor 3 del complemento).
- X. Cs (Célula de Schwann).
- XI. CSF-1 (Factor de estimulante de colonias 1).
- XII. epiSC (Células troncales derivadas del epiblasto).
- XIII. ES (Células embriológicas).
- XIV. FG (Fibrin glue).
- XV. GDNF (Factor derivado de células gliales).
- XVI. HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos).
- XVII. i.p (Intra peritoneal).
- XVIII. I.P (Ioduro de Propidio).
- XIX. IL-1 $\beta$  (Interleucina 1- $\beta$ ).
- XX. IL-2 (Interleucina 2).
- XXI. IL-5 (Interleucina 5).
- XXII. IL-6 (Interleucina 6).
- XXIII. LTME (Lesión traumática de médula espinal).
- XXIV. MAG (Glicoproteína asociada a la mielina).
- XXV. MCP (Proteína quimioatrayente de monocitos).
- XXVI. ME (Médula espinal).
- XXVII. NGF (Factor de crecimiento neural).
- XXVIII. NK (Natural killers).
- XXIX. NMDA (N-metil D-aspartato).
- XXX. NOGO-A
- XXXI. NPP (Nervio periférico predegenerado).
- XXXII. NT 4/5 (Neurotrofina 4/5).
- XXXIII. NT-3 (Neurotrofina 3).
- XXXIV. OEG (Células envolventes de glía olfatoria).
- XXXV. OMgp (Glicoproteína asociada a oligodendrocitos).
- XXXVI. PBM (Proteína básica de la mielina).
- XXXVII. PBS (Buffer de fosfatos salinos).

- XXXVIII. pH (Potencial de hidrógeno).
- XXXIX. RNS (Especies reactivas de nitrógeno).
  - XL. ROS (Especies reactivas de oxígeno).
  - XLI. rpm (Revoluciones por minuto).
  - XLII. SDF-1 (Factor derivado de células estromales).
  - XLIII. SNC (Sistema nervioso central).
  - XLIV. TC (Terapia celular).
  - XLV. TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ).
  - XLVI. VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular).
  - XLVII. VO (Vía oral).

## ***RESUMEN:***

La Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME), es un daño que provoca un cambio temporal o permanente en las funciones motoras y sensoriales del sistema nervioso central (SNC). La recuperación de la médula espinal (ME), es limitada por la poca regeneración celular y el crecimiento axonal, así como por la falla en el reemplazo de la mielina dañada lo que impide el restablecimiento de conexiones neuronales funcionales.

Hasta la fecha, no existe algún tratamiento eficaz para las LTME, sin embargo, tratamientos como el trasplante de nervio periférico predegenerado (NPP), han mostrado en modelos de hemisección y sección completa, promover el recrecimiento axonal. Además, remieliniza los axones centrales y colaterales de la ME sin embargo, esto ha sido insuficiente para permitir la recuperación funcional. Por otra parte el trasplante de células estromales de médula ósea (CEMO) ha demostrado, en modelos por contusión y sección completa, que se pueden formar filamentos guía y promover la remielinización, la regeneración axonal y la recuperación funcional después de una LTME.

El objetivo de este proyecto fue probar el efecto del trasplante combinado de NPP y CEMO después de una LTME por sección completa. Para esto, se utilizaron ratas Fisher 344 con LTME a nivel T9, las ratas fueron asignadas en 4 grupos distribuidos de la siguiente manera, grupo 1 (ratas con LTME sin tratamiento); grupo 2 (ratas con LTME + Fibrin Glue); grupo 3 (ratas LTME + Fibrin Glue + trasplante de NPP) y grupo 4 (ratas LTME + Fibrin Glue + trasplante de NPP + trasplante de CEMO). A todos estos grupos se les realizó una evaluación por un período de dos meses, para determinar la función locomotora mediante la escala funcional BBB, después de este período los animales fueron sacrificados para extraerles el tejido medular. Para evaluar la regeneración axonal, se realizó inmunofluorescencia con GAP-43 y Neuritin. Y para evaluar la remielinización se realizó inmunofluorescencia con PBM además de microscopía electrónica.

Los resultados obtenidos muestran una mayor cantidad de regeneración axonal y remielinización en los grupos de tratamiento (grupos 3 y 4) con respecto a los grupos controles (grupos 1 y 2), ya que se observó formación de conos de crecimiento axonal. Además entre los grupos experimentales también se observaron diferencias significativas. En el grupo combinado (grupo 4), las fibras nerviosas encontradas presentaron mayor grosor de mielina con respecto al grupo con solo NPP (grupo 3), así como mayor cantidad de mielina en la zona distal de la ME, además de, presentar formación de nuevos axones y mielina.

Respecto al análisis funcional, se encontraron diferencias entre los grupos de tratamiento con respecto a los grupos controles, mientras que entre los grupos experimentales no hubo diferencias, probablemente porque el tiempo de evaluación no fue suficiente para observar mejorías en la función locomotora. En conclusión se demostró que el tratamiento combinado de NPP y CEMOS, es una estrategia favorable para la regeneración axonal y la remielinización, ya que promueven un microambiente permeable y favorable después una LTME.

**Palabras Clave:** Lesión traumática de medula espinal; células estromales de medula ósea; nervio periférico predegenerado; regeneración axonal; remielinización axonal.

## ***ABSTRACT:***

The traumatic spinal cord injury (TSCI) is a temporary or permanent damage which provokes a change in the motor and sensory function of the central nervous system (CNS). Recovery of the spinal cord (SC) is limited because of the low cell regeneration and axonal growth, also due to the failure of replacement of damaged myelin, which prevents functional recovery of neuronal connections.

At this time, there is no effective treatment for TSCI; however, some treatments such as predegenerated peripheral nerve transplantation (PPN) have shown to promote axonal regrowth as well as remyelination of central and collateral SC axons in hemisection and complete section models. Nonetheless this is not enough to allow functional recovery. Moreover, the bone marrow stromal cells (BMSc) are capable of forming guide filaments and promote axonal regenerate, remyelination and functional recovery after TSCI.

The aim of this study was to determine the combined therapy of PPN and BMSc transplantation effect after a TSCI the complete section model. We used female Fisher 344 rats were subjected to a whole spinal cord section at thoracic 9 (T9) and then were distributed in 4 groups, group 1 (TSCI without treatment); group 2 (TSCI+Fibrin Glue); group 3 (TSCI+ Fibrin Glue+ PPN transplantation) and group 4 (TSCI+ Fibrin Glue+ PPN transplantation + BMSc transplantation). All groups were evaluated during 2 months to determine locomotor function using the BBB scale, and were then sacrificed in order to obtain the spinal tissue and evaluate the axonal regeneration by GAP-43 and Neuritin immunofluorescence, as well as to assess remyelination by MBP immunofluorescence with electronic microscopy.

Results show more axonal regeneration in the treated groups (group 3 and 4) than the control groups (group 1 and 2) since we found axonal growth cones formation, we also found axonal remyelination in treated group. Experimental groups also showed, greater thickness of the nerve fibers and a larger amount of myelin in the distal area of the SC as well as the new formation of axons and myelin in the combined group (group 4) compared to the group with NPP (group 3)

The functional recovery analysis, showed differences between the control and the treatments groups, while no differences more found between experimental groups, probably because the evaluation time was not enough to observed improvement in the locomotor function. In conclusion, it was shown that the combined treatment with PPN and BMSc is a favorable strategy that promotes a good permeable microenvironment for axonal regeneration and remyelination after TSCI.

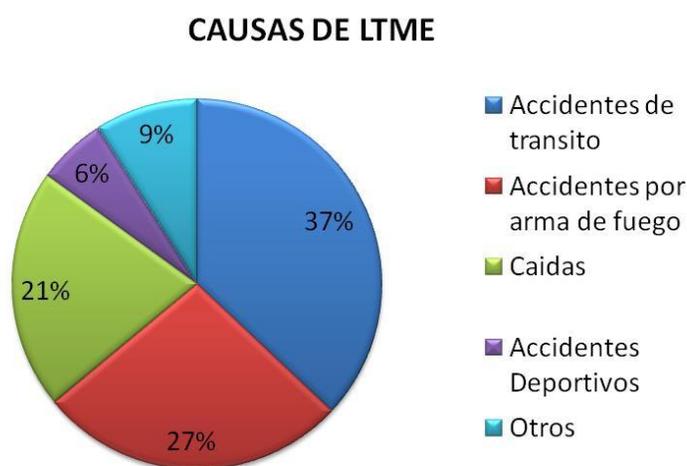
**Key words:** Traumatic spinal cord injury, bone marrow stromal cells, predegenerated peripheral nerve, axonal regeneration, axonal remyelination.

## INTRODUCCIÓN.

### *Lesión traumática de médula espinal.*

La lesión traumática de medula espinal (LTME) es una de las patologías principales que contribuyen no solo a tener consecuencias medicas, sociales y laborales en la población. La LTME es una enfermedad que provoca discapacidad permanente caracterizada por parálisis y pérdida de sensibilidad, así como múltiples alteraciones metabólicas y sistémicas asociadas a la disfunción del sistema nervioso autónomo(Guízar-Sahagún y cols., 1998).

Se ha estimado la incidencia anual de LTME alrededor del mundo entre 13 a 33 casos por millón de habitantes (Wyndaele y Wyndaele 2006)(McKinley y cols., 2007), y su prevalencia está entre 110 a 120 casos por millón de habitantes (McKinley y cols., 2006). En Estados Unidos se ha estimado una incidencia de 11 000 casos por año y en México es de 18.1 casos por millón por habitantes. El costo anual de los pacientes es alrededor de 11 millones de dólares. La población más afectada son los hombres en edad productiva (16-35 años) y las causas más comunes son:



GRÁFICA 1: CAUSAS DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL (MCKINLEY Y COLS., 2006).

Cuando ocurre una LTME se producen dos eventos importantes: Lesión primaria la cual involucra los daños mecánicos, y Lesión secundaria que involucra todos los eventos celulares, provocando así una muerte celular por apoptosis principalmente.

### ***Mecanismos de lesión primaria.***

En modelos animales se han realizado estudios sobre lesiones medulares con diferentes procesos, con el objetivo de estudiar la fisiopatología de la lesión medular. Existen diferentes modelos:

#### ***Contusión medular:***

La contusión medular es el modelo animal más utilizado en la LTME, la cual provoca disfunción motora, sensitiva y dolor neuropático. El modelo de contusión cervical ha sido poco usado ya que puede provocar efectos adversos a los animales; por lo tanto se ha realizado hemicontusiones para estudiar funciones unilaterales motoras después de una lesión de medula espinal. La contusión torácica es el modelo más utilizado la cual se realiza exponiendo la medula espinal y dejando caer sobre ella un peso determinado. Después de 2 o 3 semanas la disfunción motora es recuperada y este tiempo puede variar dependiendo de la intensidad del trauma realizado (Nakae y cols., 2011).

#### ***Sección completa y hemisección medular:***

Este modelo reproduce todos los síntomas que tienen los pacientes con LTME. La sección es producida cortando transversalmente la médula espinal con tijeras de microcirugía o bisturí, lo cual provoca una parálisis total en las extremidades (superiores o inferiores dependiendo del nivel en donde se realice). Este modelo es utilizado para probar estrategias de regeneración axonal y mejoría en la función motora. La hemisección es un modelo donde la disfunción motora es lateralizada y provoca una parálisis parcial la cual puede persistir desde los 5 días hasta las 4 semanas (Nakae y cols., 2011).

## ***Modelo fotoquímico:***

Este modelo de lesión fue desarrollado por Watson y cols., siendo el más seguro y reproducible en modelos animales. La mayor ventaja de este modelo es que produce una lesión sin inducir un trauma mecánico en la médula espinal ya que no es necesaria realizar una laminectomía. La lesión es producida cuando es usado un colorante que es activado por un laser con iones de argón el cual produce moléculas de oxígeno simple encontradas en la superficie endotelial de las vesículas de la médula espinal. Esta lesión produce una respuesta intensa plaquetaria, oclusión de las vesículas, infarto del tejido parenquimal y su patología es principalmente de origen isquémico además de producir daños motores dependiendo de la intensidad de radiación (Nakae y cols., 2011).

## ***Modelos excitotóxicos:***

Las inyecciones intramedulares o intratecales de algunas excitotoxinas como el ácido quiasílico, glutamato, N-metil-d-aspartato y ácido kaínico producen un dolor espontáneo, daño mecánico e hiperalgesia térmica en ratas. También produce muerte neuronal, formación de la cavidad quística, formación de la cicatriz astrocítica e inflamación. En este modelo el 100% de los animales desarrollan una variación de hipersensibilidad mecánica a estímulos térmicos (Nakae y cols., 2011).

## ***Compresión por clip:***

El modelo de compresión por clip es un modelo que puede reemplazar la contusión hecha por impactadores, ya que causa la lesión por medio de una presión hecha por el clip. Este tipo de lesión es utilizada principalmente en ratones y su patología es similar a la producida por un impactador en ratas (Nakae y cols., 2011).

Después de la lesión primaria, se produce como consecuencia una lesión secundaria la cual provoca mecanismos autodestructivos que dan como resultado una muerte neuronal. La

respuesta biológica de la lesión de médula espinal está dividida en tres fases: aguda (la cual se produce segundos después de la lesión), sub-aguda (la cual se produce de minutos a semanas después de la lesión) y crónica (la cual se produce de meses a años después de la lesión) (Oyinbo 2011; Acevedo González J y cols., 2008).

## ***Eventos secundarios de lesión.***

### ***Fase aguda:***

En la fase aguda se provoca un rompimiento de la barrera hematoencefálica provocando así una alteración física, bioquímica y celular. Estos cambios comienzan segundos después de la lesión y los eventos involucrados son: hipotensión, shock medular, vasoespasmo, isquemia, daño en la membrana plasmática, trastorno en la homeostasis iónica, acumulación de neurotransmisores y formación de radicales libres (Oyinbo 2011). El choque neurogénico, es producido después del traumatismo medular. Este fenómeno puede ocasionar disminución de la perfusión tisular causando una parálisis severa en las aferencias vasomotoras provocando así una alteración en arterias y venas (Acevedo González J y cols., 2008). Además ocurren lesiones vasculares que pueden originar un daño hemorrágico e isquémico en el sitio de lesión así como en zonas adyacentes (proximales y distales); este daño isquémico puede promover un daño de los capilares y vénulas debido al trauma mecánico. También se produce una hiperperfusión, la cual es originada por la reducción del potencial de hidrogeno (pH) perivascular por la acumulación de metabolitos como el lactato. Esta hiperperfusión se puede exacerbar en el sitio de lesión provocando una muerte celular por la generación de radicales libres y otros productos tóxicos (Oyinbo 2011), (Acevedo González y cols., 2008) (Figura 1).

Efecto del trasplante de células estromales de médula ósea sobre la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal.

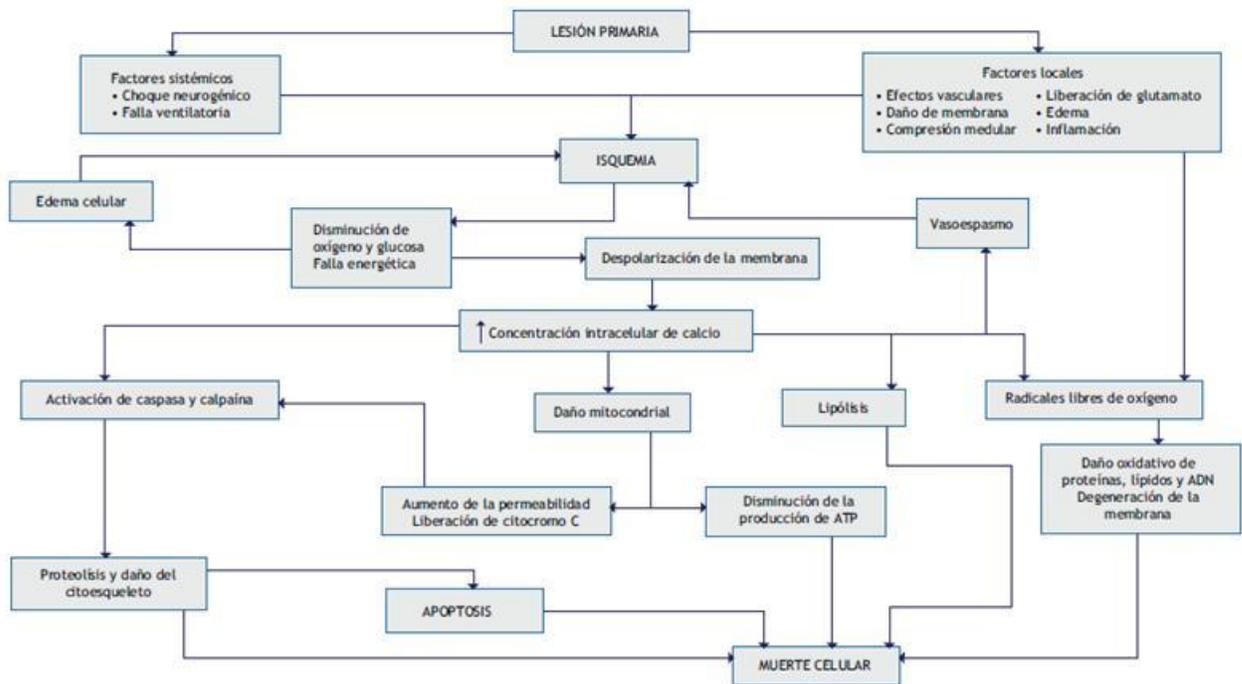


FIGURA 1. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICO DE UNA LTME. (ACEVEDO GONZÁLEZ Y COLS., 2008)

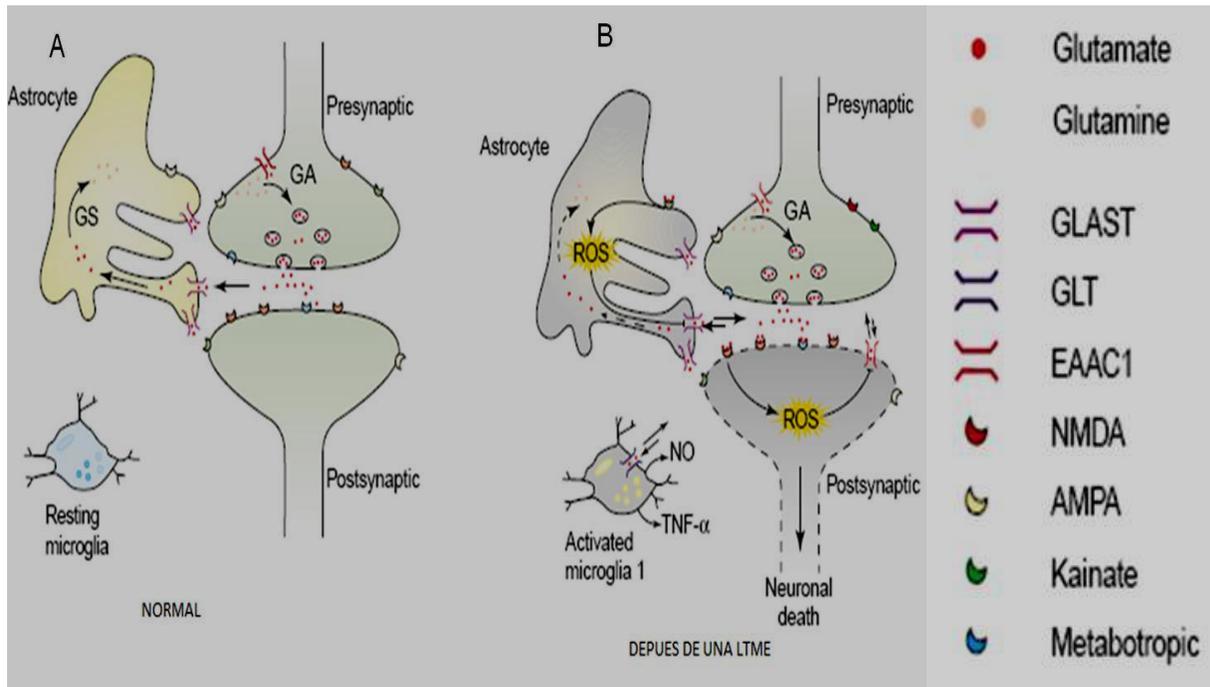
Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden desencadenar otros eventos de la cascada secundaria. En cuanto a los radicales libres derivados del oxígeno (superóxido, radicales de hidroxilo y óxido nítrico) y otros compuestos de alta energía (peroxinitritos), se producen durante la isquemia y se incrementan en la reperfusion temprana. Estos compuestos contribuyen al estrés oxidativo que empeora la lesión secundaria (Acevedo González y cols., 2008). Cuando supera al estrés oxidativo la capacidad antioxidante puede producir moléculas reactivas provocando así una oxidación de proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos.

En fases tempranas después de una LTME se produce un daño por la lipoperoxidación, por la formación de ROS y RNS; es provocada cuando los radicales libres

absorben un electrón de una molécula lipídica, tornándola menos estable, comenzando una reacción en cadena que produce lisis de la membrana y muerte celular por necrosis.

Como resultado del daño exacerbado, las funciones de la mitocondria disminuyen, contribuyendo así a un aumento del calcio intracelular, además de activar ciertas proteasas que provocan el rompimiento de las proteínas del citoesqueleto (Oyinbo 2011).

Otro fenómeno secundario que ocurre después de una lesión medular es la excitotoxicidad por glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC). El glutamato se une a sus receptores N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico (AMPA) y kainato; provocando un cambio en el flujo de canales de potasio y calcio estimulando una introducción exacerbada de  $CA^{2+}$  intracelular a la neurona y a las células gliales (astrocitos) provocando una despolarización de la membrana celular, también se activan fosfolipasas y proteasas las cuales provocan un daño a la mitocondria dando como resultado una muerte celular. Esta producción de glutamato promueve que la microglía sea activada a un fenotipo reactivo la cual produce en grandes cantidades de óxido nítrico y de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); estas especies de óxido nítrico se juntan con otros radicales libres como el anión su peróxido provocando una formación de ROS, provocando así una muerte celular en los astrocitos y la neurona pre-sináptica y favoreciendo así una desmielinización (Acevedo González y cols., 2008) (Figura 2).



**FIGURA 2. MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD POR GLUTAMATO. A): TRANSPORTE NORMAL DEL GLUTAMATO EN EL SNC. EL GLUTAMATO (CÍRCULOS ROJOS) QUE SE ENCUENTRA EN LA NEURONA PRE-SINÁPTICA ES CAPTURADO POR LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS TRANSPORTADORAS EN DONDE SON TRANSPORTADAS HACIA EL ESPACIO SINÁPTICO. YA EN EL ESPACIO SINÁPTICO EL GLUTAMATO ENTRA TANTO A LA NEURONA POST-SINÁPTICA MEDIANTE SUS 4 RECEPTORES NMDA (MEDIA LUNA ROJO), AMPA (MEDIA LUNA AMARILLA), KAINATO (MEDIA LUNA VERDE), METABOTRÓPICOS (MEDIA LUNA AZUL) Y POR EL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS 1 (EAAC1) (ROJO) PARA SU FUNCIONAMIENTO NORMAL DE LA NEURONA; TAMBIÉN ES RECAPTURADO POR EL ASTROCITO POR EL TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO/ASPARTATO (GLAST) (MORADO); DENTRO DEL ASTROCITO EL GLUTAMATO ES TRANSFORMADO EN GLUTAMINA (CÍRCULOS ROSAS) POR LA GLUTAMINA SINTETASA. LA GLUTAMINA ES TRANSPORTADA HACIA LA NEURONA PRE-SINÁPTICA EN DONDE ES HIDROLIZADA A GLUTAMATO NUEVAMENTE POR LA GLUTAMINASA (GA). B): DESPUÉS DE UN TRAUMA MEDULAR SE PRODUCE UN AUMENTO EXACERBADO DE GLUTAMATO (CÍRCULOS ROJOS) EN EL ESPACIO SINÁPTICO EL CUAL ACTIVA A LA MICROGLÍA EN UN FENOTIPO REACTIVO LA CUAL PRODUCE GRANDES CANTIDADES DE OXIDO NÍTRICO (NO) Y TNF- $\alpha$  PRODUCIENDO UNA TOXICIDAD; EN ESTAS CONDICIONES EL ASTROCITO Y LA NEURONA POST-SINÁPTICA PRODUCEN ROS PROVOCANDO UNA MUERTE CELULAR (SCHWARTZ Y COLS., 2003).**

Un evento importante de los sucesos secundarios después de una LTME es la inflamación; esta ocurre inmediatamente y puede durar semanas hasta meses después del traumatismo inicial. Las células inmunológicas pueden secretar citocinas proinflamatorias incluyendo interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) los cuales incrementan la inflamación. Este incremento puede provocar una sobre activación de la respuesta inflamatoria, produciendo un daño en el tejido sano y agrandando el daño en el sitio de la lesión (Caballero y Nieto Sampedro.,2005).

A las 24 hrs después de la lesión existe una infiltración de leucocitos y una secreción de citocinas proinflamatorias en el sitio de lesión, los neutrófilos migran al sitio de lesión y estos llegan desde la circulación por medio de las células endoteliales vasculares, las cuales ayudan como guía para que lleguen al sitio de lesión. Los neutrófilos son los encargados de remover los desechos tisulares (Caballero y Nieto Sampedro., 2005) (figura3).

Cuando la cantidad de neutrófilos decae existe un incremento de células monocíticas en el parénquima de la lesión las cuales después de 72 hrs estás se diferencian en macrófagos, los cuales ayudan también a eliminar los desechos celulares por fagocitosis. Cuando son reclutados los macrófagos, la microglía es activada por el TNF- $\alpha$  y por la unión de su ligando al receptor 3 del complemento (CR3) y sus receptores de manosa. Cuando la microglía es activada esta incrementa los niveles de ATP extracelular, formación de radicales libres y la producción de calcio intracelular (Profyris y cols., 2004)

En resumen el efecto exacerbado de la respuesta inmune puede ser modulado para que este en vez de que tenga un efecto dañino para el SNC este ayude para su reparación (figura3).

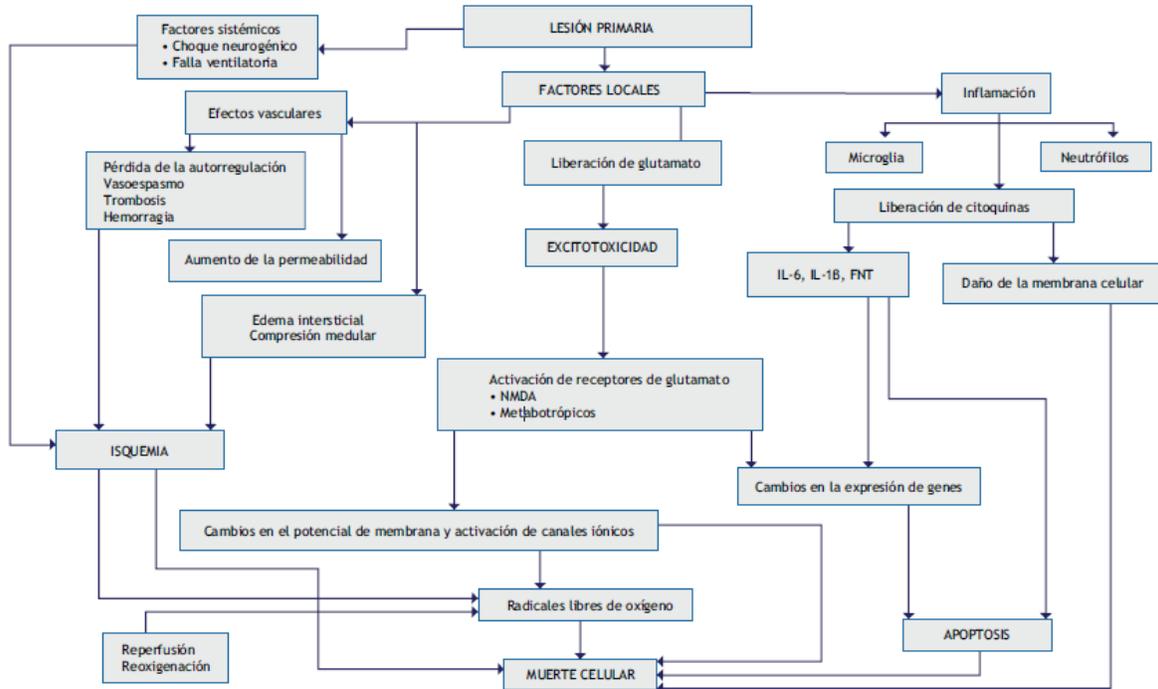


FIGURA 3. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICO DE UNA LTME. (ACEVEDO GONZÁLEZ Y COLS., 2008)

Otro efecto que se presenta es la apoptosis provocando muerte celular. Después de una LTME, la muerte celular es instantánea ya sea por necrosis, inflamación, por rompimiento de la membrana o por apoptosis.

En la apoptosis las células se condensan y se rompen en pequeños fragmentos activando diferentes vías en las cuales se requieren energía y síntesis de proteínas (Oyinbo

2011). Existen dos vías principales: la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca, después de una LTME es activada por señales extracelulares, cuyo factor más importante es el TNF  $\alpha$ ; el cual se acumula en la médula espinal lesionada activando al receptor de Fas de las neuronas, microglía y oligodendrocitos induciendo una secuencia programada de activación de caspasas involucrando a la caspasa 8 como inductora y a las caspasas 3 y 6 como efectoras. La vía intrínseca, es activada con señales intracelulares en las neuronas después de una LTME donde las altas concentraciones de calcio intracelular producen daño a la mitocondria, liberando al citocromo C, iniciando una secuencia programada alterna de activación de caspasas (Acevedo González y cols., 2008).

Otro evento importante que sucede después de una LTME, es la liberación de moléculas inhibitorias del recrecimiento axonal, estas moléculas son propias del SNC en las cuales incluyen: glicoproteína asociada a la mielina (MAG); Nogo-A y glicoproteínas asociada a la mielina de oligodendrocitos (OMgp). Estas tres proteínas están localizadas principalmente en la lamella de las vainas de mielina, donde pueden hacer contacto directo con los axones (Profyris y cols., 2004). Además de la producción de estas proteínas, se produce un colapsamiento de los conos de crecimiento. El cono de crecimiento es una estructura motora y sensorial que ayuda a que haya crecimiento de un nuevo axón, este cono de crecimiento es rico en microtúbulos, mitocondria y miosina. Cuando ocurre una LTME la síntesis de actina disminuye, y los filamentos restantes de actina empujan a la miosina, provocando así el colapsamiento de los conos de crecimiento (Profyris y cols., 2004).

Para finalizar 15 minutos después de la LTME se produce, una hinchazón en la parte periaxonal, en donde las laminas de la mielina se quedan desnudas y a las 24 hrs se produce una ruptura axonal, esta ruptura de axones está seguida por una degeneración

Walleriana la cual puede durar desde meses hasta años después de una LTME, la degeneración Walleriana provoca un daño axonal induciendo que los axones se separen de su soma en la neurona, también existe una separación de fibras, fragmentación de la mielina provocando así que los desechos celulares sean fagocitados por los macrófagos y la microglía (Profyris y cols., 2004).

### ***Fase crónica:***

La fase crónica puede durar desde meses hasta años después de una LTME. Dentro de esta fase persisten otros fenómenos, persiste la formación del quiste en la zona de lesión, sigue habiendo un infiltrado de células inmunológicas (principalmente macrófagos, linfocitos, entre otras) y también existe residuos de los axones dañados dentro del área de lesión.

## ***Estrategias para favorecer la regeneración y la función.***

La recuperación de diversas enfermedades del SNC en vertebrados está impedida por la limitada regeneración tanto de las células perdidas como del crecimiento axonal, así como por la falla en el reemplazo de la mielina dañada y en el restablecimiento de conexiones neuronales funcionales.

Se han realizado diferentes estrategias para favorecer la regeneración axonal como: Trasplante de tejidos y trasplante de Células.

## ***Trasplante de tejidos.***

Considerando que los axones del SNC crecen libremente en la etapa del desarrollo no solo se han realizado trasplantes de tejido de medula espinal fetal para remplazar las neuronas dañadas; si no que también se han utilizado como puentes para la regeneración axonal (Rodríguez y cols., 2004) considerando que pueden secretar factores de crecimiento y pueden actuar como puentes para la regeneración axonal. Coumans y cols realizaron implantes de tejido fetal en un modelo de sección completa para lograr una reconexión sináptica y poder mejorar la función locomotora (Coumans y cols., 2001).

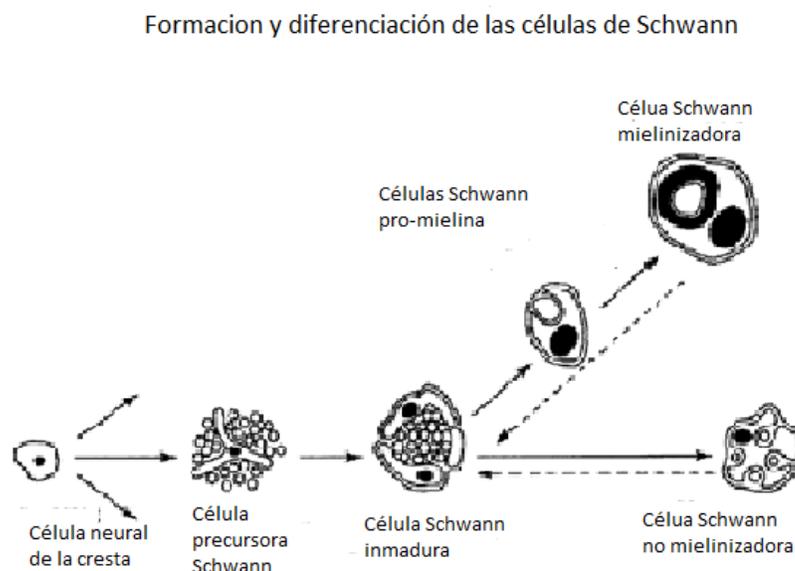
De acuerdo a la revisión hecha recientemente los implante en animales neonatos con este modelo de lesión si lograban una diferencia significativa tanto en la regeneración axonal como en la mejoría de la función locomotora, pero al compararlo con lo encontrado en animales adultos no se observó mejoría funcional (Rodríguez y cols., 2004).

## ***Trasplante de células.***

El termino terapia celular (TC) se refiere a cualquier tipo de estrategia que utiliza células como agente terapéutico. El trasplante neural ha sido usado para reparar la ME lesionada tanto en la fase aguda como en la crónica. El uso de trasplantes celulares se ha presentado como una alternativa positiva para la regeneración axonal. Se ha utilizado diferentes tipos celulares como: trasplantes de células de Schwann, trasplante con células envoltentes de glía olfatoria (OEG) y trasplantes de células estromales de medula ósea (CEMO).

## ***Trasplantes con células de Schwann.***

En el sistema nervioso periférico (SNP) a diferencia del SNC la regeneración es eficaz gracias a la presencia de las células de Schwann (Cs). La mayoría de las Cs son originadas de la cresta neural. Existen dos tipos de células conocidas en la generación de las Cs; las primeras son las células Cs progenitoras y las Cs inmaduras; las células Cs inmaduras comienzan a diferenciarse en dos tipos celulares: primero las Cs pro-mielina que a su vez se diferenciarán en Cs mielinizadoras alcanzando una relación 1:1 con los axones y segundo tipo son las Cs no mielinizadoras (Mirsky y cols., 2002)(Figura 4).



**FIGURA 4.** FORMACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN. DE LAS CÉLULAS NEURALES DE LA CRESTA SE PUEDEN FORMAR VARIOS TIPOS CELULARES, DENTRO DE ELLAS ESTÁ SE PUEDE DIFERENCIAR EN CÉLULAS PRECURSORAS DE CÉLULAS DE SCHWANN; ESTAS A SU VEZ FORMAN A LAS CÉLULAS DE SCHWANN INMADURAS. CON EL PASO DEL TIEMPO, ESTÁ CÉLULA SE DIVIDIR EN DOS TIPOS CELULARES, 1: EN UNA CÉLULA PRO-MIELINIZADORA QUE CUANDO MADURA SE FORMA LA CÉLULA DE SCHWANN MIELINIZADORA; 2: TAMBIÉN SE PUEDE FORMAR UNA CÉLULA DE SCHWANN NO MIELIONIZADORA. (MIRSKY Y COLS., 2002)

Las Cs se han utilizado para realizar trasplantes en diferentes modelos animales ya que son capaces de: fagocitar los desechos celulares, producen factores tróficos necesarios para la supervivencia de la neurona especialmente Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neurotrofina 4/5 (NT4/5), pueden secretar matrices celulares de moléculas inhibitorias que ayudan al recrecimiento axonal y pueden producir capas de mielina para envolver a los axones desnudos y aumentar la velocidad de impulso de las células nerviosas para mejorar su funcionamiento (Rodriguez y cols., 2004).

Corinne Bachelin y cols demostraron que el autotrasplante de Cs cultivadas in vitro en un modelo de sección en primates no humanos (PNH) no perdían su efecto potencial para diferenciarse hacia Cs mielinizadoras; también observaron que solo las Cs ayudaron a remielinizar a los axones en una fase aguda en los animales tratados (Bachelin y cols., 2005).

Otro modelo utilizado, son los roedores en donde se ha demostrado que los implantes de Cs favorecen la remielinización y como consecuencia la mejoría de las funciones motoras en lesiones por contusión y sección completa (M Zurita y cols., 2007), (Guest y cols., 1997). También se ha demostrado que combinación con otros materiales pueden ayudar como guía para el recrecimiento axonal después de una LTME (Oudega y cols., 2006), (Xu y cols., 1997).

### ***Trasplante con células envolventes de glía olfatoria (OEG).***

La OEG es un tipo de célula glial que está presente en el sistema olfatorio de los mamíferos adultos. Se ha demostrado tanto en lesiones agudas como crónicas que las OEG tienen la capacidad de promover la regeneración axonal, que ayudan a restaurar la conducción axonal después de una LTME (Lim y cols., 2007).

Ramon-Cueto y cols; demostraron que las OEG ayudaban al recrecimiento de axones sensoriales después de una lesión medular(Ramón-Cueto y cols., 1998); Doucette`s y cols; describieron la sobrevivencia del las OEG después de haberlas trasplantado en cerebro ( Doucette y cols.,1996). Raisman`s y cols., demostraron la capacidad que tenían las OEG para mejorar la función locomotora después de una lesión en el tracto corticoespinal de la medula espinal (Li y cols., 1997).

Se ha dicho que las OEG pueden tener propiedades parecidas de las células de Schwann y de los astrocitos, los cuales las hacen únicas. Este tipo celular tiene dos importantes beneficios: pueden existir tanto dentro como fuera del sistema nervioso central y pueden estar en constante neurogenesis produciendo neuronas sensitivas tanto en etapas embrionarias como en etapas adultas en mamíferos (Mackay-sim 2005).

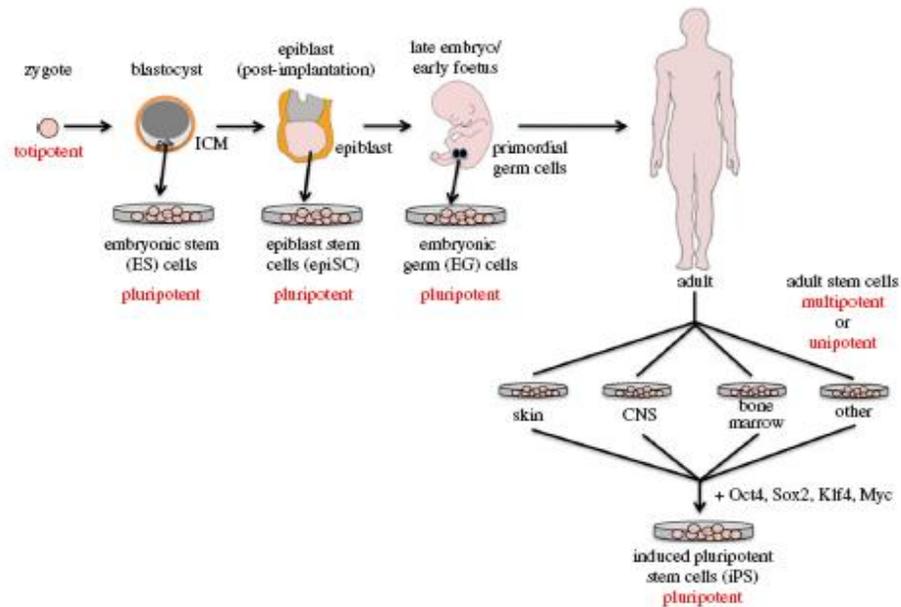
## ***Trasplante de células troncales.***

Las células troncales son un tipo un grupo de células que se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y por responder a señales o estímulos generados en el microambiente donde ese encuentran para poder diferenciarse hacia distintos linajes celulares con características especializadas. Se pueden clasificar de dos maneras (Reina y cols.,2007):

1. Según el tejido de origen en células embrionarias o adultas.
2. Según el potencial de diferenciación se pueden clasificar en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

Las células totipotenciales son aquellas células capaces de dar origen a un organismo completo y a un tejido extraembrionario. Las células troncales pluripotenciales son capaces de producir todos los tipos celulares presentes en un organismo superior incluyendo la línea germinal; dentro de las células pluripotenciales podemos encontrar 3 diferentes tipos: las células embriológicas (ES), células troncales derivadas del epiblasto

(epiSC) y células embriológicas germinales (CEG). Estas células poseen varias características en común marcadores moleculares (isoenzima de la fosfatasa alcalina; factor de transcripción Oct4, alta actividad de la telomerasa) y marcadores de membrana reconocidos por anticuerpos monoclonales (Giraldo y cols., 2003).



**FIGURA 5.** ORIGEN DE LAS CÉLULAS TRONCALES. LAS CÉLULAS MADRE SE PUEDEN DIVIDIR EN CUATRO TIPOS; LAS TOTIPOTENCIALES PROVENIENTES DEL ZIGOTO Y SON LAS CUALES PUEDEN ORIGINAR TODO UN ORGANISMO; LAS CÉLULAS PLURIPOTENCIALES LAS CUALES PUEDEN FORMAR LAS CÉLULAS DE LAS TRES CAPAS ECTODÉRMICAS. Y EN UN ADULTO PODEMOS ENCONTRAR CÉLULAS MADRE LLAMADAS MULTIPOTENCIALES O UNIPOTENCIALES, LAS CUALES SE PUEDEN DIFERENCIAR EN DIFERENTES TIPOS CELULARES DE TEJIDO ADULTO (WATT Y DRISKELL 2010).

Otra línea o células mesenquimales descritas recientemente son las células multipotenciales, son células de morfología fibroblastoide. Son capaces de proliferar indefinidamente in vitro, son derivadas de la médula ósea y tienen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares como fibroblastos; células reticulares; adipocitos; osteoblastos; condrocitos y células nerviosas. Este tipo celular también se conocen como: Células del estroma medular, unidades formadoras de colonias fibroblastoides, precursores estromales o células adultas progenitoras multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells). En el 2006 la sociedad internacional de terapia celular

(International Society Cellular Therapy, ISCT), propuso cinco criterios para definir a las células mesenquimales: deben de ser adherentes en cultivo, expresar los antígenos (CD73, CD90 y CD105) pero no los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos, linfocitos B, ser capaces de diferenciarse in vitro, realizar procesos de auto-renovación (que una célula hija sea capaz de llevar a cabo procesos de diferenciación) y desarrollar plasticidad o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo (Andrea y cols., 2007; Dominici y cols., 2006).

Finalmente, las células unipotenciales, tienen un menor potencial de diferenciación como las células tallo epidérmicas, encontradas en la capa basal de la piel.

La base de la terapia celular en el sistema nervioso puede estar sustentado en cuatro estrategias: neuroprotección, promoción de un sustrato permisivo para la regeneración, remplazo de células neurales (oligodendrocitos, astrocitos y neuronas) y reconstrucción de estructuras y remielinización funcional de axones (oligodendrocitos).

Las células estromales son una de esas alternativas para el tratamiento experimental de una lesión de medula espinal (contusiones, secciones completas o isquemia). Las CEMO han (células estromales de médula ósea) han demostrado regeneración axonal y mejoría en la función locomotora; (Wu y cols., 2003; Neuhuber y cols., 2005; Ohta y cols., 2004) (P Lu, Jones, y Tuszynski., 2005). También tienen la capacidad de formar paquetes de células que sirven como puente en el epicentro de la LTME (Hofstetter y cols., 2002a; Wu y cols., 2003; X. Chen y cols., 2011; Gu y cols., 2010), y pueden diferenciarse tanto in vitro como in vivo en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y microglía (Chopp y cols., 2000; Woodbury y cols., 2000).

Vaquero y colaboradores han observado que después de una LTME, el utilizar las CEMO y células de Schwann como terapia, beneficiaba no solo porque observaban una regeneración axonal, sino que también a diferentes tiempos (hasta 9 meses con

trasplante) los animales con contusiones severas, llegaban a recuperar la función locomotora (con una puntuación de 16 en la escala de BBB) (Vaquero y cols., 2011; Zurita y cols., 2004; Zurita y cols., 2007; Vaquero y cols., 2009; Vaquero y cols., 2006; Zurita y cols., 2008; Chiba y cols., 2009). Otros estudios han demostrado que las CEMO dan cambios positivos al ser utilizadas en enfermedades o daño al sistema nervioso, al secretar factores de crecimiento como factor de crecimiento de neural (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); también pueden secretar citocinas como: interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) factores de células stem, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP), factor estimulante de colonias (CSF) y factor derivado de células estromales (SDF-1) (P Lu, Jones, y Tuszynski 2005; Chen y cols., 2008); promueven angiogénesis (Chen y cols., 2008), proliferar después de haberlas trasplantado (Chen y cols., 2008), ayudan a la supervivencia neuronal y disminuyen la apoptosis.

Otra función importante es el efecto inmunomodulador que tienen las CEMO, evidenciado al inhibir la proliferación de la interleucina 2 (IL-2), o la interleucina 5 (IL-5) cuando es estimulada por las células natural killers (NK). En roedores como en humanos, las CEMO son capaces de disminuir la regulación de ciertos receptores de quimiocinas (CXCR4, CXCR5 y CCR7) que inhiben la diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas (Trento y cols., 2010), todo lo cual disminuye el efecto de inflamación y daño después de una LTME.

Además de las terapias celulares se han realizado otras estrategias para favorecer la regeneración axonal como el uso de sustancias promotoras de la regeneración y el uso de puentes de nervio periférico.

## ***Estrategias para favorecer el recrecimiento axonal a través de puentes.***

Se han utilizado diferentes tipos de factores de crecimiento en diferentes tipos de lesión para la regeneración axonal, debido que ayudan a la supervivencia neuronal, modulan el recrecimiento axonal y la plasticidad sináptica y ayudan a la neurotransmisión. Dentro de los factores utilizados se encuentran el factor de crecimiento neural (NGF), el cual se observó que al inyectar continuamente este factor (exógenamente) después de una LTME promovía el crecimiento de axones principalmente sensitivos (Jones y cols., 2001); El BDNF inyectado después de una LTME favorece el recrecimiento de axones motores en el epicentro de la lesión (Jin y cols., 2002; Xiao y cols., 2009); el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) estimula el recrecimiento axonal (Bregman y cols., 2002; Lacroix y Tuszynski., 2000) y las inyecciones de NT-3 después de una LTME aguda, promueve la regeneración de axones motores (Jin y cols., 2002; Tobias y cols., 2003). Estas estrategias se aplicaron mediante con inyecciones exógenas, desafortunadamente no mostraron mejoría en la función locomotora (Tobias y cols., 2003; Taylor y cols., 2006; Jones y cols., 2001).

Además de los factores neurotróficos se han utilizado otros biomateriales como los polímeros, matrices como el fibrin glue y sustancias como la condroitinasa ABC. El uso del fibrin glue ha resultado una estrategia favorable, ya que es un biomaterial compatible para el SNC y el SNP, en diferentes modelos de lesión, demostrando que promueve el recrecimiento axonal y puede actuar como matriz en combinación con diferentes tipos celulares para promover la regeneración axonal (Shepherd 1994; Grayeli y cols., 2005; Menovsky y Beek 2001). Los polímeros se han utilizado como estrategia para favorecer el recrecimiento axonal; en contusiones y en secciones completas se ha observado que

promueven la regeneración axonal y la refuncionalización, ya que estos originan un ambiente permisivo para la regeneración en el sitio de la lesión (Gang y cols., 2010; Olson y cols., 2009; Harvey 2007; Bakshi y cols., 2004). Por otro lado, el uso la condroitinasa ABC después de una LTME, y en combinación con puentes de nervio periférico, han demostrado que favorece el recrecimiento axonal, debido que la condroitinasa ABC inhibe ciertas proteínas que son formadoras de la cicatriz fibroglial, permitiendo así un recrecimiento axonal positivo dentro del epicentro de la lesión (Slovinská, Novotná, y Cížková 2011; Jefferson, Tester, y Howland 2011; Houle y cols., 2006; Tom y cols., 2009).

### ***Injertos de nervio periférico:***

Se ha utilizado trasplantes de nervio periférico predegenerado (NPP) como puente para favorecer la regeneración axonal y la refuncionalización. El NPP tiene beneficios positivos para la recuperación del SNC después de un LTME como son: actúa como neuroprotector en la médula después de haberlo trasplantado (Guizar-Sahagun y cols., 1994), ayuda como guía para que los axones crezcan a través del nervio y se puedan conectar con los axones tanto proximales como distales (Tom y cols., 2009; Côté y cols., 2011a; Houle y cols., 2006; Evans 2001) y las células de Schwann y macrófagos que se encuentran en los NPP favorecen el recrecimiento y remielinización axonal, por los factores de crecimiento secretados por estas células (Xu y cols., 1997; Siironen y cols., 1994; CHIU 1988; Guest y cols., 1997; Bouhy y cols., 2006; Oudega y cols., 2005; Oudega y cols., 2006).

Todas la terapias anteriormente señaladas han demostrado ser una vía positiva para el recrecimiento axonal y refuncionalización del SNC en mamíferos después de haber sufrido una LTME, aunque no se conoce hasta el momento cual de todas podría restablecer el funcionamiento total por si misma, por lo que el uso en conjunto de algunas de ellas se lograra un mayor beneficio para mejorar la funcionalidad de la LTME.

## ***JUSTIFICACIÓN.***

La investigación biomédica se ha enfocado en los últimos años a la LTME tardía y crónica. Ha sido demostrado en modelos de LTME con sección parcial o total, la estimulación de la regeneración del tracto corticoespinal después de trasplantar NPP dentro de una cavidad, la sobrevida y regeneración de neuronas rubroespinales un año después de la LTME. Los puentes de nervio periférico predegenerado han permitido recrecimiento axonal a través de su longitud, remielinización de los axones centrales y emisión de colaterales dentro de la ME lesionada del hospedero.

Aunque se ha observado regeneración, remielinización y emisiones colaterales, el trasplante de nervio periférico predegenerado ha sido insuficiente por si solo para permitir la recuperación funcional. Por lo tanto en este proyecto de investigación se busca la asociación del trasplante del NPP con células estromales de médula ósea con el objetivo de promover la regeneración axonal y recuperación funcional secundaria.

## ***PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.***

1. Las CEMO injertadas rostral y caudalmente al sitio de lesión de medula espinal con sección completa de ratas con LTME crónica ¿permitirán recrecimiento axonal adicional al obtenido únicamente con nervio periférico predegenerado trasplantado en la zona de lesión?
2. Las CEMO injertadas rostral y caudalmente al sitio de lesión de medula espinal con sección completa de ratas con LTME crónica, ¿mejoraran la función locomotora comparada con las trasplantadas únicamente con nervio periférico predegenerado?
3. Las CEMO injertadas rostral y caudalmente al sitio de lesión de medula espinal con sección completa de ratas con LTME crónica ¿permitirán la remielinización axonal adicional al obtenido únicamente con nervio periférico predegenerado trasplantado en la zona de lesión?

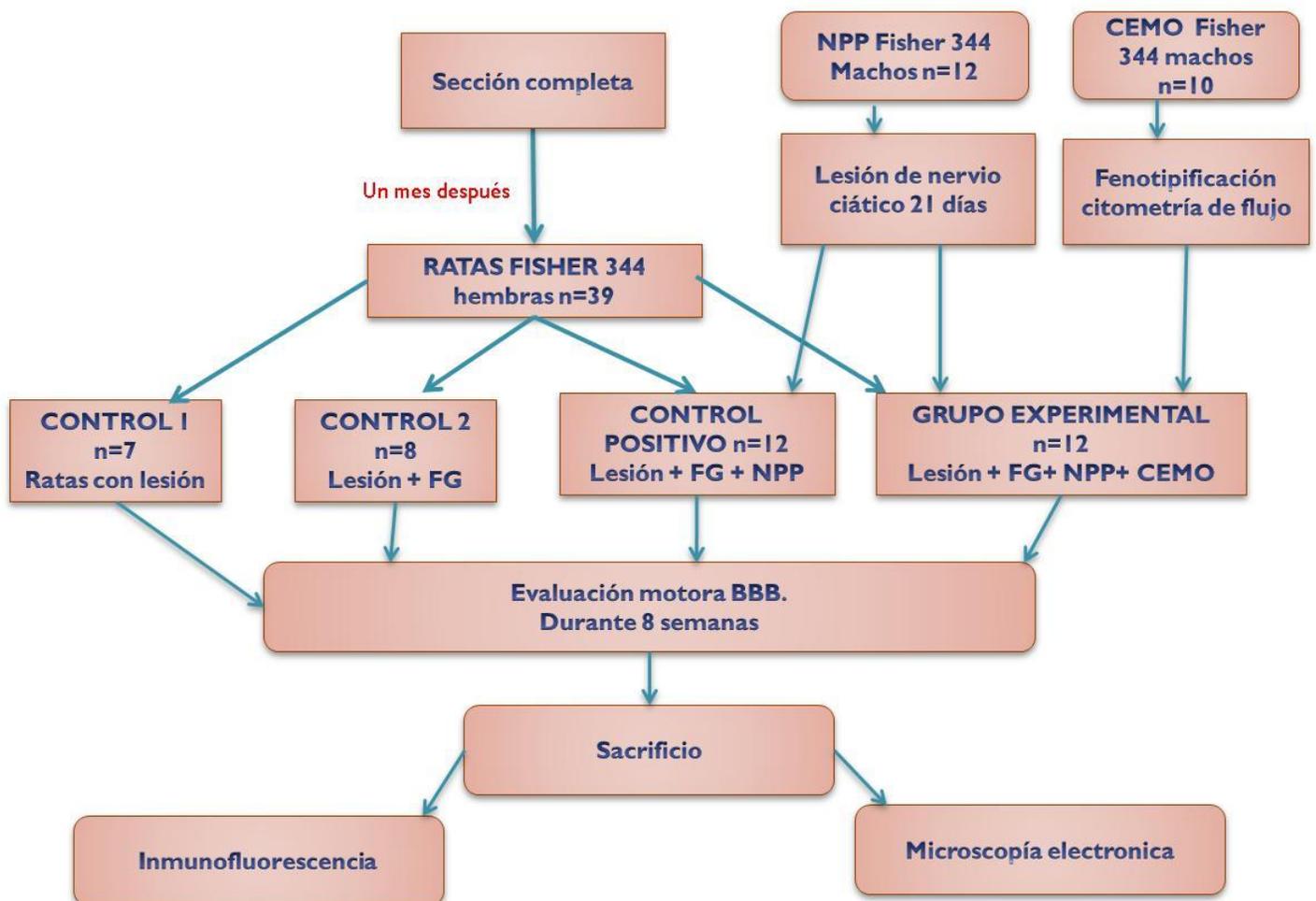
## ***HIPÓTESIS.***

Las CEMO injertadas rostral y caudalmente al sitio de lesión de médula espinal con sección completa de ratas con LTME crónica, permitirá recrecimiento axonal adicional tanto proximal como distal comparado con las ratas injertadas únicamente con nervio periférico predegenerado, y por lo consiguiente se esperará mayor mejoría en la función locomotora.

## ***OBJETIVOS.***

- ❖ Evaluar el recrecimiento axonal obtenido con las CEMO trasplantadas rostral y caudal al sitio de lesión de ME con sección completa en ratas con LTME crónica y compararlo al obtenido únicamente con nervio periférico predegenerado trasplantado a la zona de lesión.
- ❖ Evaluar la remielinización axonal obtenido con las CEMO trasplantadas rostral y caudal al sitio de lesión de ME con sección completa en ratas con LTME crónica y compararlo al obtenido únicamente con nervio periférico predegenerado trasplantado a la zona de lesión.
- ❖ Evaluar la función locomotora del tren posterior obtenido con las CEMO trasplantadas rostral y caudal al sitio de lesión de ME con sección completa en ratas con LTME crónica y compararlas con el obtenido únicamente con nervio periférico predegenerado trasplantado en la zona de lesión.

## ***DISEÑO EXPERIMENTAL.***



**FIGURA 6.** DISEÑO EXPERIMENTAL.

## ***METODOLOGÍA.***

### ***Cultivo celular:***

Las células estromales de médula ósea se obtuvieron de ratas donadores machos adultos Fisher 344, con un peso de 220-250g. Se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico 1ml intraperitoneal (i.p.). Con material quirúrgico estéril se disecaron las 2 extremidades inferiores del animal (Tibias y Fémures) y se limpiaron los huesos quitándole la piel y el músculo para evitar contaminar la extracción de células. Con unas tijeras finas el hueso se corto sagitalmente, para la extracción de la médula ósea se utilizó una micropipeta de 200  $\mu$ l y esta se deposito en un tubo cónico de 15 ml con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle MEM®). Ya que se obtuvo la médula ósea, está se centrifugo a  $-4^{\circ}\text{C}$  a 15000 rpm durante 5 minutos para obtener una mezcla homogénea. Ya obtenida la mezcla, se decanto el sobrenadante del tubo y se resuspendió nuevamente la pastilla que se forma con 5ml de MEM por las paredes del tubo para evitar el rompimiento de las células. La médula ósea se separó por medio del gradiente de Ficol (3ml) centrifugando la muestra a  $24^{\circ}\text{C}$  a 2000 rpm durante 30 minutos con paro lento, esto para que las células se puedan separar y podamos obtener una mezcla lechosa homogénea de células estromales. Después de los 30 minutos; con una pipeta de 2ml se retiro todo el medio de cultivo, y en un tubo cónico limpio de 15 ml se le agrego 5 ml de MEM en donde se agregaron las células obtenidas, la muestra es nuevamente centrifugada a  $-4^{\circ}\text{C}$  a 15000 rpm durante 10 minutos. Después se decanto ese medio y se resuspendió con medio nuevo la pastilla por las paredes con delicadeza para evitar que las células se rompan. Se cuantifico el total de células obtenidas por medio de la cámara de Neubauer, y  $9 \times 10^6$  células nucleadas se sembraran en un frasco de cultivo de  $75\text{cm}^2$  (en 5ml de MEM con 20% de suero fetal bovino (FSB), 1ml de L-glutamina, 5ml de HEPES y 1ml de Penicilina Estreptomicina) las cuales se pusieron a crecer a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora water-jacketed con  $\text{CO}_2$  al 5% por dos pasajes, durante una semana.

La primera semana las CEMOS se diferenciaron a fibroblastos para formar una monocapa homogénea en el frasco de cultivo, después de la formación esta capa homogénea de fibroblastos se sembraron nuevamente células ( $9 \times 10^6$ ) con la finalidad de mantener estas nuevas células una semana en cultivo primario por flotación.

### ***Citometría de Flujo:***

Después de realizar el cultivo las células se extrajeron para realizar la fenotipificación de estas mediante Citometría de flujo. Al obtener las células estas se centrifugaron a 1500rpm durante cinco minutos, después de la centrifugación la células fueron teñidas con el anticuerpo primario (Cd117 Millipore; Cd13 santa cruz dilución 1:100) durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Después se les realiza 2 lavados con Fack's Buffer; las células se vuelven a centrifugar a 1500rpm durante cinco minutos; se decantan y se incuban con el anticuerpo secundario (si es necesario Alexa 488 0 586 1:200) durante dos horas en oscuridad. Al terminar las incubaciones las células se vuelven a lavar con el buffer y se centrifugan a 1500 rpm nuevamente se decanta el sobrenadante y se fijan las células con paraformaldehído al 4% durante 1 hora. Al finalizar la fijación las células se pueden cuantificar con el citometro y para analizar la población celular se utiliza un programa Cell Quest-Pro.

### ***Procedimientos quirúrgicos:***

Sección de ME, predegeneración de nervio periférico, trasplante. Se utilizaron ratas hembras adultas Fisher 344 (8-10 semanas de edad, 200-220 g) en los tres procedimientos quirúrgicos. Bajo anestesia con ketamina 70 mg/kg y Xilazina (10 mg/kg) todas las ratas se sometieron a sección completa de la ME a nivel T9. Después de la laminectomía y bajo visión en microscopio quirúrgico, la duramadre se abrió longitudinalmente sobre la línea media (6mm) de longitud y la ME se corto axialmente con

tijeras de microcirugía. Posteriormente de suprimir el sangrado la sección de ME se inspecciono para asegurarse de que la lesión haya sido completa, se secciono la pia aracnoides de la porción anterior de la ME seccionada identificando los dos cabos de la me completamente separados. A continuación, se cerró la duramadre con un punto (nylon nueve ceros), y un fragmento de tejido adiposo subcutáneo se colocó sobre la dura madre en lo posible la formación de la cicatriz de tejido fibroconectivo. El musculo y la piel se cerraron en capas. Después de la cirugía se inyectó 2 ml de solución salina isotónica intraperitoneal para prevenir la deshidratación. Se les dio enrofloxacina (1ml) VO en el agua para beber los primeros ocho días después de la cirugía como profiláctico. También se les administro paracetamol (0.2ml) VO como analgésico. El alimento se les colocó sobre el piso de la caja add livitum. La vejiga fue vaciada manualmente 2 veces por día cuanto fuera necesario.

Veintiún días antes de la cirugía del trasplante, en la porción medial y posterior de los muslos de las ratas donadoras (machos Fisher 344) se prepararon asépticamente. Se hizo una incisión longitudinal y disección por planos para identificar el nervio ciático, el que fue cortado transversalmente en la porción cefálica del muslo. El extremo fue fijado con un punto de nylon cinco ceros al musculo adyacente. El día de la cirugía del trasplante, se reabrió la zona operada para identificar el extremo proximal seccionado del nervio ciático disecándose 2cm de longitud. El segmento se cortó y colocó en solución salina isotónica helada, en donde se mantuvo hasta el momento del trasplante.

La incisión dorsal previa se abrió y la cicatriz fue removida cuidadosamente principalmente cerca de la dura madre. Después de identificar la incisión dural previa, esta fue reabierto longitudinalmente. La ME lesionada fue expuesta cuidadosamente para identificar la zona de la cicatriz con una longitud aproximada de 3 a 4 mm. La ME macroscópicamente normal fue cortada 1 mm rostral y caudal a los bordes de la cicatriz. El sangrado se cohibió con un fragmento de Gelfoam impregnado de solución salina colocado en el espacio dejado por los muñones. Las ratas fueron asignadas a los grupos en

estudio el día de la cirugía para trasplante conformando los 4 grupos ya mencionados en el diseño experimental y asignado aleatoriamente.

A las ratas del grupo experimental, además de trasplantarle el NPP se les realizaron 2 inyecciones con 5  $\mu$ l cada una de medio conteniendo  $3 \times 10^4$  CEMO a cada lado de la ME parasagitalmente con profundidad de 2 mm tanto rostral o caudal al borde del muñón respectivo.

Los animales del grupo 3 se les injerto nervio periférico predegenerado el cual fue cortado como ya se comento anteriormente para llenar el hueco entre los dos muñones (aproximadamente de 5 A 6 mm de longitud). En el grupo 2 control negativo se lleno con Fibrin Glue. El grupo 1 se procedió a cerrar la dura madre sin manipular la ME. Para finalizar en todos los grupos se coloco Durafilm por fuera de la Dura Madre sobre la ME y los injertos.

### ***Análisis funcional:***

Se utilizo la escala BBB para evaluar la función motora del tren posterior de los animales con LTME. La calificación de la escala oscila entre cero y 21 puntos donde el grado 0 representa la ausencia de movimiento y el grado 21 una marcha normal.

El evaluador de la prueba funcional estuvo cegado al tratamiento al cual los animales pertenecían con el fin de ver la tendencia de reparación función todos los animales se evaluaron a los 8, 15, 35 y 45 días después de la segunda cirugía (con y sin trasplantes).

### ***Inmunofluorescencia con Cd113:***

En algunas laminillas se realizó la detección de las CEMOS con el marcador Cd13 (Marcador específico para células mesenquimales). Las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario Cd13 (1:200 santa cruz) durante 24 horas, después de la incubación las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:200 santa cruz) durante 4 horas. Después de la incubación se lavaron con PBS y se contra tiñeron con Ioduro de Propidio (I.P) durante 1 minuto y se montaron con VectaShield.

## ***Técnica histológica***

### ***Método de Kluver- Barrera:***

En algunas de las laminillas obtenidas se les realizó el método de tinción de Kluver-Barrera; estas se hidrataron con alcohol al 95%; después se les agregó el colorante Luxo Fast Blue a 37°C durante toda la noche. Estas se lavan con alcohol al 95% para quitar el exceso del colorante y después se enjuagan con agua destilada; después se realizan lavados con Carbonato de litio y se enjuagan con alcohol al 70% y con agua destilada; las laminillas se vuelven a contrastar con cristal violeta durante 6 minutos y después se enjuagan con alcohol al 95% y se deshidratan con alcohol absoluto, para finalizar se montan las laminillas.

### ***Inmunofluorescencia con Neurofilamento:***

En algunas de las laminillas de la medula espinal se les realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo Neurofilamento. Primero las laminillas se hidrataron con PBS durante 5 minutos, después de la hidratación se puso la laminilla en una cámara húmeda en la cual se les agrego suero normal concentrado (1:200) durante 30 minutos; después de la incubación se realizo dos lavados con PBS y se pusieron a incubar con el anticuerpo primario Neurofilamento (1:200 santa cruz) durante 48 hr. Después del tiempo de incubación las laminillas se lavaron con PBS (2 lavados) y se pusieron a incubar con el anticuerpo secundario (Alexa 586 1:200) durante 6 hr. Al término de la incubación las laminillas se enjuagaron con PBS y se contrastaron con Hess durante 1 minuto y se volvieron a enjuagar con PBS. Para finalizar las laminillas se montaron con Vecta shield.

### ***Inmunofluorescencia con GAP-43, Neuritin y PBM:***

Se analizó la regeneración axonal mediante la expresión de las proteínas Neuritin; GAP 43 y la remielinización con Proteína Básica de la Mielina (PBM) por medio de inmunofluorescencia. Todos los animales se anestesiaron y perfundieron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4; se realizaron cortes longitudinales en criostato de 12 $\mu$ m de espesor y se montaron en laminillas. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se rehidrataron con PBS durante 10 minutos. Después, se incubaron con suero normal concentrado durante 30 minutos; se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primario policlonales (PBM D18; Neuritin FI-142 y Gap43 H-100 santa cruz) durante 48hr a 4°C. Después de los dos días de incubación se lavaron las laminillas con PBS y se pusieron a incubar con el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti rabbit ó Anti-Mouse santa cruz) durante 6hr; después se

lavarón con PBS para quitar el exceso de anticuerpo secundario. Entonces, las laminillas se contrastaron con Ioduro de Propidio (IP) durante 12 segundos y se montaron con vectashiell (vector). Una vez terminado con todo el proceso se les tomó fotografías en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss. Finalmente las imágenes fueron analizadas con un programa Image Pro-Plus 5.1.

### ***Análisis de imágenes:***

Con el programa Image Pro-Plus 5.1 se analizó las imágenes obtenidas realizando la cuantificación del índice de fluorescencia de los objetos brillantes de color verde (positivos para los tres diferentes marcadores PBM, GAP-43 y Neuritin); la cuantificación del índice de fluorescencia en píxeles se realizó tanto en la zona proximal y distal tomando en cuenta a la zona de trasplante. Al término de la cuantificación se realizó las diferentes pruebas estadísticas que se mencionan a continuación

### ***Morfología microscopía electrónica:***

Por medio de microscopía electrónica se analizó la mielinización axonal del sitio del trasplante, tanto a nivel proximal como distalmente.

Se utilizaron tres animales de cada grupo, los cuales se perfundieron con fijador de Karnovsky (glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en solución de Sorens) y después de la obtención del tejido se posfijaron en la misma solución 4 hrs a 4 °C; después se posfijaron en tetraóxido de osmio al 1% durante 45 minutos a temperatura ambiente. El exceso del tetraóxido de osmio se quitó mediante dos lavados con agua destilada de dos minutos cada uno. Se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente (50%, 70%, 95% y 100%) hasta óxido de propileno. Después de la deshidratación, el tejido se incluyó en resina sintética de aradita entre 60 O 70°C durante varias horas. Ya realizado

los bloques se hicieron cortes semifinos para localizar la zona a evaluar y posteriormente cortes finos para ser montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranilo y plomo. Los cortes fueron analizados con el microscopio electrónico de transmisión LEO 906 E para la toma de imágenes.

### ***Doble marcaje con S-100 y Cd117:***

En algunas laminillas se realizó una técnica de doble marcaje con inmunofluorescencia para observar la interacción de las CEMOS con las células de Schwann; se utilizaron anticuerpos primarios específicos (S-100 para células de Schwann 1:200; santa cruz) y (Cd117 para CEMOS 1:200; millipore); el procedimiento de las células es el mismo que fue descrito en la metodología; después de realizar la incubación de los anticuerpos primarios durante 24 horas, las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Alexa 488 y 586 1:200 santa cruz) durante 6 horas, después de la incubación se lavan nuevamente con PBS y se montan con Vectashield.

### ***Estadística:***

Para el análisis descriptivo se utilizó un programa estadístico Graph Prism 4.0 con el cual se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión, así como tablas y graficas. Para el análisis inferencial se utilizó la prueba ANOVA no paramétrica de análisis por rangos de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre grupos, seguida por la prueba U de Mann-Whitney para identificar entre cuales grupos existió la diferencia. Se considero estadísticamente significativa con una  $p > 0.05$ .

### ***Consideraciones éticas:***

Para la realización de este proyecto se tomo en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general en materia de investigación para la salud. (Titulo séptimo de la investigación que incluye la utilización de animales para experimentación), y por las normas oficiales mexicanas NOM-029-ZOO-1995, NOM-033-ZOO-1995, NOM-062-ZOO-1999 b.

## ***RESULTADOS.***

### ***Caracterización de las células trasplantadas:***

Para verificar que las células trasplantadas fueran células estromales de médula ósea adultas e indiferenciadas, se realizó una fenotipificación mediante citometría de flujo utilizando tres marcadores Cd13, Cd117 (marcadores específicos para células Mesenquimales adultas) y Cd34 (marcador control específico para células hematopoyéticas embrionarias). Estas fueron analizadas con el programa Cell Quest Pro; en los resultados obtenidos encontramos que para el anticuerpo Cd34 obtuvimos un 10.69% de células positivas de nuestra población; del anticuerpo Cd13 un 80.45% de células positivas y el anticuerpo Cd117 encontramos solamente un 11.49% de células positivas; con esto aseguramos que las células utilizadas en el trasplante de NPP+CEMO, la mayoría fueron CEMOS adultas (Figura 7).

Efecto del trasplante de células estromales de médula ósea sobre la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal.

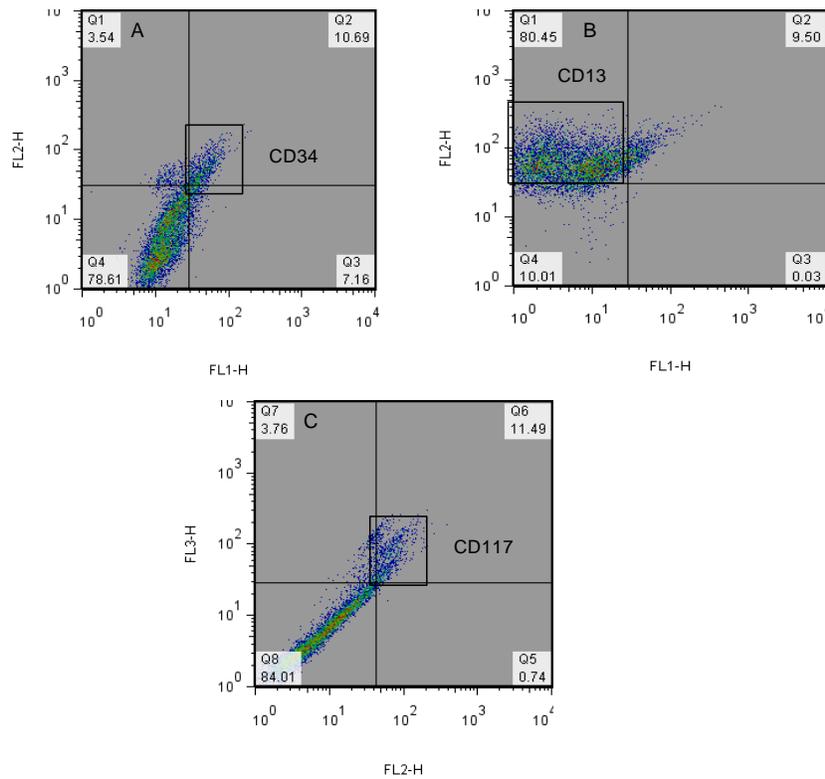


FIGURA 7. CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS CEMO CON Cd34, Cd13 y Cd117, EN LOS RECUADROS SE MUESTRAN LAS POBLACIONES CELULARES. A) POBLACIÓN DE CEMO POSITIVAS PARA CD34 (10.69%); B) POBLACIÓN DE CEMO POSITIVAS PARA CD13 (80.45%) Y C) POBLACIÓN DE CEMO POSITIVAS PARA CD117 (11.49%).

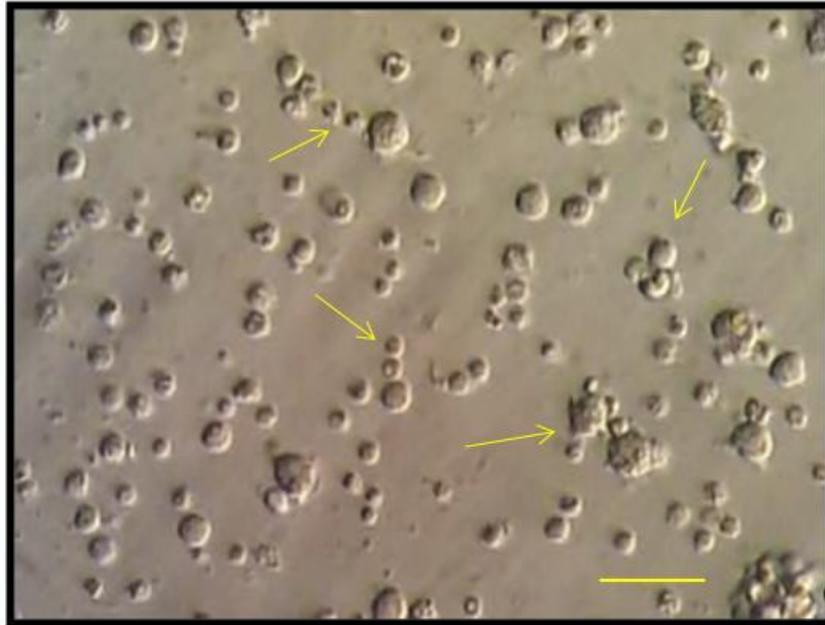
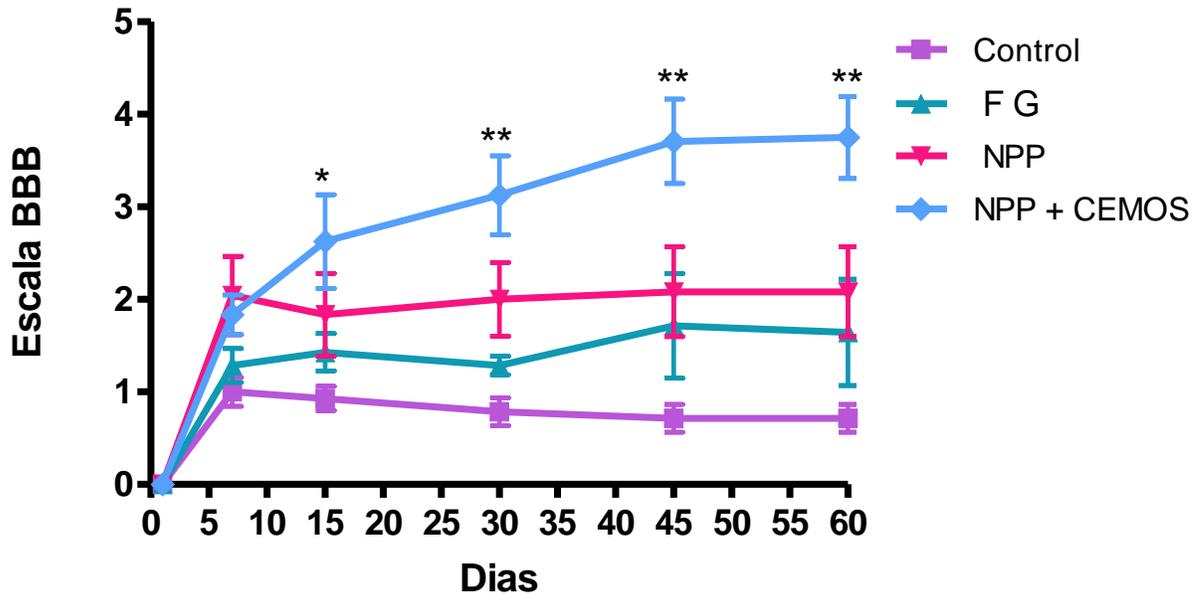


FIGURA 8. FOTOMICROGRAFÍA DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA IN VITRO, LAS FLECHAS INDICAN A LAS CEMO EN SU FORMA INDIFERENCIADA. BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ m.

### ***Análisis de la función locomotora.***

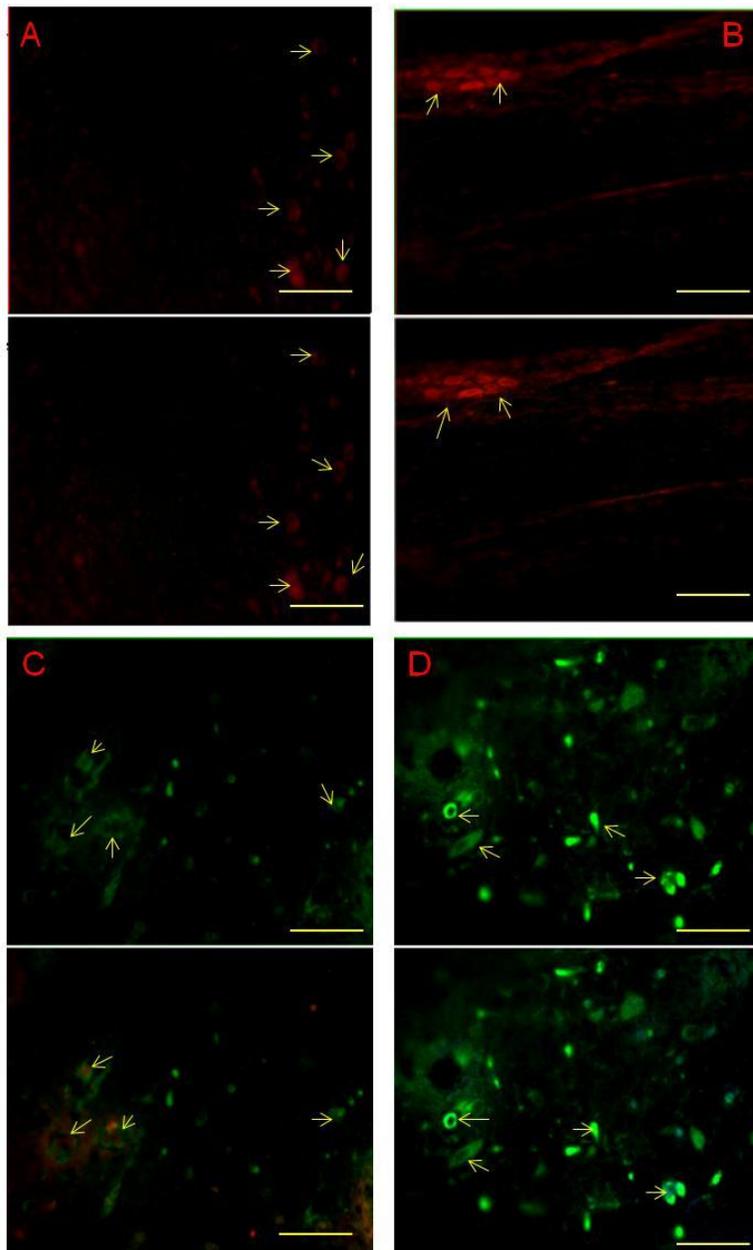
Se realizó el análisis de la función locomotora para observar la mejoría de la locomoción utilizando la escala BBB. En esta prueba a todos los animales de los cuatro grupos (Control, FG, NPP y NPP+CEMOS) fueron evaluados durante ocho semanas; los datos obtenidos se analizaron con un programa estadístico Graph Prism 4. Como se puede observar en la grafica 2; se muestra una diferencia significativa con una  $P < 0.05$  a partir del día 15 de evaluación (Kruskall Wallis) al comparar los grupos FG, NPP y NPP+CEMO contra el grupo control; al realizar la comparación entre grupos NPP+CEMO mostró diferencia significativa a partir del día 30 hasta el día 60 contra FG  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis/ U-Mann Whitmey), sin existir diferencia significativa contra NPP ya que los datos presentaron una tendencia en calificación en la escala de BBB (5-6).

## Evaluación Locomotora



**GRAFICA 2.** ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN BASE A LAS ESCALA BBB. SE OBSERVA LA DIFERENCIAS QUE TUVIERON LOS GRUPOS NPP Y NPP+CEMO AL COMPÁRALOS CON EL GRUPO CONTROL CON UNA  $p < 0.05$  (\*) (KRUSKALL WALLIS), ADEMÁS AL COMPARAR LOS GRUPOS TRATADOS, SOLO EL GRUPO NPP+CEMO PRESENTÓ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN COMPARACIÓN CON FG A PARTIR DEL DÍA 30  $p < 0.05$  (\*\*) (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WITNEY), SIN EXISTIR DIFERENCIA ENTRE LOS GRUPOS CON TRASPLANTE. LA GRÁFICA REPRESENTA LA MEDIA  $\pm$  ERROR ESTÁNDAR.

Después de dos meses se realizó la identificación de las CEMO en el tejido con los anticuerpos Cd13 y Cd117, con el objetivo de verificar que las células después del tiempo de tratamiento siguieran en su forma indiferenciada. Observamos que las CEMO se mantuvieron en su forma indiferenciada encontrándolas cercanas al sitio de trasplante y a sus zonas adyacentes a esta (proximal y distal) (figura 9).

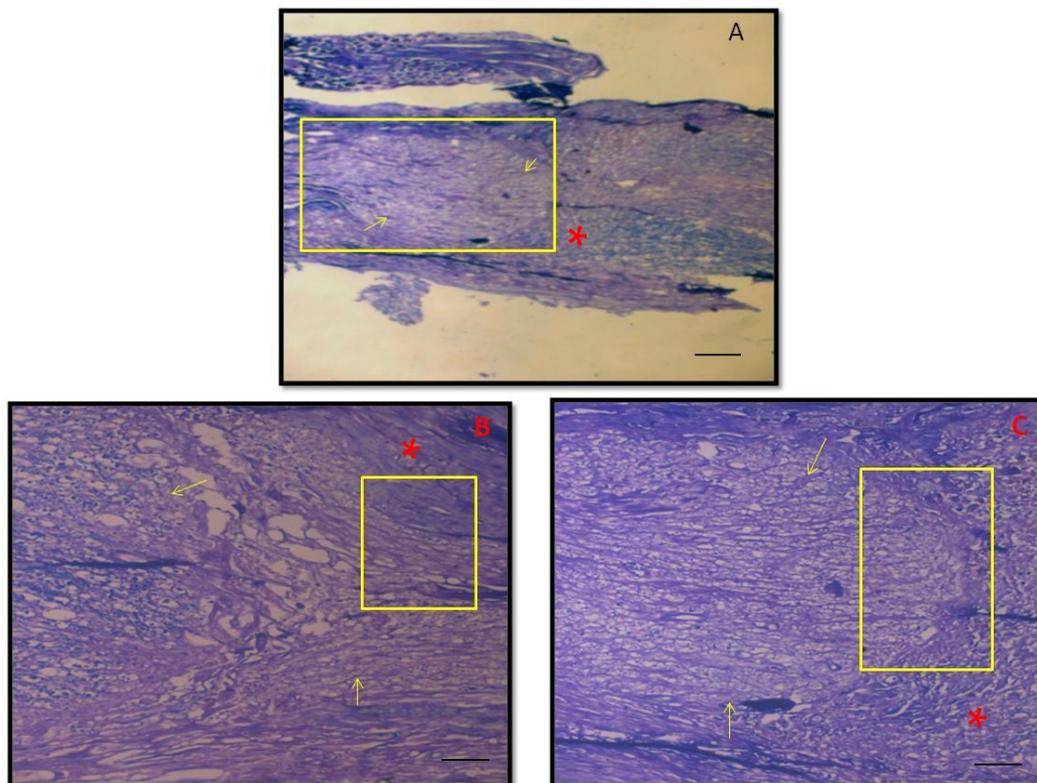


**FIGURA 9.** FOTOMICROGRAFÍA DE CÉLULAS CEMO INMUNOREACTIVAS CON LOS ANTICUERPOS Cd13 Y Cd117 EN EL GRUPO NPP+CEMOS DESPUÉS DE DOS MESES DEL TRASPLANTE, LAS FLECHAS INDICAN ALGUNA CEMO EN SU FORMA INDIFERENCIADA. A) ZONA PROXIMAL; B) ZONA DISTAL, SE OBSERVAN LAS CEMO INDIFERENCIADAS TEÑIDAS DE COLOR ROJO (Cd13, FLECHAS) (ALEXA 546); BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ m. C) ZONA PROXIMAL; D) ZONA DISTAL, SE OBSERVAN LAS CEMO TEÑIDAS DE COLOR VERDE, EN SU FORMA INDIFERENCIADA (Cd117) (ALEXA 488); EN LAS IMÁGENES C Y D LOS NÚCLEOS FUERON CONTRASTADOS CON IODURO DE PROPIDIO. BARRA DE CALIBRACIÓN 20  $\mu$ m.

Con el fin de observar si el trasplante de nervio periférico predegenerado se acoplo al tejido de la médula espinal se realizó la técnica histológica Luxol Fast Blue.

### ***Análisis con Luxol Fast Blue.***

Después de dos meses de tratamiento se realizó la técnica histológica para observar los cambios en el tejido medular. Se mostró que en los grupos con trasplante de NPP y NPP+CEMO el trasplante se acoplo con la médula espinal favoreciendo que este tejido se mantuviera preservado (Figura 10).

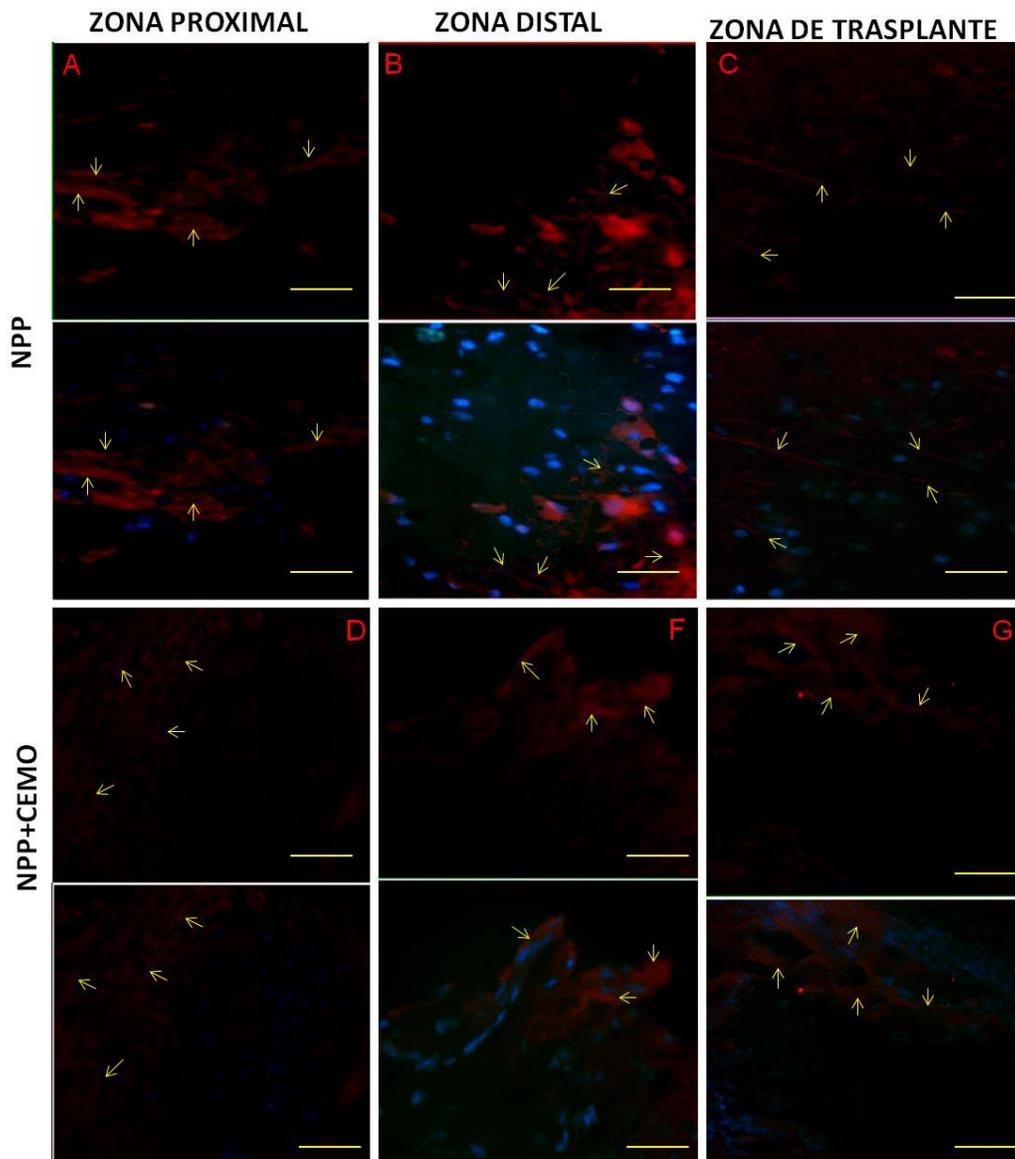


**FIGURA 10.** FOTOMICROGRAFÍA DEL ACOPLAMIENTO DE TEJIDO DEL TRASPLANTE EN LA MÉDULA ESPINAL TEÑIDA CON LUXOL FAST BLUE. A) IMAGEN REPRESENTATIVA DE LA ZONA ALANIZADA PARA EL ACOPLAMIENTO DE NPP Y NPP+CEMO CON LA MÉDULA ESPINALGRUPO NPP+CEMOS; B) NPP, SE MUESTRA EL ACOPLAMIENTO DEL TRASPLANTE CON LA MÉDULA; C) NPP+CEMO SE MUESTRA EL ACOPLAMIENTO DEL TRASPLANTE CON LA MÉDULA. EL RECUADRO INDICA EL ACOPLAMIENTO ENTRE LOS TEJIDOS, LAS FLECHAS INDICAN ALGUNAS FIBRAS Y EL ASTERISCO EL TEJIDO DE LA MÉDULA. BARRA DE CALIBRACIÓN 20  $\mu$ M.

Después de observar en el tejido que hubo un buen acoplamiento entre el trasplante y la médula, en estos resultados se observaron algunas fibras. En base a estos resultados se decidió realizar una técnica con inmunofluorescencia (Neurofilamento) para ver la presencia de estas fibras en los grupos con trasplante.

### ***Análisis de fibras con Neurofilamento.***

Al analizar las fibras se encontró que las fibras positivas en los grupos con NPP y NPP+CEMO cruzaban tanto en la zona próxima, distal y en la zona de trasplante en ambos grupos (Figura 11).



**FIGURA 11.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON NEUROFILAMENTO EN MÉDULA ESPINAL. A) NPP ZONA PROXIMAL, B) NPP ZONA DISTAL, C) ZONA DE TRASPLANTE, SE OBSERVAN FIBRAS POSITIVAS DE COLOR ROJAS (FLECHAS) (ALEXA 546) D) NPP+CEMO ZONA PROXIMAL, E) NPP+CEMO ZONA DISTAL, F) NPP+CEMO ZONA DE TRASPLANTE SE OBSERVAN FIBRAS POSITIVAS DE COLOR ROJO (FLECHAS)(ALEXA 546). LOS NÚCLEOS SE TIÑERON CON HESS. BARRA DE CALIBRACIÓN 15  $\mu$ M.

Al observar la presencia de las fibras encontradas con Neurofilamento se realizaron otras técnicas de marcaje con el fin de identificar el tipo de fibra con anticuerpos especializados para regeneración y remielinización axonal.

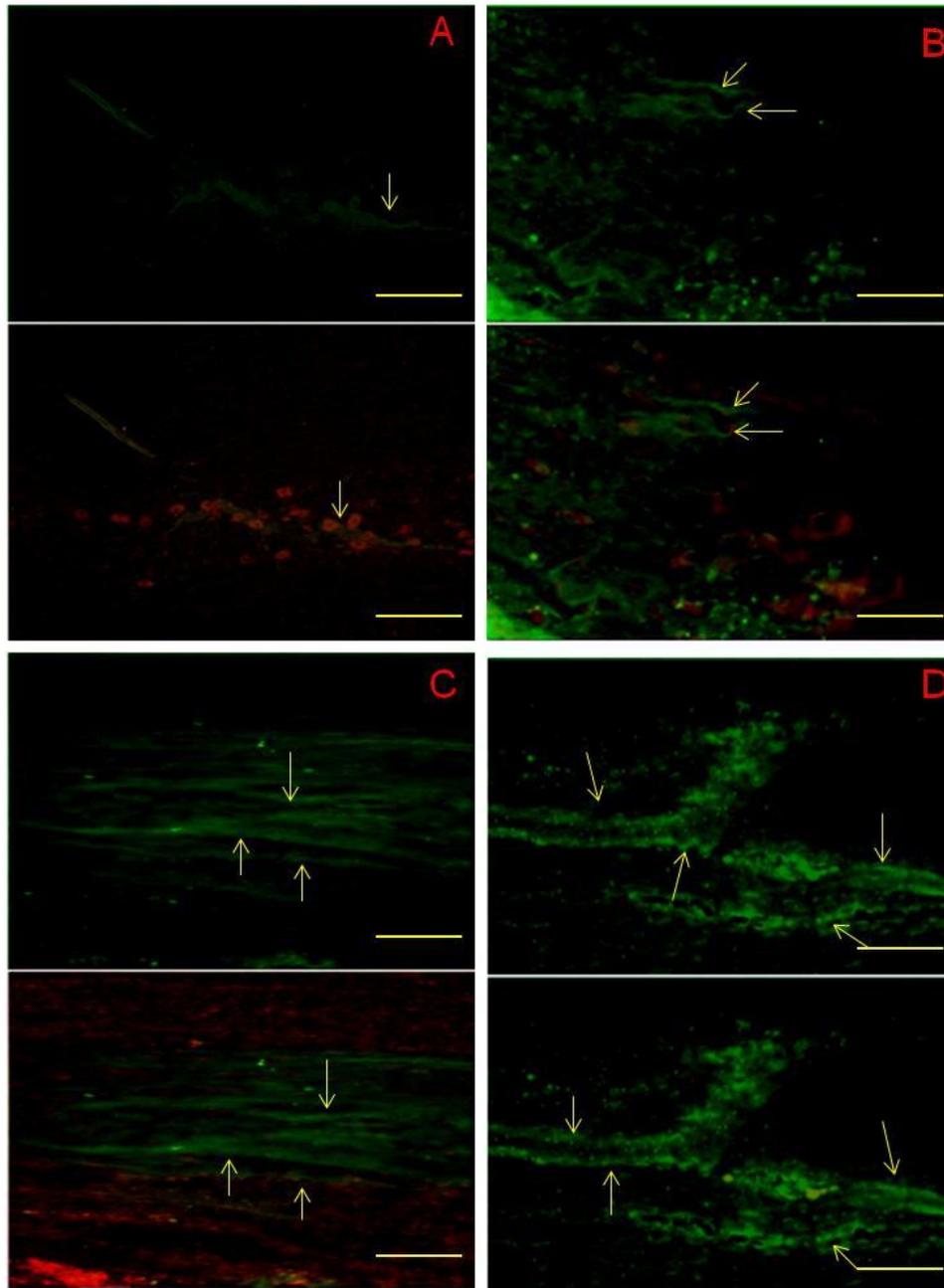
## ***Regeneración axonal y remielinización axonal:***

Se realizó como ya se comentó anteriormente mediante inmunofluorescencia la regeneración axonal mediante la identificación de fibras positivas con GAP-43 y Neuritin, así como la presencia de conos de crecimiento (Neuritin), y la posible remielinización con PBM.

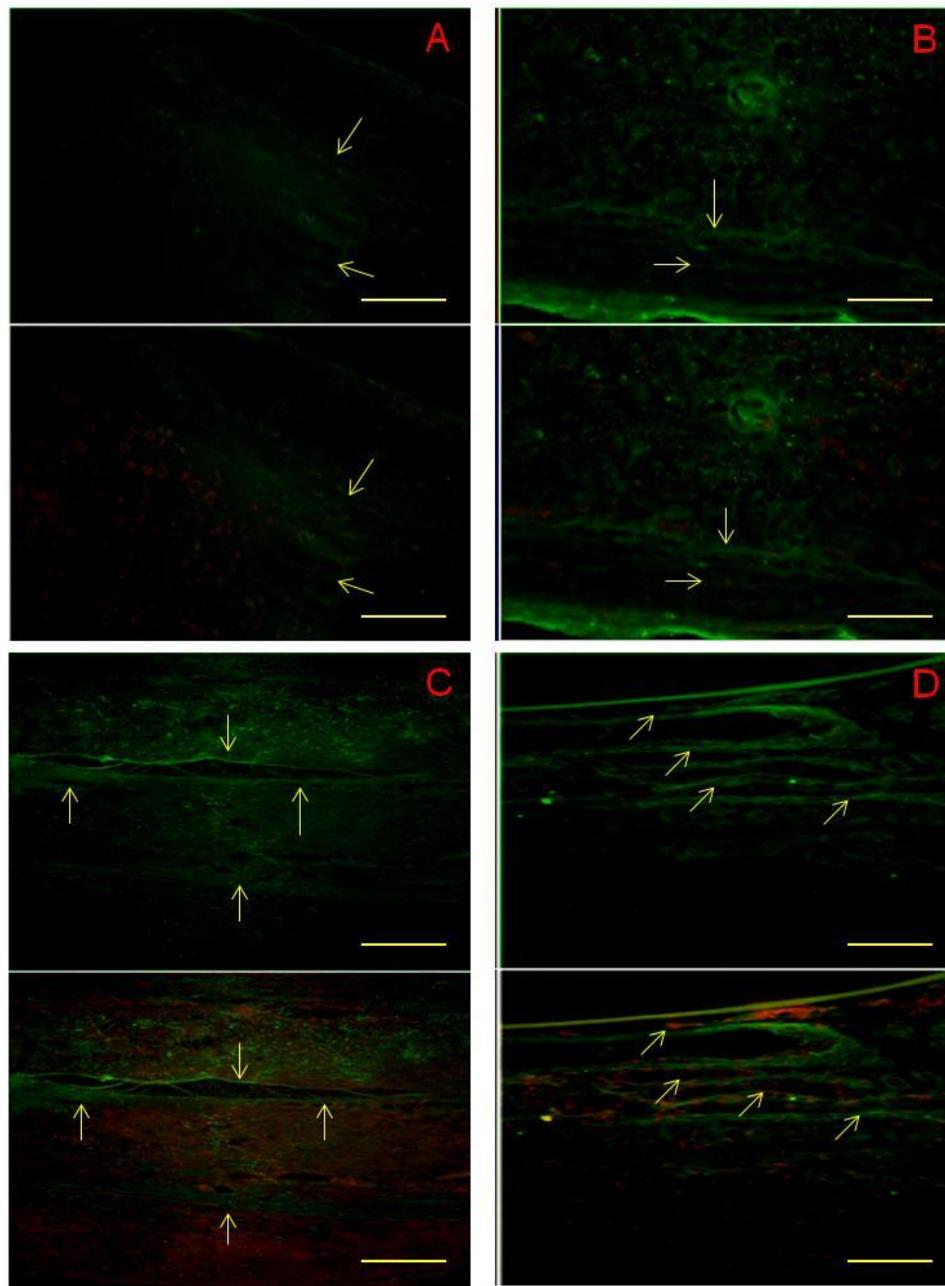
## ***Análisis de la inmunofluorescencia con gap-43.***

Al analizar la zona proximal de la médula espinal cercana al muñón del sitio de trasplante con el anticuerpo Gap-43 se observó una mayor cantidad de fibras positivas de regeneración en los grupos de tratamiento NPP y NPP+CEMO (panel C y D figura 12) a diferencia de los grupos Control y FG, donde hubo poca cantidad de estas fibras (Panel A y B figura 12). Al comparar las fibras positivas encontradas de los grupos de tratamiento se observaron diferencias en el grosor de estas (panel C y D), sin embargo a pesar de un mayor número de fibras en el grupo NPP, viéndose a simple vista fueron muy delgadas a comparación de las encontradas en el grupo combinado que se presentaron gruesas y con ramificaciones.

Además se analizó la zona distal pegada al muñón del sitio del trasplante se observa la misma tendencia observándose mayor cantidad de fibras positivas para Gap-43 en los grupos de NPP y NPP+CEMO a diferencia de los grupos Control y FG (figura 13).



**FIGURA 12.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS A GAP-43, ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL, LAS FLECHAS INDICAN LAS FIBRAS POSITIVAS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL; B) FG; C) NPP, ADEMÁS SE OBSERVÓ MAYOR CANTIDAD Y DE MORFOLOGÍA MÁS DELGADA EN COMPARACIÓN DE LOS PANELES A Y B; D) NPP+CEMO, EN COMPARACIÓN CON NPP LAS FIBRAS FUERON A SIMPLE VISTA MÁS GRUESAS PANEL C. BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ m.

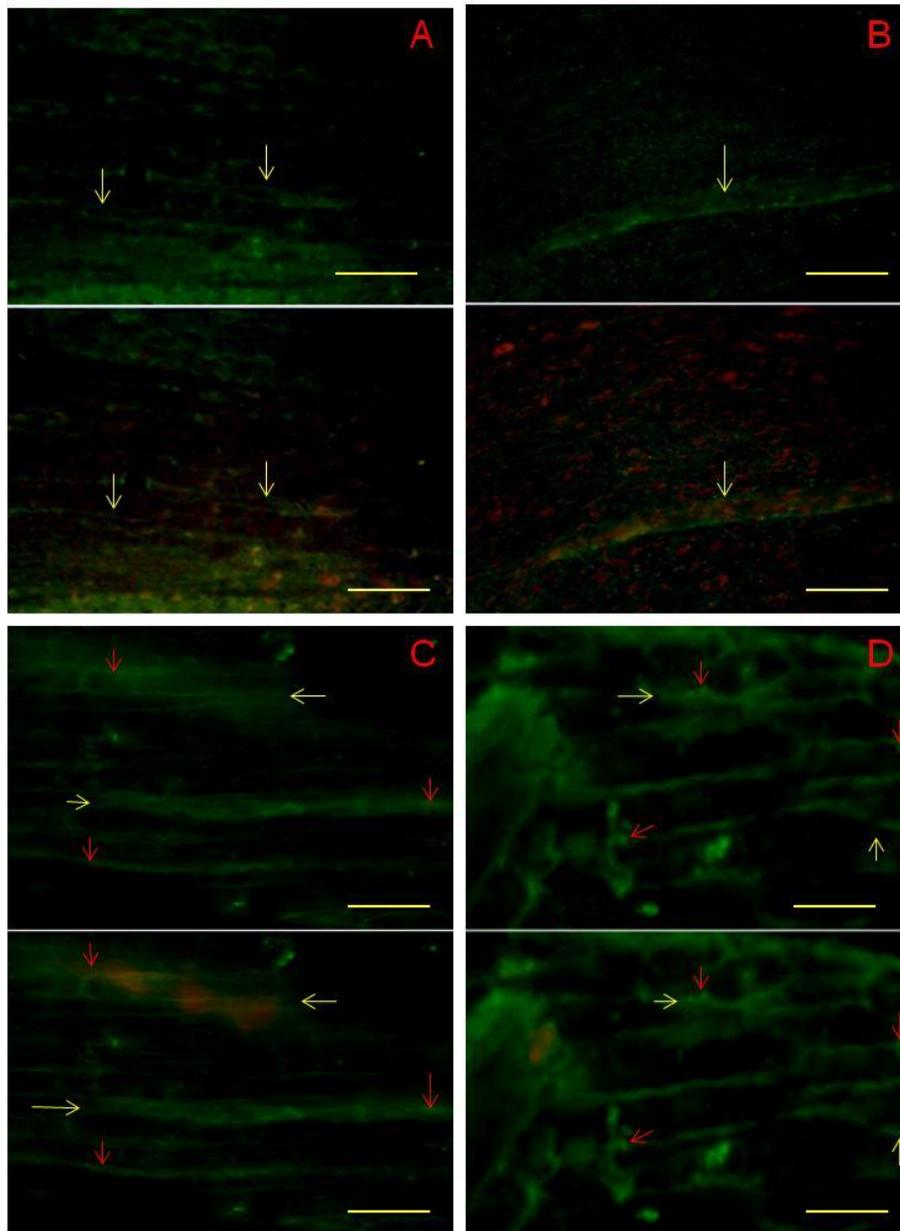


**FIGURA 13.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS A GAP-43, ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL, LAS FLECHAS INDICAN LAS FIBRAS POSITIVAS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL; B) FG; C) NPP Y D) NPP+CEMO PRESENTARON MAYOR CANTIDAD DE FIBRAS POSITIVAS EN COMPARACIÓN AL PANEL A) Y B). BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ m.

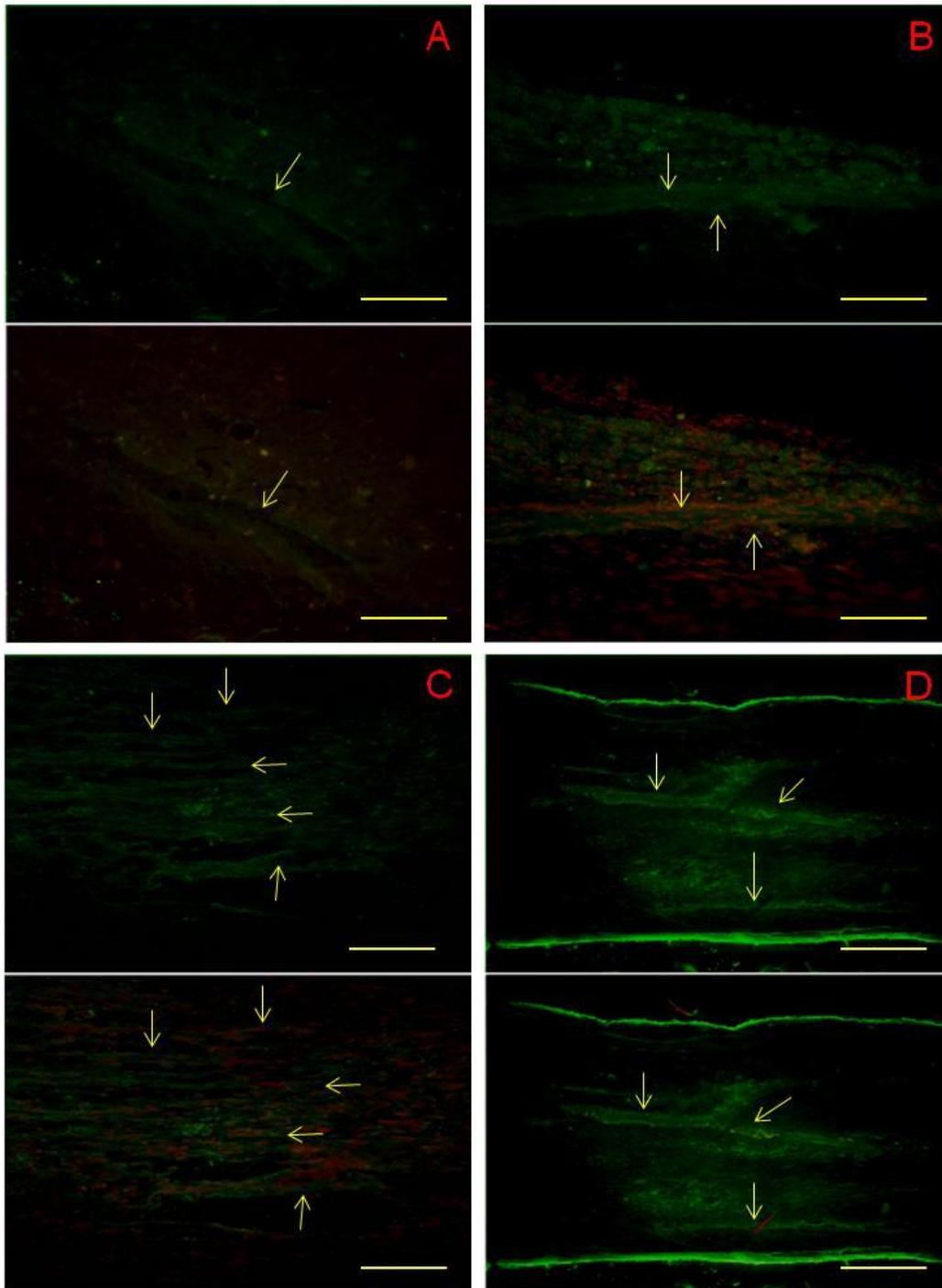
Al igual que con el anticuerpo GAP-43, se analizó la inmunoreactividad para observar regeneración axonal, y presencia de conos de crecimiento con el anticuerpo Neuritin.

### ***Análisis de la inmunofluorescencia con Neuritin.***

Durante el análisis se encontró que únicamente en los grupos de trasplante (NPP, NPP+CEMO) hubo presencia de conos de crecimiento tanto en la zona proximal como distal de la médula espinal. Además de fibras positivas para dicho anticuerpo, observando mayor cantidad en los grupos NPP y NPP+CEMO, en comparación con los grupos Control y FG, viéndose a simple vista las fibras fueron más gruesas y ramificadas en el grupo NPP+CEMO en comparación las encontradas en el grupo de NPP que son fibras más delgadas. (Figuras 14,15)



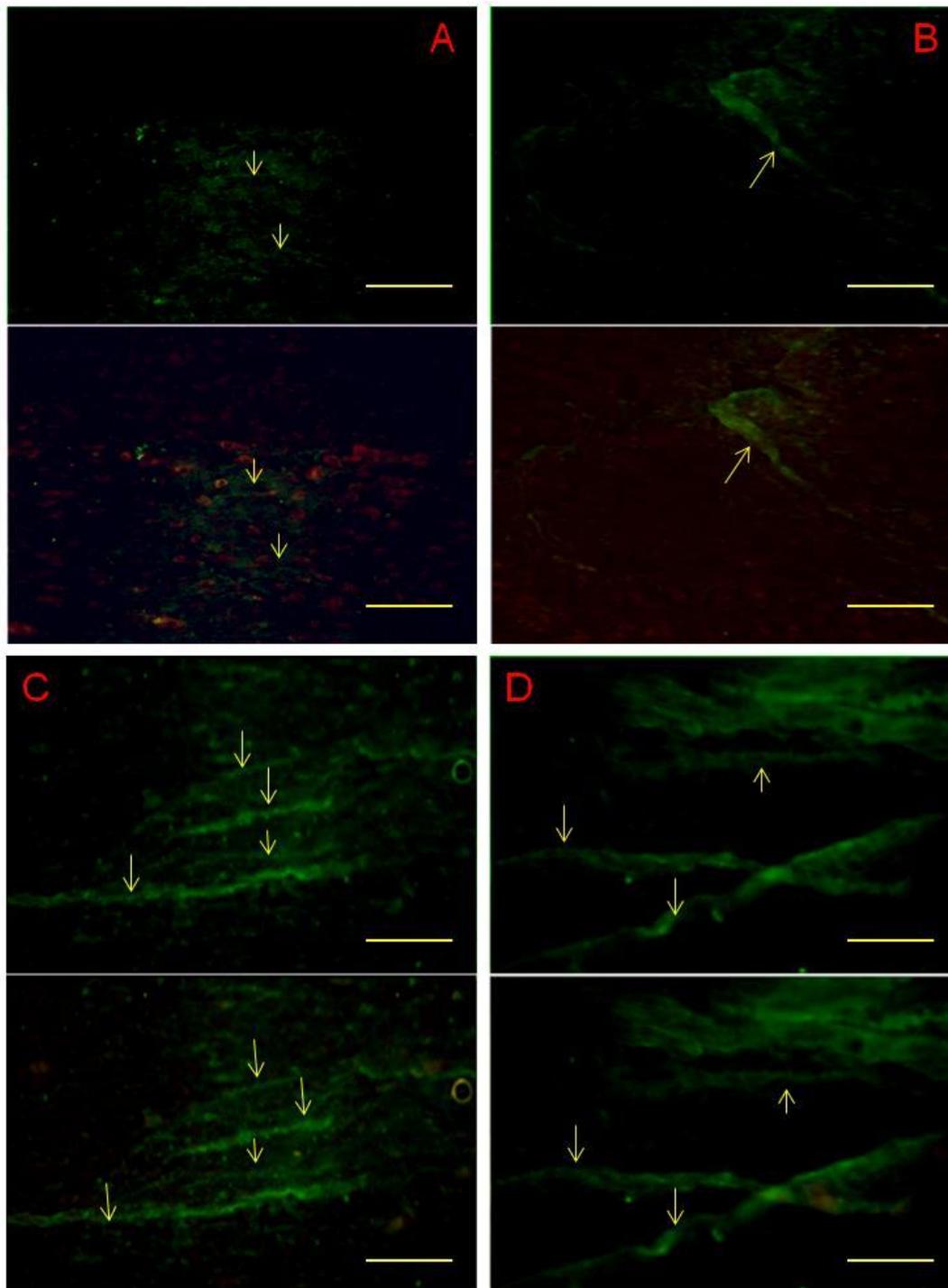
**FIGURA 14.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS (FLECHAS AMARILLAS) Y CONOS DE CRECIMIENTO (FLECHAS ROJAS) CON EL ANTICUERPO NEURITIN, ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL POSITIVOS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL Y B) FG SE OBSERVAN ALGUNAS FIBRAS POSITIVAS, BARRA DE CALIBRACIÓN DE 15 $\mu$ M; C) NPP Y D) NPP+CEMO, ADEMÁS DE LAS FIBRAS SE OBSERVA LOS CONOS POSITIVOS BARRA DE CALIBRACIÓN 20  $\mu$ M.



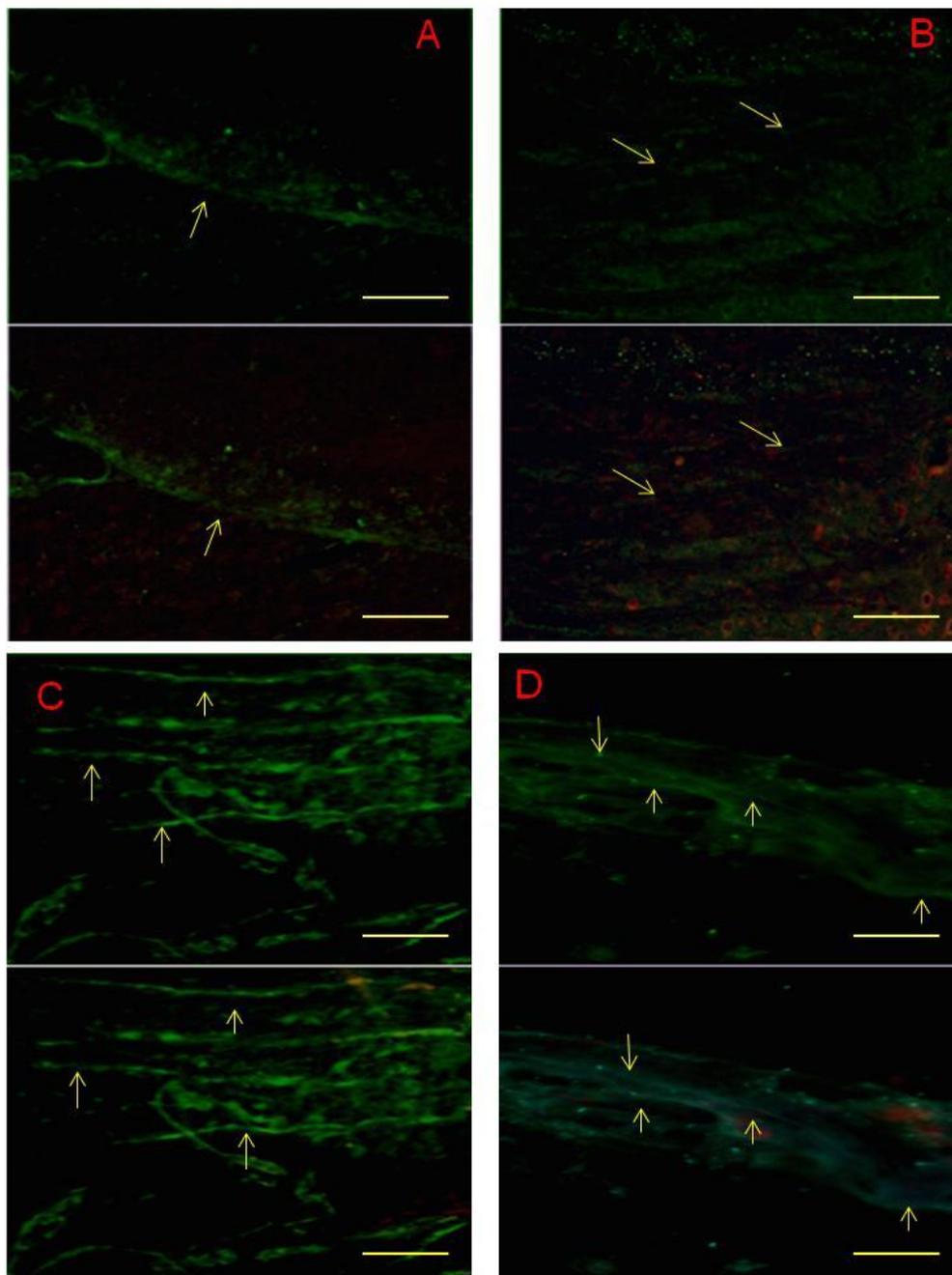
**FIGURA 15.** FOTOMICROGRAFÍAS DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON NEURITIN EN LA ZONA DISTAL DE LA MEDULA ESPINAL, LAS FLECHAS INDICAN LAS FIBRAS POSITIVAS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL; B) FG; C) NPP Y D) NPP+CEMO SE OBSERVAN MAYOR CANTIDAD DE FIBRAS POSITIVAS EN COMPARACIÓN CON EL PANEL A Y B, ADEMÁS EN EL PANEL D SE OBSERVA A SIMPLE VISTA MÁS GRUESAS QUE LAS DEL PANEL C. BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ m.

## ***Análisis de la inmunofluorescencia con proteína básica de la mielina (PBM).***

Además de la regeneración axonal observada con los anticuerpos ya mencionados, también se realizó un marcaje con PBM para observar si existía remielinización. Se observó la presencia de fibras positivas en todos los grupos tanto en las zonas proximal y distal de la médula espinal. Sin embargo en los grupos de NPP y NPP+CEMO hubo mayor cantidad de fibras inmunoreactivas positivas en comparación con los grupos FG y Control. Existiendo la posibilidad que en los grupos de trasplante pudiese existir una remielinización en ambas zonas (Figura 16 y 17).

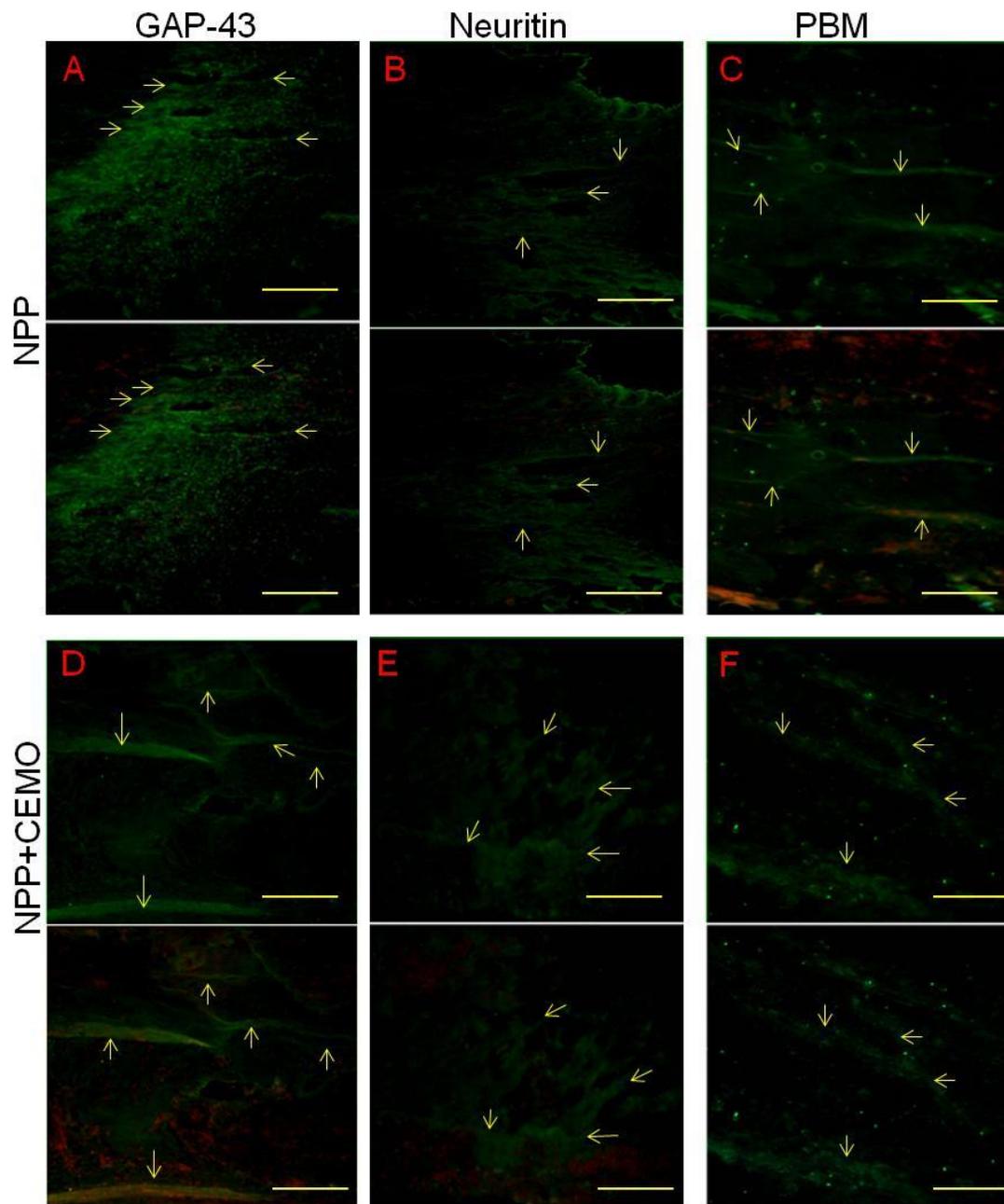


**FIGURA 16.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON PBM EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL, LAS FLECHAS INDICAN LAS FIBRAS POSITIVAS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL; B) FG; C) NPP Y D) NPP+CEMO SE OBSERVA MAYOR CANTIDAD DE FIBRAS POSITIVAS EN COMPARACIÓN CON LOS PANELES A Y B. BARRA DE CALIBRACIÓN 15  $\mu$ M.



**FIGURA 17.** FOTOMICROGRAFIAS DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS CON PBM EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL, LAS FLECHAS INDICAN LAS FIBRAS POSITIVAS DE COLOR VERDE (ALEXA 488). A) CONTROL; B) FG; C) NPP Y D) NPP+CEMO SE OBSERVA MAYOR CANTIDAD DE FIBRAS A COMPARACIÓN DE LOS PANELES A Y B. BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ M.

Con base a los resultados anteriores, se analizaron los tres marcadores en el epicentro de la lesión con el objetivo de ver si el trasplante permitía la continuidad morfológica (figura 18).



**FIGURA 18.** FOTOMICROGRAFÍA DE FIBRAS INMUNOREACTIVAS DE LOS TRES ANTICUERPOS DE LA ZONA DE TRASPLANTE DE LA MÉDULA ESPINAL, LA FLECHAS INDICAN FIBRAS POSITIVAS PARA GAP-43, NEURITIN Y PBM SEGÚN EL CASO (ALEXA 488). PANELES A); B) Y C) NPP SE OBSERVAN FIBRAS POSITIVAS PARA LOS TRES ANTICUERPOS EN LA ZONA DE TRASPLANTE.

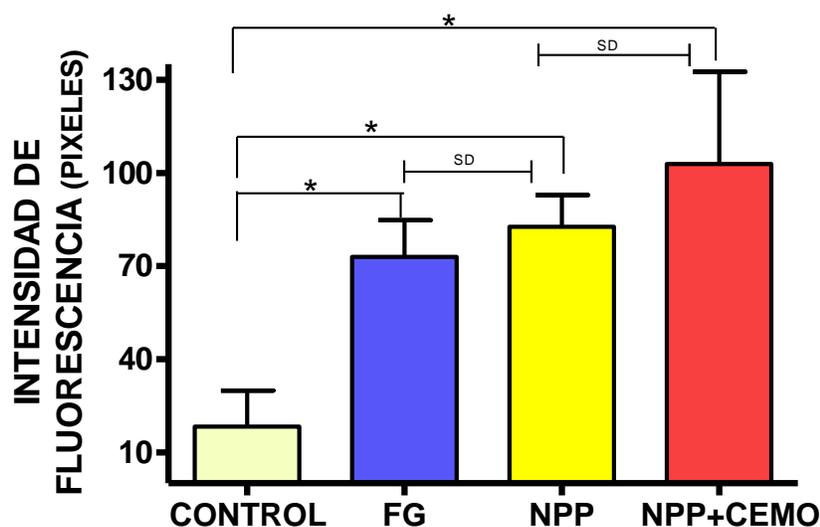
PANELES D); E) Y F) NPP+CEMO SE OBSERVÓ EL MISMO NÚMERO DE FIBRAS POSITIVAS SIN EMBARO PARA GAP-43 Y PBM ESTAS FUERON DE MAYOR GROSOR A SIMPLE VISTA. BARRA DE CALIBRACIÓN 15  $\mu$ m.

Además del análisis morfológico de las zonas analizadas de la médula espinal, se realizó la cuantificación del índice de fluorescencia de los objetos brillantes positivos medidos en pixeles para los marcadores de regeneración (Gap-43 y Neuritin) y para remielinización (PBM). Los datos fueron capturados con el programa Image Pro-Plus 6, y analizados con un programa estadístico Graphpad Prism 4. Debido a que el análisis de normalidad no fue positivo se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis.

### ***Análisis de la intensidad de fluorescencia con GAP-43.***

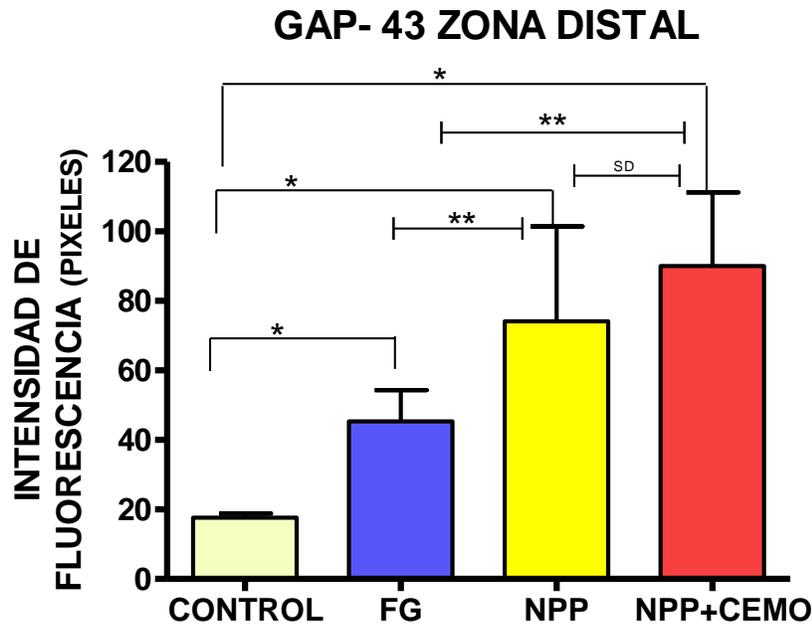
En los resultados obtenidos de la intensidad de fluorescencia, se puede observar en la grafica 3 que todos los grupos FG, NPP y NPP+CEMO, tuvieron mayor cantidad en la expresión del anticuerpo GAP-43 que el grupo control con una diferencia significativa de  $P < 0.05$  (Kruskal Wallis), diferencia no presentada al realizar una comparación entre los grupos con tratamiento.

### GAP- 43 ZONA PROXIMAL



**GRAFICA 3.** ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO GAP-43 EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MÉDULA ESPINAL. SE PRESENTO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LOS GRUPOS FG, NPP Y NPP+CEMO CONTRA EL CONTROL (\*)  $P < 0.05$ , KRUSKALL WALLIS, RESPECTIVAMENTE.

Al analizar los datos de la zona distal de la médula espinal se observó que todos los grupos FG, NPP y NPP+CEMO tuvieron una diferencia significativa de  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis), en comparación con el control; y una diferencia significativa de  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis, U-Mann Whitney) de los grupos con tratamiento (NPP, NPP+CEMO) contra el grupo FG, sin encontrar diferencias entre los grupos tratados (Grafica 4).

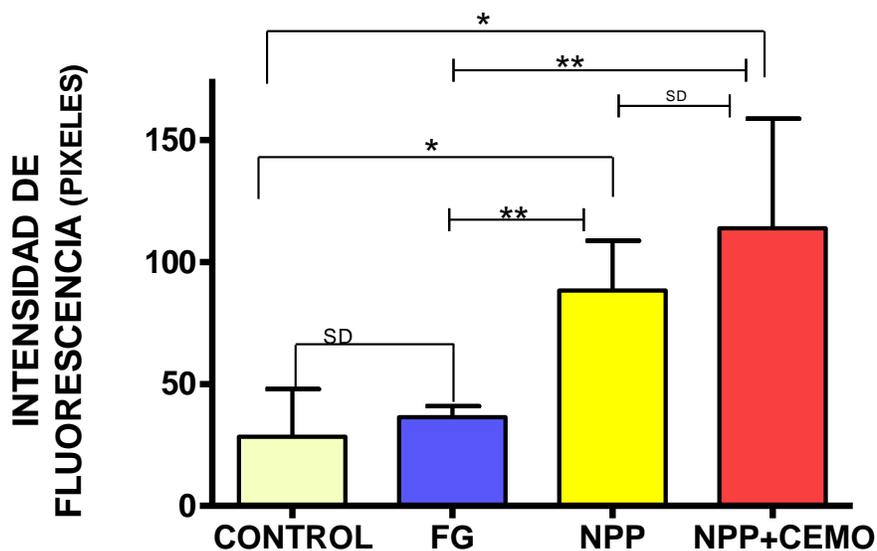


**GRAFICA 4.** ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO GAP-43 EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL. SE OBSERVO UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LOS GRUPOS NPP, NPP+CEMO Y FG CONTRA EL CONTROL  $P < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS) (\*); ASI COMO AL COMPARAR NPP Y NPP+CEMO CONTRA FG  $P < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WINTNEY) (\*\*).

### ***Análisis de la intensidad de fluorescencia con Neuritin.***

En la zona proximal se observó que solamente los grupos NPP y NPP+CEMO tuvieron una diferencia significativa con una  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis) al compararlos con el grupo control; al realizar el análisis entre los grupos solo hubo diferencia significativa de los grupos de tratamiento (NPP, NPP+CEMO) al compararlos con el FG con una  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis, U-Mann Whitney) pero no hubo diferencia entre los grupos de tratamiento (Grafica 5).

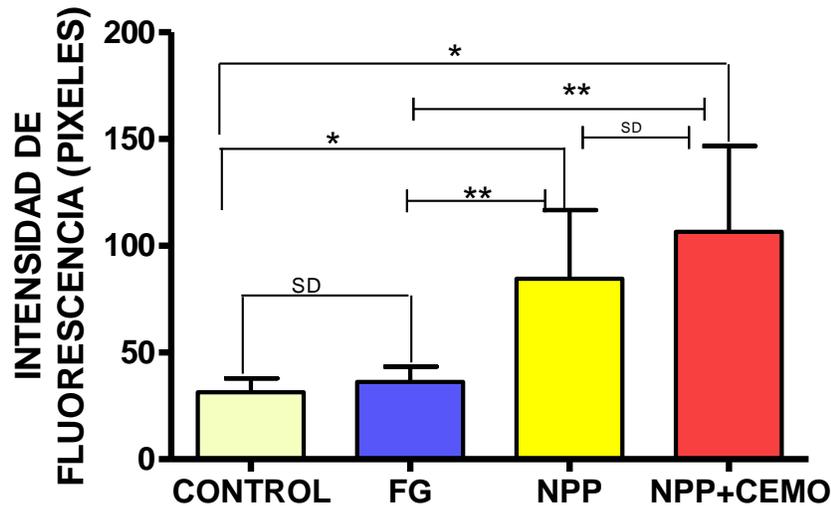
## NEURITIN ZONA PROXIMAL



**GRAFICA 5.** ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO NEURITIN EN LA ZONA PROXIMAL DE LA MEDULA ESPINAL. SE OBSERVO UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LOS GRUPOS NPP, NPP+CEMO Y FG CONTRA EL CONTROL  $P < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS) (\*); ASÍ COMO AL COMPARAR NPP Y NPP+CEMO CONTRA FG  $P < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WINTNEY) (\*\*) (SD SIN DIFERENCIA.)

En lo que respecta en la zona distal se observó el mismo patrón que en la zona proximal ya que solo hubo diferencia significativa al compararse los grupos NPP y NPP+CEMO contra el control y el FG con una  $P < 0.05$  (Kruskal Wallis, U-Mann Whitney); pero no entre los grupos controles ni los grupos tratados (Grafica 6).

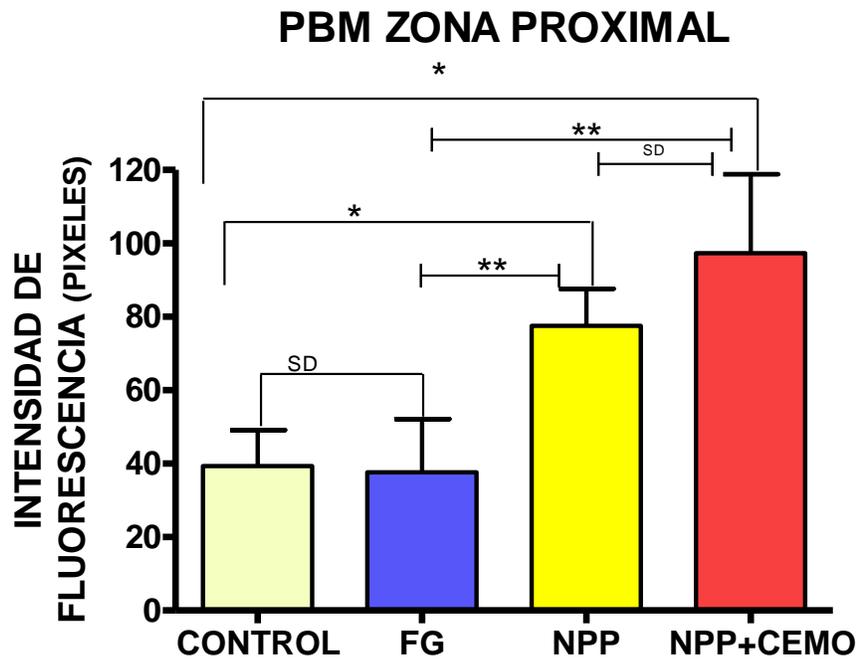
## NEURITIN ZONA DISTAL



**GRAFICA 6.** ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE FLORESCENCIA DEL EL ANTICUERPO NEURITIN EN LA ZONA DISTAL DE LA MEDULA ESPINAL. SOLO SE ENCONTRÓ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LOS GRUPOS NPP Y NPP+CEMO CONTRA LOS GRUPOS CONTROL Y FG CON UNA  $P < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WITHNEY); SIN EXISTIR DIFERENCIA ENTRE ESTOS NI EN LOS GRUPOS TRATADOS  $P > 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WITHNEY).

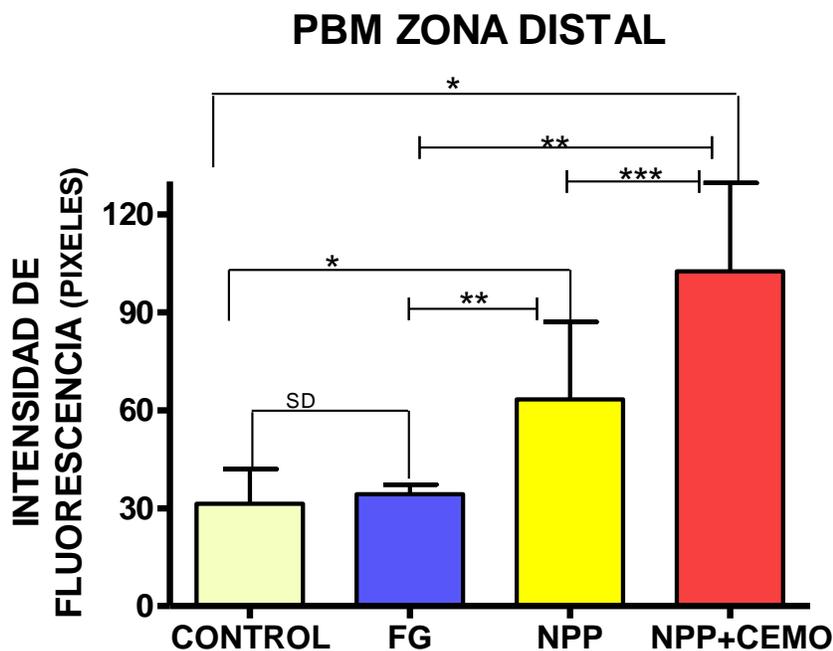
### *Análisis de la intensidad de la fluorescencia con proteína básica de la mielina.*

De lo que se refiere al análisis de la PBM de la zona proximal, se observó una diferencia significativa al comparara los grupos FG, NPP y NPP+CEMO con el grupo Control con una  $P < 0.05$  (Kruskal Wallis). A sí mismo, los grupos NPP y NPP+CEMO comparados contra el FG con una  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis, U-mann Withney), sin existir diferencias significativa entre estos (Grafica 7).



**GRAFICA 7.** ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA PARA EL ANTICUERPO PBM EN LA ZONA PROXIMAL. El (\*) INDICA LA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DEL GRUPO NPP CONTRA LOS CONTROLES (CONTROL Y EL FG) ( $P < 0.05$ ); EL (\*\*) INDICA LA DIFERENCIA DEL GRUPO NPP+CEMO AL COMPARARLO CON LOS GRUPOS CONTROLES (CONTROL Y EL FG) ( $P < 0.05$ ).

Al analizar la zona distal como se observa en la grafica 8, se encontró una diferencia significativa al comparar los grupos FG, NPP y NPP+CEMO contra el grupo Control con una  $P < 0.05$  (Kruskall Wallis), y de los grupos NPP y NPP+CEMO hubo una diferencia significativa contra el grupo de FG  $p < 0.05$  (Kruskall Wallis, U-Mann Withney), y entre estos  $p < 0.05$  (Kruskall Wallis, U-Mann Witney).



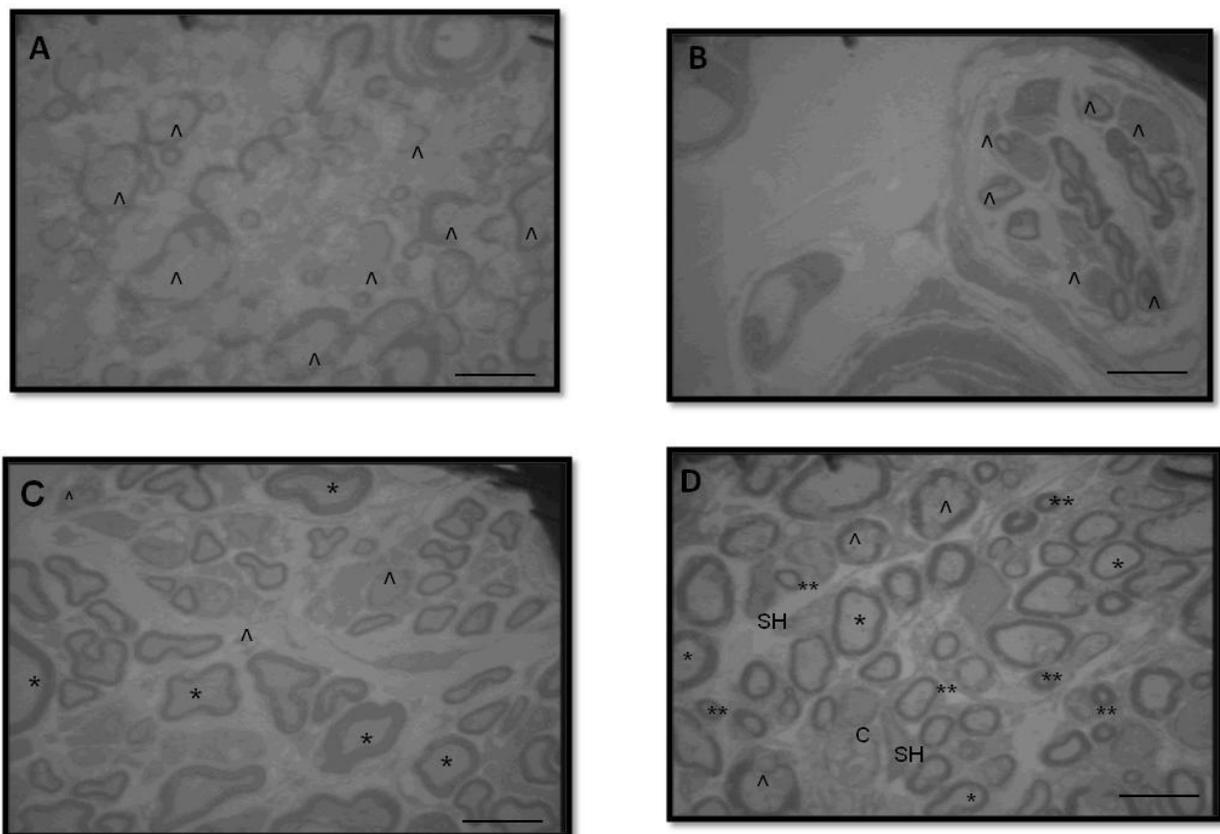
**GRAFICA 8.** ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE FLUORESCENCIA DEL EL ANTICUERPO PBM EN LA ZONA DISTAL DE LA MÉDULA ESPINAL. SE OBSERVO UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LOS GRUPOS NPP, NPP+CEMO Y FG CONTRA EL CONTROL  $p < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS) (\*); ASI COMO AL COMPARAR NPP Y NPP+CEMO CONTRA FG  $p < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WINTNEY) (\*\*) Y ENTRE ESTOS  $p < 0.05$  (KRUSKALL WALLIS, U-MANN WINTNEY) (\*\*\*)

Con los resultados mostrados anteriormente, pudimos observar que las fibras encontradas fueron de regeneración axonal además de fibras positivas para PBM, por lo tanto se realizó un estudio de microscopía electrónica para saber si la mielina de los grupos trasplantados fue preservada además de identificar los tipos celulares implicados.

## ***Análisis de microscopia electrónica.***

### ***Mielinización:***

Se realizó un análisis de microscopia electrónica para observar tanto las estructuras morfológicas, así como también la mielinización de los axones en los diferentes grupos después de los dos meses de tratamiento. Como se puede observar en la figura 19; en los grupos de tratamiento (NPP, NPP+CEMOS) la mielina de los axones encontrados se veía mejor conservada y bien definida a comparación de los axones de los grupos Control y FG donde la mielina se veía destruida; también a diferencia de todos los grupos en el grupo con trasplante de NPP+CEMOS se observaron formación de nuevos axones.

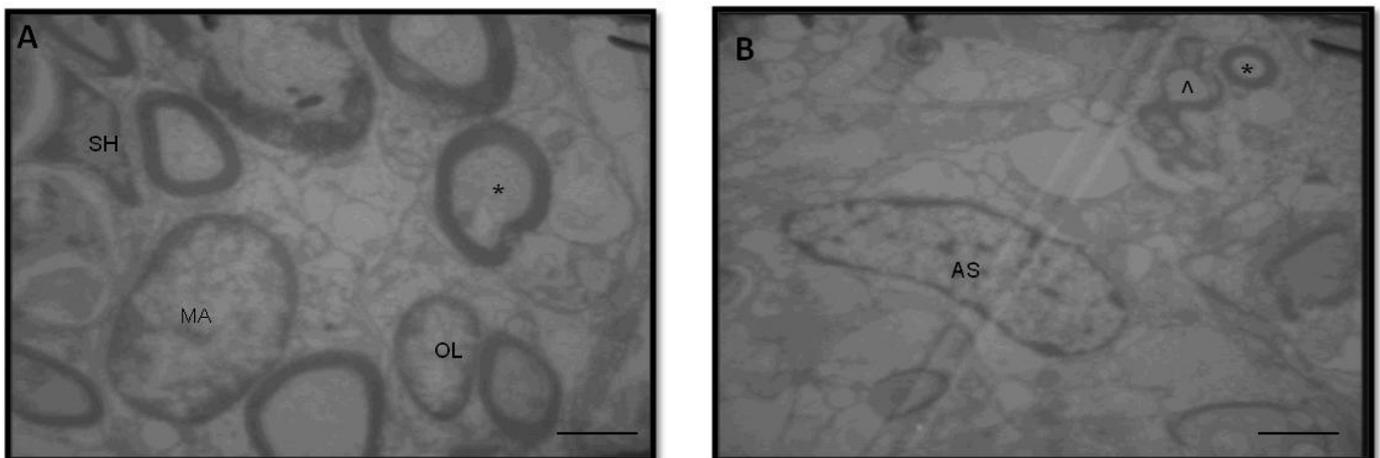


**FIGURA 19.** FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL. A) CONTROL AXONES DESMIELINIZADOS Y EN PROCESOS DE DESMIELINIZACIÓN (^) (1600X). B) FG AXONES DAÑADOS (^), (1600X). C) NPP AXONES MIELINIZADOS (\*), UN

Efecto del trasplante de células estromales de médula ósea sobre la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal.

MACRÓFAGO CERCANO A UN AXÓN DAÑADO (MA) Y AXONES DAÑADOS (^) (1600X). D) NPP+CEMOS AXONES MIELINIZADOS (\*), AXONES DE NUEVA FORMACIÓN (\*\*), ALGUNOS AXONES DAÑADOS (^) Y UNA CÉLULA DE SCHWANN JUNTO A UN AXÓN (SH) Y UNA CEMO JUNTO A UNA CÉLULAS DE SCHWANN (C) (1600X). LAS IMÁGENES FUERON TOMADAS CON UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN LEO 906 E. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 μM.

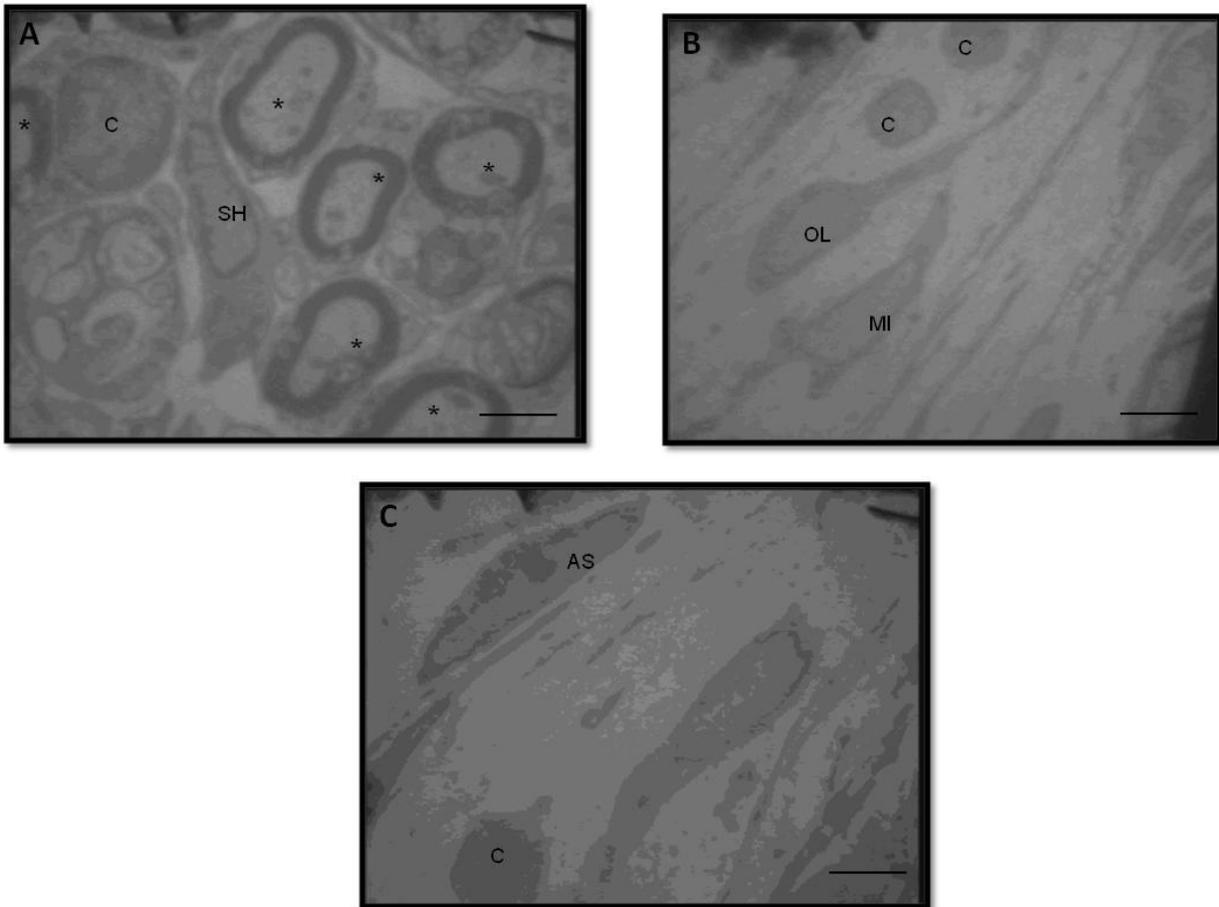
En el grupo con trasplante de NPP se observaron algunas células de Schwann envolviendo a su axón mielinizado cercanas al sitio de trasplante, además de que también se observó algunas células gliales como astrocitos y microglía cercanos a los axones desmielinizados (figura 20); en el grupo de NPP+CEMOS pudimos observar que cerca del sitio de trasplante en donde se encontraron los axones mielinizados, estaban las células de Schwann y las CEMO, además de la interacción de estas últimas con otros tipos celulares como astrocitos y macrófagos, también se encontraron células de la microglía cercanas al sitio de trasplante(figura 21).



**FIGURA 20.** FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL, GRUPO CON TRASPLANTE NPP. A) INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN (SH) ENVOLVIENDO A SU AXÓN MIELINIZADOS (\*), TAMBIÉN PODEMOS OBSERVAR UN OLIGODENDROCITO (OL) JUNTO A UN AXÓN Y UN MACRÓFAGO (MA) (1600X). B) OBSERVAMOS UN ASTROCITO (AS)

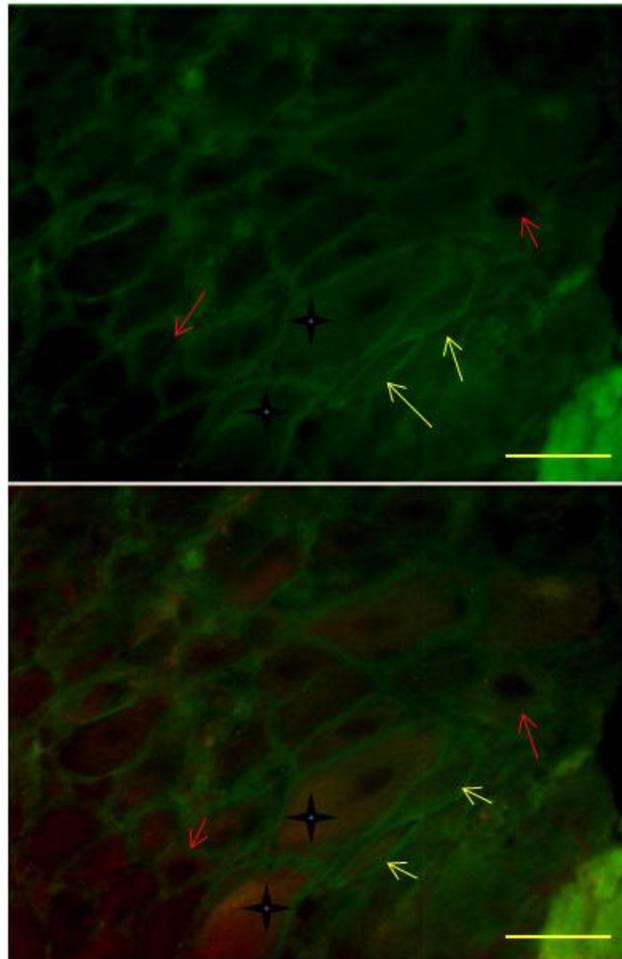
Efecto del trasplante de células estromales de médula ósea sobre la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal.

CERCANA A AXONES DESMIELINIZADOS (^) Y UN AXÓN MIELINIZADO (\*) (1600X). LAS IMÁGENES FUERON TOMADAS CON UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN LEO 906 E. BARRA DE CALIBRACIÓN 15  $\mu$ M.



**FIGURA 21.** FOTOMICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL DEL GRUPO CON TRASPLANTE DE NPP+CEMO. A) INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DE SCHWANN (SH) Y LAS CEMO (C) JUNTO A AXONES MIELINIZADOS (\*) (4646X), BARRA DE CALIBRACIÓN 20 $\mu$ M. B) INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS CEMO (C) CON UN OLIGODENDROCITO (OL) Y UNA MICROGLÍA (MI), (3500X) BARRA DE CALIBRACIÓN 15 $\mu$ M. C) INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS CEMO (C) CON UN ASTROCITO (AS) (3500X), BARRA DE CALIBRACIÓN 20 $\mu$ M. LAS IMÁGENES FUERON TOMADAS CON UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN LEO 906 E.

Con estos resultados pudimos observar que en los grupos con trasplante los axones se encontraban mielinizados, además se encontró que en el grupo con NPP+CEMO las células estromales de médula ósea se encontraban muy cercanas a células de Schwann junto a los axones, se realizó un doble marcaje con S-100 y Cd117 para observar si existía una interacción entre estas. Los resultados obtenidos en el grupo con NPP+CEMO encontramos que las CEMO y las células de Schwann interactuaban juntas (figura 22).



**FIGURA 22.** FOTOMICROGRAFÍA DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS POSITIVAS PARA S-100 Y Cd13 EN EL GRUPO NPP+CEMO. SE OBSERVAN LAS CÉLULAS DE SCHWANN POSITIVAS DE COLOR VERDE (FLECHAS AMARILLAS) (ALEXA 488), Y LA INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS CEMO TEÑIDAS DE COLOR ROJO (FLECHAS AMARILLAS) (ALEXA 546) CERCANAS A AXONES (ESTRELLAS). BARRA DE CALIBRACIÓN 20  $\mu$ m.

## ***DISCUSIÓN:***

Se sabe que la capacidad regenerativa del tejido del SNC en mamíferos adultos es muy limitada como se evidencia en diferentes patologías como la enfermedad vascular cerebral isquémica o el traumatismo craneoencefálico. La lesión traumática de médula espinal, induce un daño permanente en las vías ascendentes y descendentes provocando parálisis (Quertainmont y cols. 2012). En este caso, promover una terapia exitosa para favorecer la regeneración axonal y mejorar la función neurológica, es el objetivo de muchos investigadores.

En este estudio la terapia propuesta para promover la regeneración axonal fue el uso de NPP con CEMO, debido a que ambos separados ó como complemento de otras terapias han demostrado tener un efecto benéfico y neuroprotector después de la lesión al promover la regeneración axonal (Zuritay cols., 2004; Côté y cols., 2011b; Akiyama y cols., 2002). Ya que los dos son capaces de inducir la producción de BDNF y NT-3 los mismos que pueden activar a proteínas relacionadas con la regeneración axonal como GAP-43 y Neuritin (Song y cols., 2008; Novikova y cols., 2011; Di Giovanni y cols., 2005; Kobayashi y cols., 1997).

A pesar de que estos son capaces de promover la regeneración axonal, esta puede no ser funcional por lo que decidimos realizar una evaluación motora en la cual se observó que los grupos de tratamiento (NPP, NPP+CEMO) se presentó una mayor calificación. Siendo para un modelo de sección completa la calificación promedio en la escala de BBB es de 4 (Yoshida y cols., 2012), los animales con NPP+CEMO en este estudio presentaron una calificación de 6, pudiendo seguir esta tendencia o aumentar si el estudio se postergara hasta un año, ya que en estudios de contusión los animales con trasplante de

CEMO al año llegan a tener una calificación de 13 (Vaquero y cols.,2009). Cabe mencionar que el grupo de NPP y FG presentaron una tendencia a la mejoría, sin embargo fue menor a la encontrada en el grupo de NPP+CEMO.

Uno de los factores que pueden permitir la recuperación motora funcional es la extensión de fibras nerviosas por lo que se realizó el análisis morfológico con Neurofilamento, con lo cual observamos la presencia de fibras del sitio de trasplante a la médula espinal, siendo estas fibras en mayor número y positivas para GAP-43 y Neuritin en el grupo NPP+CEMO.

Al analizar la regeneración axonal (crecimiento axonal) por la expresión de GAP-43 y Neuritin, se observó que el trasplante de NPP y NPP+CEMO produjo de manera significativa mayor crecimiento axonal mostrado por el número de fibras positivas, con mayor intensidad de fluorescencia con GAP-43 comparado con los grupos testigo (figura 12, 13), lo que concuerda con lo publicado por algunos autores. En diversos estudios se ha correlacionado la expresión de la proteína GAP-43 con regeneración axonal, ya que se han observado fibras inmunoreactivas a esta proteína después del trasplante de CEMO o de nervio periférico en modelos de hemisección y axotomía (Yuan y cols., 2009; Neuhuber y cols., 2005; Plunet y cols., 2002). Gap 43 es una proteína intracelular asociada al crecimiento, que es fosforilada por la proteína-quinasa C, la cual, al ser fosforilada se une a los filamentos de actina directamente (por cada molécula de Gap-43 se unen 27 moléculas de actina); esta unión promueve la extensión del filopodio, induciendo el desarrollo de los conos de crecimiento; además también se asocia con proteínas de la familia Ras y Rho, promoviendo así el desarrollo neuronal (Denny 2006). Se sabe que después de una LTME puede existir la expresión de esta proteína para tratar de promover el crecimiento axonal, por la presencia de algunas células que hayan sobrevivido a los eventos secundarios después de la lesión (Storer 2003) promoviendo así un crecimiento axonal, sin embargo no

se ha correlacionado la expresión de esta proteína provenientes de las células con una regeneración funcional. Las pocas fibras encontradas en el grupo de FG puede ser debido a que este puede preservar la arquitectura normal del tejido, se ha observado que no actúa como una barrera para la regeneración por la formación de la matriz, promoviendo así que en la zona de lesión las fibras puedan conectarse nuevamente (Sameem y cols., 2011), debido a que el FG es capaz de formar un coagulo estable al activar a la trombina la cual se une al fibrógeno para polimerizar a los monómeros de fibrina formando una matriz (Tse y Ko., 2012).

La diferencia que existe entre este grupo y los trasplantados es que existe la presencia de factores endógenos como factores de crecimiento BDNF el cual se ha visto que promueve que haya mayor expresión de la proteína GAP-43 induciendo a un mayor crecimiento axonal (Kobayashi y cols., 1997). Las neurotrofinas poseen diferentes funciones para promover la regeneración axonal de neuronas lesionadas, además de dar protección a neuronas y células gliales. Factores como el BDNF y NT-3 se han visto implicados en la mejoría después de una LTME. La utilización de estos factores en diferentes modelos de lesión, promueven a que el microambiente sea mejor ayudando tanto en la regeneración axonal, plasticidad, crecimiento de axones corticoespinales y promueven la supervivencia neuronal (Ikeda y cols., 2002; Genç y cols., 2004; Park y Poo., 2013).

Otro marcador que nos llevo a identificar la regeneración axonal fue Neuritin, el cual se encontró inmunoreactividad en los grupos con trasplante NPP y NPP+CEMO (figura 15), además de observar la presencia de conos de crecimiento únicamente en los grupos trasplantados (figura 14). Con respecto a este marcador no existen publicaciones en modelos de sección completa; sin embargo, Sarah Busch y cols., (2010) han asociado la presencia de conos de crecimiento con regeneración de axones sensoriales en un modelo de compresión de médula espinal (Busch y cols. 2010). Por lo que para saber si en este

estudio se puede correlacionar la presencia de conos con regeneración funcional valdría la pena realizar un estudio de potenciales evocados somato sensoriales posteriormente. La importancia de utilizar el Neuritin como marcador se debe a que es una proteína glicosilada-fosfatidil-inositol, la cual es inducida por la actividad neural de las neurotrofinas BDNF y NT-3. Se sabe que el Neuritin está implicado en el crecimiento de las neuritas, además de que participa en la plasticidad neuronal (Di Giovanni y cols. 2005). En este estudio al observar la presencia de Neuritin podemos deducir que el trasplante de NNP y NPP+CEMO favorecen el crecimiento de las neuritas y la posibilidad de desarrollar plasticidad neuronal por la acción de la secreción de factores de crecimiento BDNF y NT-3 las cuales están implicadas en la activación del Neuritin (Di Giovanni, Faden, y cols., 2005; Hawryluk y cols., 2012; Naeve y cols., 1997).

Se ha visto que el utilizar CEMO favorecen la regeneración axonal y la remielinización en diferentes modelos de lesión. En el caso de remielinización, los resultados del presente trabajo, muestran mayor número de axones mielinizados analizados con PBM en los grupos trasplantados, especialmente en el segmento distal de la médula espinal a favor del grupo NPP+CEMO (figura 17), coincidiendo con lo reportado con Hu y cols (2012), quienes demostraron en un modelo de contusión, inmunizando a los animales con proteína básica de la mielina, lo que favoreció la producción de oligodendrocitos, y una mayor cantidad de axones mielinizados (Hu y cols., 2012). Resultados que se pudieron corroborar con el estudio de microscopía electrónica ya que se pudieron observar en el grupo de NPP+CEMO mayor cantidad de axones mielinizados (figura 20), siendo estos más robustos y con ramificaciones (figura 22), esto pudiese ser debido a que las CEMO son capaces de diferenciarse a células de tipo mielinizador, coincidiendo con los estudios de Akiyama y cols (2002) quienes observaron que estas ayudaban a la mielinización de los axones desnudos, mejorando el impulso nervioso (Akiyama y cols., 2002). Con lo anterior se propone que las CEMO se diferencian a células

de tipo mielinizador, además de que, conjuntamente con las células de Schwann provenientes del NPP ayuden a que exista una mejor mielinización de los axones regenerados como lo demostró Hieu y cols (2002), en un modelo de hemicordotomía, en donde después de trasplantar NPP, los axones se encontraban mielinizados por la acción de las células de Schwann.(Hieu y cols. 2002).

Se ha demostrado en el estudio, que una propuesta es el utilizar una terapia combinada, muchos investigadores se han dado a la tarea de predecir porque es mejor la utilización de terapias combinadas para el mejoramiento después de una LTME, ya que han visto que al utilizar dichas terapias aumentan factores los cuales pueden promover un mejor microambiente permisible tanto para la regeneración axonal, remielinización y mejoría de la función locomotora en diferentes modelos animales (Kadoya y cols., 2009; Tom y cols., 2009; Paul Lu y cols., 2004; García-Alías y cols.,2011). Por lo tanto se propone que el tratamiento combinado de NPP+CEMO es una estrategia terapéutica que reúne los beneficios de las células CEMO junto con los beneficios del NPP, funcionando así como una alternativa terapéutica más eficaz para la regeneración, remielinización y mejoría de la función locomotora.

## ***CONCLUSIONES.***

- ✓ El trasplante combinado de NPP+CEMOS, es una estrategia que favoreció mayor regeneración axonal, aumentando el número de fibras positivas y conos de crecimiento.
- ✓ Estos resultados reflejaron una mejoría motora al tiempo evaluación pero insuficiente, por lo que es necesario más tiempo de seguimiento, para que las modificaciones en el tejido implantado generen cambios estructurales que reflejen una mejoría funcional.
- ✓ Se cree que el tratamiento combinado favorece una mejor mielinización, debido a la interacción de las CEMO más las células de Schwann provenientes del NPP.
- ✓ Se demostró que el utilizar una terapia combinada es una estrategia favorable, ya que se promueve un microambiente óptimo para su mejoría.

## ***PERSPECTIVAS.***

- Evaluar el efecto del trasplante de NPP+CEMOS sobre la regeneración y la remielinización a diferentes tiempos (2, 4 y 6 meses) en ratas con sección completa y crónica de médula espinal.
- Evaluar el efecto del trasplante de NPP+CEMOS+coindrintinasa ABC sobre la regeneración axonal y la remielinización a diferentes tiempos (2, 4 y 6 meses) en ratas con sección completa y crónica de medula espinal.
- Analizar la función locomotora en ratas con sección completa con trasplante de NPP+CEMOS y NPP+CEMOS+Coindrintinasa ABC a diferentes tiempos (2, 4 y 6 meses).
- Observar la diferenciación de las CEMO después del trasplante a diferentes tiempos (2, 4 y 6 meses) en ratas con sección completa y crónica de medula espinal.
- Observar el efecto inmunomodulador de las CEMO a diferentes tiempos en ratas con sección completa y crónica de médula espinal.

## **BIBLIOGRAFIA:**

- Acevedo González J, C, F Varòn L, E Berbeo Calderon M, Feo Lee O, and Díaz Orduz R. 2008. “Avances Fisiopatológicos Para El Entendimiento De La Lesión Medular Traumática . Revisión Bibliográfica.” *Revista Colombiana De Ortopedia y Traumatología*: 272–281.
- Akiyama, Yukinori, Christine Radtke, and Jeffery D Kocsis. 2002. “Remyelination of the Rat Spinal Cord by Transplantation of Identified Bone Marrow Stromal Cells.” *Journal of Neuroscience* 22 (15): 6623–6630.
- Andrea, Jenny, Arévalo Romero, Diana Marcela, Páez Guerrero, Viviana Marcela, and Rodríguez Pardo. 2007. “Células Madre Mesenquimales : Características Biológicas y Aplicaciones Clínicas .” *Publicación Científica En Ciencias Biomedicas* 5 (8): 177–184.
- Bachelin, Corinne, François Lachapelle, Christelle Girard, Pierre Moissonnier, Che Serguera-Lagache, Jacques Mallet, Denys Fontaine, et al. 2005. “Efficient Myelin Repair in the Macaque Spinal Cord by Autologous Grafts of Schwann Cells.” *Brain* 128 (3) (March): 540–549.
- Bakshi, Ajay, Omar Fisher, Taner Dagci, B Timothy Himes, Itzhak Fischer, and Anthony Lowman. 2004. “Mechanically Engineered Hydrogel Scaffolds for Axonal Growth and Angiogenesis After Transplantation in Spinal Cord Injury.” *Journal Of Neurosurgery Spine* 1 (3): 322–329.
- Bouhy, Delphine, Brigitte Malgrange, Sylvie Multon, Anne-Lise Poirrier, Félix Scholtes, Jean Schoenen, and Rachelle Franzen. 2006. “Delayed GM-CSF Treatment Stimulates Axonal Regeneration and Functional Recovery in Paraplegic Rats via an Increased BDNF Expression by Endogenous Macrophages.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (8) (June): 1239–41.
- Bozorg Grayeli, Alexis, Isabelle Mosnier, Nicolas Julien, Hani El Garem, Didier Bouccara, and Olivier Sterkers. 2005. “Long-term Functional Outcome in Facial Nerve Graft by Fibrin Glue in the Temporal Bone and Cerebellopontine Angle.” *European Archives of Oto-rhino-laryngology : Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 262 (5) (May): 404–7.
- Bregman, Barbara S, Jean-Valery Coumans, Hai Ning Dai, Penelope L Kuhn, James Lyskey, Marietta McAtee, and Faheem Sandhu. 2002. “Transplants and Neurotrophic Factors Increase Regeneration and Recovery of Function After Spinal Cord Injury.” *Progress in Brain Research* 137 (0079-6123 LA - eng PT - Journal

- Article PT - Review PT - Review, Academic RN - O (Neuroprotective Agents) SB - IM): 257–273.
- Busch, Sarah a, Kevin P Horn, Fernando X Cuascut, Alicia L Hawthorne, Lianhua Bai, Robert H Miller, and Jerry Silver. 2010. “Adult NG2+ Cells Are Permissive to Neurite Outgrowth and Stabilize Sensory Axons During Macrophage-induced Axonal Dieback After Spinal Cord Injury.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (1) (January 6): 255–65.
  - Chacón, Sara Caballero, and Manuel Nieto-sampedro. 2005. “Pathophysiology of Spinal Cord Injury . A Review.” *Medicina Veterinaria* 36 (1): 75–86.
  - Chen, Jeng-Rung, Guang-Yan Cheng, Ching-Chung Sheu, Guo-Fang Tseng, Tsyrr-Jiuan Wang, and Yong-San Huang. 2008. “Transplanted Bone Marrow Stromal Cells Migrate, Differentiate and Improve Motor Function in Rats with Experimentally Induced Cerebral Stroke.” *Journal of Anatomy* 213 (3) (September): 249–58.
  - Chen, Xue, Yang Yang, Jian Yao, Weiwei Lin, Yi Li, Ying Chen, Yilu Gao, Yumin Yang, Xiaosong Gu, and Xiaodong Wang. 2011. “Bone Marrow Stromal Cells-loaded Chitosan Conduits Promote Repair of Complete Transection Injury in Rat Spinal Cord.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*.
  - Chiba, Yasuhiro, Satoshi Kuroda, Katsuhiko Maruichi, Toshiya Osanai, Masaaki Hokari, Shunsuke Yano, Hideo Shichinohe, Kazutoshi Hida, and Yoshinobu Iwasaki. 2009. “Transplanted Bone Marrow Stromal Cells Promote Axonal Regeneration and Improve Motor Function in a Rat Spinal Cord Injury Model.” *Neurosurgery* 64 (5): 991–999; discussion 999–1000.
  - CHIU, S.Y. 1988. “CHANGES IN EXCITABLE MEMBRANE PROPERTIES IN SCHWANN CELLS OF ADULT RABBIT SCIATIC NERVES FOLLOWING NERVE TRANSECTION.” *Journal Of Physiology* 396: 173–188.
  - Chopp, M, X H Zhang, Y Li, L Wang, J Chen, D Lu, M Lu, and M Rosenblum. 2000. “Spinal Cord Injury in Rat: Treatment with Bone Marrow Stromal Cell Transplantation.” *NeuroReport* 11 (13): 3001–3005.
  - Côté, Marie-Pascale, Arthi a Amin, Veronica J Tom, and John D Houle. 2011a. “Peripheral Nerve Grafts Support Regeneration After Spinal Cord Injury.” *Neurotherapeutics : the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8 (2) (April): 294–303.
  - Côté, Marie-Pascale, Arthi A Amin, Veronica J Tom, and John D Houle. 2011b. “Peripheral Nerve Grafts Support Regeneration After Spinal Cord Injury.” *Neurotherapeutics : the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8 (2) (April): 294–303.
  - Coumans, J V, T T Lin, H N Dai, L MacArthur, M McAtee, C Nash, and B S Bregman. 2001. “Axonal Regeneration and Functional Recovery After Complete Spinal Cord Transection in Rats by Delayed Treatment with Transplants and Neurotrophins.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (23) (December 1): 9334–44.

- Dam-Hieu, Phong, Song Liu, Tanvir Choudhri, Gérard Said, and Marc Tadié. 2002. "Regeneration of Primary Sensory Axons into the Adult Rat Spinal Cord via a Peripheral Nerve Graft Bridging the Lumbar Dorsal Roots to the Dorsal Column." *Journal of Neuroscience Research* 68 (3) (May 1): 293–304.
- Denny, John B. 2006. "Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-associated Protein GAP-43." *Current Neuropharmacology* 4 (4) (October): 293–304.
- Dominici, M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–317.
- Evans, Gregory R D. 2001. "Peripheral Nerve Injury : A Review and Approach to Tissue Engineered Constructs." *The Anatomical Record* 404 (January): 396–404.
- Gang, Chen, H U Yan-rong, W A N Hong, X I A Lei, L I Jun-hua, Yang Fei, Q U Xue, Wang Shen-guo, and Wang Zhong-cheng. 2010. "Functional Recovery Following Traumatic Spinal Cord Injury Mediated by a Unique Polymer Scaffold Seeded with Neural Stem Cells and Schwann Cells." *Chinese Medical Journal* 123 (30370543): 2424–2431.
- García-Alías, Guillermo, Hayk a Petrosyan, Lisa Schnell, Philip J Horner, William J Bowers, Lorne M Mendell, James W Fawcett, and Victor L Arvanian. 2011. "Chondroitinase ABC Combined with Neurotrophin NT-3 Secretion and NR2D Expression Promotes Axonal Plasticity and Functional Recovery in Rats with Lateral Hemisection of the Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (49) (December 7): 17788–99.
- Genç, Barış, P Hande Ozdinler, April E Mendoza, and Reha S Erzurumlu. 2004. "A Chemoattractant Role for NT-3 in Proprioceptive Axon Guidance." *PLoS Biology* 2 (12) (December): e403.
- Di Giovanni, Simone, Andrea De Biase, Alexander Yakovlev, Tom Finn, Jeanette Beers, Eric P Hoffman, and Alan I Faden. 2005. "In Vivo and in Vitro Characterization of Novel Neuronal Plasticity Factors Identified Following Spinal Cord Injury." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (3) (January 21): 2084–91.
- Di Giovanni, Simone, Alan I Faden, Alexander Yakovlev, Jonathan S Duke-Cohan, Tom Finn, Melissa Thouin, Susan Knobloch, Andrea De Biase, Barbara S Bregman, and Eric P Hoffman. 2005. "Neuronal Plasticity After Spinal Cord Injury: Identification of a Gene Cluster Driving Neurite Outgrowth." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (1) (January): 153–4.

- Giraldo, Juan Pablo, José Ignacio Madero, Mabel Ávila, Silvio Cuneo, Claudia López, Magally Escobar, and Jesús A Ruiz. 2003. "Las Células Madre." *Revista Colombiana De Obstetricia y Ginecología* 54 (2): 77–96.
- Gu, Weidong, Fujun Zhang, Qingsheng Xue, Zhengwen Ma, Peihua Lu, and Buwei Yu. 2010. "Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Lesion Volume and Induces Axonal Regrowth of Injured Spinal Cord." *Neuropathology Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 30 (3): 205–217.
- Guest, J D, A Rao, L Olson, M B Bunge, and R P Bunge. 1997. "The Ability of Human Schwann Cell Grafts to Promote Regeneration in the Transected Nude Rat Spinal Cord." *Experimental Neurology* 148 (2) (December): 502–522.
- Guízar-Sahagún, G, G Castañeda-Hernández, P García-López, R Franco-Bourland, I Grijalva, and I Madrazo. 1998. "Pathophysiological Mechanisms Involved in Systemic and Metabolic Alterations Secondary to Spinal Cord Injury." *Proceedings Of The Western Pharmacology Society* 41: 237–240.
- Guizar-Sahagun, G, I Grijalva, I Madrazo, R Franco-Bourland, H Salgado-Ceballos, A Ibarra, and J Larriva-Sahd. 1994. "Neuroprotection of Completely Lacerated Spinal Cord of Adult Rats by Homotopic and Heterotopic Transplantation." *Restorative Neurology and Neuroscience* 7 (2) (January 1): 61–70.
- Harvey, Alan R. 2007. "Combined Therapies in the Treatment of Neurotrauma: Polymers, Bridges and Gene Therapy in Visual System Repair." *Neurodegenerative Diseases* 4 (4): 300–305.
- Hawryluk, Gregory W J, Andrea Mothe, Jian Wang, Shelly Wang, Charles Tator, and Michael G Fehlings. 2012. "An in Vivo Characterization of Trophic Factor Production Following Neural Precursor Cell or Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Spinal Cord Injury." *Stem Cells and Development* 21 (12) (August 10): 2222–38.
- Hofstetter, C P, E J Schwarz, D Hess, J Widenfalk, A El Manira, Darwin J Prockop, and L Olson. 2002a. "Marrow Stromal Cells Form Guiding Strands in the Injured Spinal Cord and Promote Recovery." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4): 2199–2204.
- Hofstetter, C P, E J Schwarz, D Hess, J Widenfalk, a El Manira, Darwin J Prockop, and L Olson. 2002b. "Marrow Stromal Cells Form Guiding Strands in the Injured Spinal Cord and Promote Recovery." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4) (February 19): 2199–204.
- Houle, John D, Veronica J Tom, Debra Mayes, Gail Wagoner, Napoleon Phillips, and Jerry Silver. 2006. "Combining an Autologous Peripheral Nervous System 'Bridge' and Matrix Modification by Chondroitinase Allows Robust, Functional

- Regeneration Beyond a Hemisection Lesion of the Adult Rat Spinal Cord.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (28) (July 12): 7405–15.
- Hu, Jian-Guo, Lin Shen, Rui Wang, Qi-Yi Wang, Chen Zhang, Jin Xi, Shan-Feng Ma, Jian-Sheng Zhou, and He-Zuo Lü. 2012. “Effects of Olig2-Overexpressing Neural Stem Cells and Myelin Basic Protein-Activated T Cells on Recovery from Spinal Cord Injury.” *Neurotherapeutics the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (2): 422–45.
  - Ikeda, Osamu, Masazumi Murakami, Hidetoshi Ino, Masashi Yamazaki, Masao Koda, Chikao Nakayama, and Hideshige Moriya. 2002. “Effects of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) on Compression-induced Spinal Cord Injury: BDNF Attenuates Down-regulation of Superoxide Dismutase Expression and Promotes Up-regulation of Myelin Basic Protein Expression.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61 (2) (February): 142–53.
  - Jefferson, Stephanie C., Nicole J. Tester, and Dena R. Howland. 2011. “Chondroitinase ABC Promotes Recovery of Adaptive Limb Movements and Enhances Axonal Growth Caudal to a Spinal Hemisection.” *Journal of Neuroscience* 31 (15): 5710–5720.
  - Jin, Ying, Itzhak Fischer, Alan Tessler, and John D. Houle. 2002. “Transplants of Fibroblasts Genetically Modified to Express BDNF Promote Axonal Regeneration from Supraspinal Neurons Following Chronic Spinal Cord Injury.” *Experimental Neurology* 177 (1) (September): 265–275.
  - Jones, L L, M Oudega, M B Bunge, and M H Tuszynski. 2001. “Neurotrophic Factors, Cellular Bridges and Gene Therapy for Spinal Cord Injury.” *The Journal of Physiology* 533 (Pt 1) (May 15): 83–9.
  - Kadoya, Ken, Shingo Tsukada, Paul Lu, and Giovanni Coppola. 2009. “Combined Intrinsic and Extrinsic Neuronal Mechanisms Facilitate Bridging Axonal Regeneration One Year After Spinal Cord Injury.” *Neuron* 64 (2): 165–172.
  - Kobayashi, N R, D P Fan, K M Giehl, a M Bedard, S J Wiegand, and W Tetzlaff. 1997. “BDNF and NT-4/5 Prevent Atrophy of Rat Rubrospinal Neurons After Cervical Axotomy, Stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA Expression, and Promote Axonal Regeneration.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (24) (December 15): 9583–95.
  - Koda, Masao, Takahito Kamada, Masayuki Hashimoto, Masazumi Murakami, Hiroshi Shirasawa, Seiichiro Sakao, Hidetoshi Ino, et al. 2007. “Adenovirus Vector-mediated Ex Vivo Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor to Bone Marrow Stromal Cells Promotes Axonal Regeneration After Transplantation in Completely Transected Adult Rat Spinal Cord.” *European Spine Journal : Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16 (12) (December): 2206–14.

- Lacroix, S, and M H Tuszynski. 2000. "Neurotrophic Factors and Gene Therapy in Spinal Cord Injury." *Neurorehabilitation and Neural Repair* 14 (4): 265–275.
- Li, Y, P M Field, and G Raisman. 1997. "Repair of Adult Rat Corticospinal Tract by Transplants of Olfactory Ensheathing Cells." *Science* 277 (5334): 2000–2002.
- Lim, Peter a C, and Adela M Tow. 2007. "Recovery and Regeneration After Spinal Cord Injury: a Review and Summary of Recent Literature." *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 36 (1) (January): 49–57.
- Lu, P, L L Jones, and M H Tuszynski. 2005. "BDNF-expressing Marrow Stromal Cells Support Extensive Axonal Growth at Sites of Spinal Cord Injury." *Experimental Neurology* 191 (2): 344–360.
- Lu, Paul, Hong Yang, Leonard L Jones, Marie T Filbin, and Mark H Tuszynski. 2004. "Combinatorial Therapy with Neurotrophins and cAMP Promotes Axonal Regeneration Beyond Sites of Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (28) (July 14): 6402–9.
- Mackay-sim, Alan. 2005. "Olfactory Ensheathing Cells and Spinal Cord Repair." *Glia* 54 (1): 8–14.
- McKinley, William, Shane McNamee, Michelle Meade, Katrina Kandra, and Nicole Abdul. 2006. "Incidence, Etiology, and Risk Factors for Fever Following Acute Spinal Cord Injury." *The Journal of Spinal Cord Medicine* 29 (5) (January): 501–6.
- McKinley, William, Katia Santos, Michelle Meade, and Karen Brooke. 2007. "Incidence and Outcomes of Spinal Cord Injury Clinical Syndromes." *The Journal of Spinal Cord Medicine* 30 (3) (January): 215–24.
- Menovsky, T, and J F Beek. 2001. "Laser, Fibrin Glue, or Suture Repair of Peripheral Nerves: a Comparative Functional, Histological, and Morphometric Study in the Rat Sciatic Nerve." *Journal of Neurosurgery* 95 (4) (October): 694–9.
- Mirsky, Rhona, Kristjan R Jessen, Angela Brennan, David Parkinson, Ziping Dong, Carola Meier, Eric Parmantier, and Durward Lawson. 2002. "Schwann Cells as Regulators of Nerve Development." *Journal of Physiology, Paris* 96 (1-2): 17–24.
- Naeve, G S, M Ramakrishnan, R Kramer, D Hevroni, Y Citri, and L E Theill. 1997. "Neuritin: a Gene Induced by Neural Activity and Neurotrophins That Promotes Neuritogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6) (March 18): 2648–53.
- Nakae, Aya, Kunihiro Nakai, Kenji Yano, Ko Hosokawa, Masahiko Shibata, and Takashi Mashimo. 2011. "The Animal Model of Spinal Cord Injury as an Experimental Pain Model." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011 (January): 939023.
- Neuhuber, Birgit, B Timothy Himes, Jed S Shumsky, Gianluca Gallo, and Itzhak Fischer. 2005. "Axon Growth and Recovery of Function Supported by Human Bone

- Marrow Stromal Cells in the Injured Spinal Cord Exhibit Donor Variations.” *Brain Research* 1035 (1): 73–85.
- Nicole J. Tester, Dena R. Howland. 2010. “Chondroitinase ABC Improves Basic and Skilled Locomotion in Spinal Cord Injured Cats” 209 (2): 483–496.
  - Novikova, Liudmila N, Maria Brohlin, Paul J Kingham, Lev N Novikov, and Mikael Wiberg. 2011. “Neuroprotective and Growth-promoting Effects of Bone Marrow Stromal Cells After Cervical Spinal Cord Injury in Adult Rats.” *Cytotherapy* 13 (7): 873–887.
  - Ohta, Masayoshi, Yoshihisa Suzuki, Toru Noda, Yoko Ejiri, Mari Dezawa, Kazuya Kataoka, Hiroto Chou, et al. 2004. “Bone Marrow Stromal Cells Infused into the Cerebrospinal Fluid Promote Functional Recovery of the Injured Rat Spinal Cord with Reduced Cavity Formation.” *Experimental Neurology* 187 (2): 266–278.
  - Olson, Heather E, Gemma E Rooney, LouAnn Gross, Jarred J Nesbitt, Katherine E Galvin, Andrew Knight, BingKun Chen, Michael J Yaszemski, and Anthony J Windebank. 2009. “Neural Stem Cell- and Schwann Cell-loaded Biodegradable Polymer Scaffolds Support Axonal Regeneration in the Transected Spinal Cord.” *Tissue Engineering. Part A* 15 (7) (July): 1797–805.
  - Oudega, M, L D F Moon, and R J de Almeida Leme. 2005. “Schwann Cells for Spinal Cord Repair.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 38 (6) (June): 825–35.
  - Oudega, Martin, and Xiao-Ming Xu. 2006. “Schwann Cell Transplantation for Repair of the Adult Spinal Cord.” *Journal of Neurotrauma* 23 (3-4): 453–67.
  - Oyinbo, Charles Aidemise. 2011. “Secondary Injury Mechanisms in Traumatic Spinal Cord Injury: a Nugget of This Multiply Cascade.” *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 71 (2) (January): 281–99.
  - Park, Hyungju, and Mu-ming Poo. 2013. “Neurotrophin Regulation of Neural Circuit Development and Function.” *Nature Reviews. Neuroscience* 14 (1) (January): 7–23.
  - PEARSE, D.D, and M.B BUNGE. 2006. “Designing Cell- and Gene-Based Regeneration Strategies To Repair the Injured Spinal Cord.” *Journal Of Neurotrauma* 23 (3/4): 438–452.
  - Plunet, Ward, Brian K Kwon, and Wolfram Tetzlaff. 2002. “Promoting Axonal Regeneration in the Central Nervous System by Enhancing the Cell Body Response to Axotomy.” *Journal of Neuroscience Research* 68: 1–6. doi:10.1002/jnr.10176.
  - Profyris, Christos, Surindar S Cheema, DaWei Zang, Michael F Azari, Kristy Boyle, and Steven Petratos. 2004. “Degenerative and Regenerative Mechanisms Governing Spinal Cord Injury.” *Neurobiology of Disease* 15 (3) (April): 415–36.
  - Quertainmont, Renaud, Dorothée Cantinieaux, Olivier Botman, Selim Sid, Jean Schoenen, and Rachelle Franzen. 2012. “Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery After Spinal Cord Injury in Adult Rats Through Neurotrophic and Pro-angiogenic Actions.” *PloS One* 7 (6) (January): e39500.

- Ramón-Cueto, a, G W Plant, J Avila, and M B Bunge. 1998. "Long-distance Axonal Regeneration in the Transected Adult Rat Spinal Cord Is Promoted by Olfactory Ensheathing Glia Transplants." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (10) (May): 3803–15.
- Reina, Claudia Mera, Angelica Roa Lara, and sandra Ramírez Clavijo. 2007. "Células Madre Hematopoyéticas , Generalidades y Vías Implicadas En Sus Mecanismos De Auto-renovación." *Revista Ciencias De La Salud Bogota* 5 (1): 67–89.
- Rodriguez, Alberto, El Snc, Long-term Potentiation, and Long-term Depression. 2004. "Plasticidad De La Médula Espinal Regeneración Luego De La Lesión Medular." *Boletín Del Departamento De Docencia e Investigación IREP* 8 (1): 43–50.
- Sameem, Mojib, Thomas J Wood, and James R Bain. 2011. "A Systematic Review on the Use of Fibrin Glue for Peripheral Nerve Repair." *Plastic and Reconstructive Surgery* 127 (6) (June): 2381–90.
- Schwartz, Michal, Iftach Shaked, Jasmin Fisher, Tal Mizrahi, and Hadas Schori. 2003. "Protective Autoimmunity Against the Enemy Within: Fighting Glutamate Toxicity." *Trends in Neurosciences* 26 (6) (June): 297–302.
- Shepherd, Jonathan. 1994. "Fibrin Glue Topical Haemostasisfor Areas of Bleeding Large and Small Starvation in Hospital Nutrition Is Given Too Little Attention by Doctors , Nurses , and Managers." *BMJ* 308.
- Siironen, J, Y Collan, and M Röyttä. 1994. "Axonal Reinnervation Does Not Influence Schwann Cell Proliferation After Rat Sciatic Nerve Transection." *Brain Research* 654 (2) (August 22): 303–11.
- Slovinská, L, I Novotná, and D Cížková. 2011. "Chondroitinase ABC Treatment and the Phenotype of Neural Progenitor Cells Isolated from Injured Rat Spinal Cord." *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60 (4) (January): 705–8.
- Smale, K A, R Doucette, and M D Kawaja. 1996. "Implantation of Olfactory Ensheathing Cells in the Adult Rat Brain Following Fimbria-fornix Transection." *Experimental Neurology* 137 (2): 225–233.
- Song, Xing-Yun, Fang Li, Feng-He Zhang, Jin-Hua Zhong, and Xin-Fu Zhou. 2008. "Peripherally-derived BDNF Promotes Regeneration of Ascending Sensory Neurons After Spinal Cord Injury." *PloS One* 3 (3) (January): e1707.
- Storer, P. 2003. "βli-tubulin and GAP 43 mRNA Expression in Chronically Injured Neurons of the Red Nucleus After a Second Spinal Cord Injury." *Experimental Neurology* 183 (2) (October): 537–547.
- Taylor, Laura, Leonard Jones, Mark H Tuszynski, and Armin Blesch. 2006. "Neurotrophin-3 Gradients Established by Lentiviral Gene Delivery Promote Short-distance Axonal Bridging Beyond Cellular Grafts in the Injured Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (38) (September 20): 9713–21.

- Tobias, C.a, J.S Shumsky, M Shibata, M.H Tuszynski, I Fischer, a Tessler, and M Murray. 2003. "Delayed Grafting of BDNF and NT-3 Producing Fibroblasts into the Injured Spinal Cord Stimulates Sprouting, Partially Rescues Axotomized Red Nucleus Neurons from Loss and Atrophy, and Provides Limited Regeneration." *Experimental Neurology* 184 (1) (November): 97–113.
- Tom, Veronica J, Harra R Sandrow-Feinberg, Kassi Miller, Lauren Santi, Theresa Connors, Michel a Lemay, and John D Houlié. 2009. "Combining Peripheral Nerve Grafts and Chondroitinase Promotes Functional Axonal Regeneration in the Chronically Injured Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (47) (November 25): 14881–90.
- Trento, Cristina, and Francesco Dazzi. 2010. "Mesenchymal Stem Cells and Innate Tolerance: Biology and Clinical Applications." *Swiss Medical Weekly* 140 (November) (January): w13121.
- Tse, Raymond, and Jason H Ko. 2012. "Nerve Glue for Upper Extremity Reconstruction." *Hand Clinics* 28 (4) (November): 529–40.
- Vaquero, J, and M Zurita. 2009. "Bone Marrow Stromal Cells for Spinal Cord Repair: a Challenge for Contemporary Neurobiology." *Histology and Histopathology* 24 (1): 107–116.
- Vaquero, Jesús, and Mercedes Zurita. 2011. "Functional Recovery After Severe CNS Trauma: Current Perspectives for Cell Therapy with Bone Marrow Stromal Cells." *Progress in Neurobiology* 93 (3): 341–349.
- Vaquero, Jesús, Mercedes Zurita, Santiago Oya, and Martín Santos. 2006. "Cell Therapy Using Bone Marrow Stromal Cells in Chronic Paraplegic Rats: Systemic or Local Administration?" *Neuroscience Letters* 398 (1-2): 129–134.
- Watt, Fiona M, and Ryan R Driskell. 2010. "The Therapeutic Potential of Stem Cells." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1537) (January 12): 155–63.
- Woodbury, D, E J Schwarz, D J Prockop, and I B Black. 2000. "Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons." *Journal of Neuroscience Research* 61 (4) (August 15): 364–70.
- Wu, Sufan, Yoshihisa Suzuki, Yoko Ejiri, Toru Noda, Hongliang Bai, Masaaki Kitada, Kazuya Kataoka, Masayoshi Ohta, Hiroto Chou, and Chizuka Ide. 2003. "Bone Marrow Stromal Cells Enhance Differentiation of Cocultured Neurosphere Cells and Promote Regeneration of Injured Spinal Cord." *Journal of Neuroscience Research* 72 (3): 343–351.
- Wyndaele, M, and J-J Wyndaele. 2006. "Incidence, Prevalence and Epidemiology of Spinal Cord Injury: What Learns a Worldwide Literature Survey?" *Spinal Cord* 44 (9) (September): 523–9.
- Xiao, Junhua, Agnes W Wong, Melanie M Willingham, Selma K Kaasinen, Ian a Hendry, Jason Howitt, Ulrich Putz, Graham L Barrett, Trevor J Kilpatrick, and Simon S Murray. 2009. "BDNF Exerts Contrasting Effects on Peripheral Myelination of

- NGF-dependent and BDNF-dependent DRG Neurons.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (13) (April 1): 4016–22.
- Xu, X M, a Chen, V Guénard, N Kleitman, and M B Bunge. 1997. “Bridging Schwann Cell Transplants Promote Axonal Regeneration from Both the Rostral and Caudal Stumps of Transected Adult Rat Spinal Cord.” *Journal of Neurocytology* 26 (1) (January): 1–16.
  - Yoshida, Yuichiro, Hideo Kataoka, Tsukasa Kanchiku, Hidenori Suzuki, Yasuaki Imajyo, Hidetoyo Kato, and Toshihiko Taguchi. 2013. “Transection Method for Shortening the Rat Spine and Spinal Cord.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 5 (2) (February): 384–388.
  - Yuan, Qiuju, Bing Hu, Huanxing Su, Kwok-Fai So, Zhixiu Lin, and Wutian Wu. 2009. “GAP-43 Expression Correlates with Spinal Motoneuron Regeneration Following Root Avulsion.” *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury* 4 (January): 18.
  - Zurita, M, C Aguayo, C Bonilla, and J Vaquero. 2007. “Co-cultivo De Células Madre Adultas Mesenquimales y Células De Schwann En Presencia De Membranas De Policarbonato.” *Neuroscience Letters* 5 (2): 103–109.
  - Zurita, Mercedes, and Jesús Vaquero. 2004. “Functional Recovery in Chronic Paraplegia After Bone Marrow Stromal Cells Transplantation.” *NeuroReport* 15 (7): 1105–1108.
  - Zurita, Mercedes, Jesús Vaquero, Celia Bonilla, Martín Santos, Javier De Haro, Santiago Oya, and Concepción Aguayo. 2008. “Functional Recovery of Chronic Paraplegic Pigs After Autologous Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells.” *Transplantation* 86 (6): 845–853.