



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL.

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVIOS PERIFÉRICOS PREDEGENERADOS SOBRE EL RECRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS.

PRESENTA:

M en C. VINNITSA BUZOIANU ANGUIANO.

TUTOR PRINCIPAL.

DR. ISRAEL GRIJALVA OTERO (IMSS).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR.

DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS).

DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ (IMSS).

Ciudad Universitaria CDMX, Marzo 2019.



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 al posgrado de ciencias de la producción y de la salud animal, por el apoyo académico que me brindaron.



La alumna recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, con el número de becario 335507.



Durante la realización de este proyecto se recibió financiamiento del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS con el número de registro R-2014-3601-9. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas UMIEN.



Quiero agradecer primero a los animales que nos ayudaron a realizar este proyecto ya que sin ellos no hubiéramos 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, por sus consejos para seguir adelante y esforzarme cada día más 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 consejos que me ha brindado y sobre todo por la confianza que me dio para realizar todos mis trabajos.

A la Dra. Angélica Zepeda Rivera por participar en mi comité tutorial. Por su apoyo, consejos que me brindó durante todo este proceso.

A los doctores participantes del comité evaluador: Dra. Sara Caballero Chacón, Dr. Rudolf Marinus Buijs y a la Dra. Leticia Verdugo Díaz.

Quiero agradecer a la Dra. Sara Caballero Chacón por el apoyo y su amistad que me ha brindado durante mi desarrollo en esta etapa, y los consejos que me brindó durante la realización del proyecto.

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada, por todo su apoyo y amistad que me ha brindado durante todo este tiempo, y la ayuda que me proporciono para realizar mi proyecto.

Al Dr. Gabriel Guízar Sahagún por su apoyo y sus buenos consejos que me ayudaron durante la realización del proyecto.

Al Dr. Vadim Pérez Koldenkova del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada LNMA, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, por su apoyo en el uso del microscopio confocal y en adquisición de datos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

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, por animarme en situaciones difíciles y sé que siempre confiara en mí, y en mis decisiones. Sé que siempre estas orgulloso de mí y te doy las gracias por estar siempre a mi lado, gracias papá te quiero mucho.

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 desvelos, gracias porque siempre has estado orgullosa de mí y por todos tus consejos que me das y gracias porque sé que siempre me va a poyar gracias te quiero mucho.

A mi tía Diana por todo el cariño y amor que me ha dado y su comprensión.

A mis hermanos Janeth, Iván, Berenice y Yaxkin, se las dedico con todo mi corazón porque cada uno a su forma me ha apoyado y me ha alentado a continuar y nunca rendirme ante situaciones difíciles. Porque somos unidos y eso fortalece nuestra conexión como hermanos, los quiero mucho.

A mis cuñados Elideth, Eliseo y Dolores por su cariño que siempre me han demostrado y apoyo incondicional.

A mi sobrina Edna que eres como una hermana para mí, gracias por tu apoyo incondicional, comprensión y cariño que me tienes, siempre estaré contigo.

A mis sobrinos, Giovanni, Marco y Joana por el cariño que me tienen y que más que sobrinos somos hermanos los quiero.

A mis sobrinos, Santiago, Iker, Rodrigo, Fernando, Helena, Arturo y Ximena por su cariño y amor que me dan.

A Arturo por el cariño que me ha brindado, y por querer y cuidar a una persona que es muy importante para mí. Te agradezco también las buenas charlas sobre ciencia que hemos llegado a tener.

Gracias a mi abuela Magdalena, por todo su cariño que me brindo, aunque ya no está conmigo siempre me apoyo y alentó.

A las Dras., Hermelinda Salgado, Iris Feria y Patricia Campos porque me han apoyado durante mi trabajo en el laboratorio, y porque también me han brindado su cariño.

A Carmelita y David por el apoyo incondicional que me han brindado.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, Stephie, Rodrigo, Eduardo, Josué, Katia, y Angélica, 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.

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVIOS PERIFÉRICOS PREDEGENERADOS SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

A Berenice, por su apoyo incondicional en todos los momentos de estrés y felicidad que he tenido.

A mis alumnos Jared, Gabby, Mayra y Zaira porque me han ayudado en este trabajo y aguantarme en los momentos de estrés, los quiero niños.

Y gracias a mis grandes y mejores amigas Elisa e Iris, por su gran apoyo que me han brindado todo este tiempo, consejos y ayuda incondicional y por su gran amistad que es lo más valioso e importante para mí gracias, las quiero mucho.

GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE.

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.1	ANATOMIA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	3
3.2	LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL.....	15
3.3	MODELOS DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL.....	16
4.	EVENTOS SECUNDARIOS.....	19
4.1	FASE AGUDA.....	19
4.2.	FASE SUB-AGUDA.....	23
4.3	FASE CRÓNICA.....	26
5.	PROCESOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO AXONAL.....	27
5.1.	INHIBIDORES ASOCIADOS A MIELINA.....	27
5.2.	CICATRIZ FIBROGLIAL.....	33
5.3.	PROTEÍNAS REPELENTES DEL CRECIMIENTO AXONAL.....	34
5.4	MOLÉCULAS DE INHIBICIÓN ASOCIADAS A LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	36
6.	PROCESOS DE CRECIMIENTO AXONAL.....	41
6.1	MECANISMOS DE PROYECCIÓN AXONAL.....	42

6.2	REGULACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN Y DESPOLIMERIZACIÓN.....	44
6.3	TRANSPORTE AXONAL.....	46
6.4	PROTEINAS FRAGMENTADORAS Y DESESTABILIZADORAS.....	47
6.5	PROTEINAS ESTRUCTURALES.....	48
6.6	PROTEINAS QUIMIOATRAYENTES Y REPULSIVAS PARA EL CRECIMIENTO AXONAL.....	51
7.	FASCICULACIÓN.....	58
8.	ANTECEDENTES.....	59
8.1	ESTRATEGIAS PARA LA REINERVIACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DE UNA LESIÓN.....	59
9.	ESTRATEGIAS PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO AXONAL Y LA MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA.....	60
9.1	TRATAMIENTOS SIMPLES.....	61
9.1.1	ESTRATEGIAS PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO ATRAVÉS DE PUENTES. TRASPLANTES DE TEJIDO FETAL.....	61
9.1.2	USO DE PUENTES DE NERVI PERIFÉRICO.....	61
9.1.3	USO DE PUENTES INERTES.....	62
9.2	TRASPLANTE DE CÉLULAS.....	63
9.2.1	USO DE CÉLULAS DE SCHWANN.....	64
9.2.2	USO DE CÉLULAS ENVOLVENTES DE GLÍA OLFATORIA OEG.....	66
9.2.3	TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES.....	67

9.2.4 CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS.....	69
9.2.5 CÉLULAS TRONCALES ADULTAS.....	71
9.3 USO DE FACTORES EXÓGENOS.....	73
9.4 USO DE FARMACOS EN LTME.....	75
10. TRATAMIENTOS COMBINADOS.....	77
11. JUSTIFICACIÓN.....	78
12. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	79
13. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	80
14. HIPOTESIS.....	80
15. OBJETIVO GENERAL.....	80
16. OBJETIVOS PARTICULARES.....	81
17. DISEÑO ESPERIMENTAL.....	82
18. METODOLOGÍA.....	83
18.1 CULTIVO CELULAR.....	83
18.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	84
18.3 EVALUACIÓN FUNCIONAL.....	86
18.4 REGISTRO CINEMATICO DE LA MARCHA.....	86
18.5 ANALISIS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA.....	87
18.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	88

18.7	ANÁLISIS DE LA REGENERACIÓN AXONAL MEDIANTE LA DETECCIÓN DE NEUROTRAZADORES.....	89
18.8	ANALISIS ESTADISTICO.....	91
19.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	91
20.	RESULTADOS.....	92
20.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEMO.....	92
20.2	ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	93
20.3	CRECIMIENTO AXONAL.....	95
20.4	Cuantificación de la densidad de fluorescencia para GAP-43 y MAP-1B.....	100
20.5	Regeneración axonal.....	102
20.6	Efecto de diferenciación de CEMO a GFAP+, p75 y MAP-1B.....	105
20.7	Mielinización.....	107
20.8	Mejoría de la función locomotora.....	112
21.	DISCUSIÓN.....	117
21.1	EFEECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y REGENERACIÓN AXONAL.....	117
21.2	REMIELINIZACIÓN.....	121
21.3	EFEECTO SOBRE LA MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA.....	122

22. CONCLUSIÓN.....	126
23. REFERENCIAS.....	127-154

FIGURAS.

i. Figura 1. Esquema de los segmentos medulares en humano.....	4
ii. Figura 2. Esquema de la Médula Espinal. Corte transversal.....	5
iii. Figura 3. Esquema de las Láminas de Rexed de la Médula Espinal.....	10
iv. Figura 4. Tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal.....	15
v. Figura 5. Mecanismo de depleción del ATP en el proceso isquémico después de una LTME.....	20
vi. Figura 6. Mecanismo de neurotoxicidad por glutamato.....	24
vii. Figura 7. Estructura de la proteína Nogo A.....	28
viii. Figura 8. Esquema de la Glicoproteína asociada a la mielina (MAG).....	29
ix. Figura 9. Esquema de la glicoproteína de mielina asociada a los oligodendrocitos.....	30
x. Figura 10. Estructura de la unión ligando Receptor de las proteínas de mielina.....	32
xí. Figura 11. Esquema de la formación de la cicatriz fibroglial.....	34

xii.	Figura 12.	Activación de la molécula RGMa mediante la vía Rho.....	36
xiii.	Figura 13.	Esquema de las familias de los CSPG.....	38
xiv.	Figura 14.	Activación de los CSPG por la vía Rho.....	39
xv.	Figura 15.	Estructura del axón.....	42
xvi.	Figura 16.	Estructura del cono de crecimiento.....	43
xvii.	Figura 17.	Esquema de las proteínas y sus receptores.....	58
xviii.	Figura 18.	Esquema de las estrategias propuestas para la reinervación después de una lesión de médula espinal.....	60
xix.	Figura 19.	Formación y Diferenciación de las células de Schwann.....	64
xx.	Figura 20.	Origen de las células troncales.....	68
xxi.	Figura 21.	Caracterización de las CEMO con citometría de flujo.....	92
xxii.	Figura 22.	Microfotografía de la Médula Espinal de ratas por la técnica Tricrómica de Masón tres meses después de tratamiento.....	94
xxiii.	Figura 23.	Expresión de GAP-43 en médula espinal.....	96-97
xxiv.	Figura 24.	Expresión de GAP-43 en la zona de trasplante.....	97
xxv.	Figura 25.	Expresión de MAP-1B en médula espinal.....	98-99
xxvi.	Figura 26.	Expresión de MAP-1B en la zona de trasplante.....	99

xxvii.	Figura 27. Regeneración axonal.....	103-104
xxviii.	Figura 28. Marcaje de fibras en la zona de trasplante con neurotrazadores.....	104
xxix.	Figura 29. Expresión de GFAP, p75 y MAP-1B en CEMO en médula espinal.....	106-107
xxx.	Figura 30. Expresión de PBM en médula espinal.....	108-109
xxxí.	Figura 31. Expresión de PBM en la zona de trasplante.....	109-110
xxxii.	Figura 32. Electromicroscopía de la médula espinal en la zona del epicentro.....	111-112
xxxiii.	Figura 33. Esquema de la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora con tratamientos simples y combinados.....	125-126

TABLAS Y GRÁFICAS

i.	Tabla 1. Láminas de Rexed. Organización y función.....	6-10
ii.	Tabla 2. Tractos ascendentes de la médula espinal.....	11-12
iii.	Tabla 3. Tractos Descendentes de la Médula Espinal.....	13-14
iv.	Grafica 1. Causas de Lesión Traumática de Médula Espinal.....	16
v.	Gráfica 2. Cuantificación de la Intensidad de la fluorescencia de GAP-43.....	101
vi.	Gráfica 3. Cuantificación de la Intensidad de fluorescencia de MAP-1B.....	102
vii.	Gráfica 4. Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de PBM.....	110

viii.	Gráfica 5. Recuperación de la función locomotora.....	113
ix.	Gráfica 6. Amplitud del movimiento pendular.....	114
x.	Gráfica 7. Movimiento del péndulo de la zancada.....	115
xi.	Gráfica 8. Registro de la Cinemático de la Marcha.....	116

ABREVIATURAS.

- ATP adenosin trifosfato.
- AMPA α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico.
- ATS segmento inicial del axón.
- 4-ap 4- aminopiridina.
- BDNF factor de crecimiento derivado de cerebro.
- BBB escala de evaluación motora.
- bFGF factor de crecimiento de fibroblastos básico.
- CA²⁺ calcio.
- CAMs moléculas de adhesión de células endoteliales.
- C3 ligando del receptor del complemento 3.
- CRMP₂ proteína mediadora de la respuesta a la colapsina 2.
- CSPG proteoglicano del controitinsulfato.
- CRMP proteína mediadora a la respuesta de la colapsina.
- CEMO células estromales de médula ósea.
- Cs células de Schwann.
- CEG células embrionarias germinales.
- ChABC condroitinasa ABC.
- CSF factor estimulante de colonias.
- DSGP proteoglicano dermatan sulfato.
- DAG diacilglicerol.
- ERH receptores a efrinas.
- ESCs células troncales embrionarias.
- ePISC células troncales derivadas del epiblasto.
- FGF factor de crecimiento de fibroblastos.
- GPI glicasil-fosfatidil-inositol.
- GTP guanosin trisfosfato.

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

- ✚ GAG glucosaminglicanos.
- ✚ GDP guanosin difosfato.
- ✚ GDNF factor de crecimiento derivado de células gliales.
- ✚ HSCs células hematopoyéticas troncales.
- ✚ HGF factor de crecimiento de hepatocitos.
- ✚ HSPG proteoglicano heparán sulfato.
- ✚ IL-1 α interleucina 1 alfa
- ✚ IL-1 β interleucina 1 beta.
- ✚ IL-6 interleucina 6.
- ✚ iNOS sintasa inducible del óxido nítrico.
- ✚ IL-8 interleucina 8.
- ✚ INF- γ interferón gamma.
- ✚ IP₃ fosfatidil inositol 3.
- ✚ iPSCs células troncales inducidas.
- ✚ ISCT sociedad internacional de terapia celular.
- ✚ IDO idolamina 2-3- dioxigenasa.
- ✚ I.P intraperitoneal
- ✚ KSGP proteoglicano keratan sulfato.
- ✚ LTME lesión traumática de médula espinal.
- ✚ M.E médula espinal.
- ✚ MIP α y β proteínas inflamatorias de macrófagos.
- ✚ MAG glicoproteína asociada a la mielina.
- ✚ MCL cadena ligera de miosina.
- ✚ MTS microtúbulos.
- ✚ MAP proteína asociada a microtúbulos.
- ✚ MAPCs células adultas progenitoras multipotentes.
- ✚ MCP proteína quimioatrayente de monocitos.
- ✚ MPP metil prednisolona.
- ✚ MEM dubelcco's Modified Eagle.
- ✚ NMDA n-metil-de-aspartato.
- ✚ NFkB factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- ✚ NPP nervio periférico predegenerado.
- ✚ NF nervio fresco.
- ✚ NT-3 neurotrofina 3.

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

- ✚ NT4/5 neurotrofina 4/5.
- ✚ NPCs células troncales progenitoras neurales.
- ✚ NGF factor de crecimiento derivado de nervio.
- ✚ OMgP glicoproteína de mielina asociada a oligodendrocitos.
- ✚ OEG células envolventes de glía olfatoria.
- ✚ P75 receptor a neurotrofina.
- ✚ PNH primates no humanos.
- ✚ ROS especies reactivas de oxígeno.
- ✚ RTN reticulón.
- ✚ RGM molécula repelente de la guía axonal.
- ✚ SNC sistema nervioso central.
- ✚ SNP sistema nervioso periférico.
- ✚ SDF-1 factor derivado de células estromales.
- ✚ SFB suero fetal bovino.
- ✚ TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
- ✚ TC terapia celular.
- ✚ UCBCs células sanguíneas del cordón umbilical.
- ✚ VEGF factor de crecimiento endotelial vascular.
- ✚ V.O. vía oral

1. RESUMEN

La capacidad regenerativa del sistema nervioso central (SNC) es limitada después de una lesión traumática de médula espinal (LTME), debido a factores intrínsecos y extrínsecos que inhiben el crecimiento axonal, limitando así a la función locomotora. Se ha demostrado, que estrategias como los puentes de nervio periférico predegenerado (NPP), el uso de células estromales de médula ósea (CEMO) o moléculas exógenas como la condroitinasa ABC (ChABC), promueven el crecimiento axonal y la remielinización, favoreciendo así, una mejoría de la función locomotora. Estos tratamientos se han probado principalmente en modelos de lesión aguda. En lesiones crónicas existen pocos estudios relacionados con tratamientos combinados para favorecer la recuperación motora. El objetivo de este trabajo, fue evaluar el tratamiento mediante la combinación de ChABC, NPP y CEMO sobre el crecimiento axonal, mielinización y evolución de la función locomotora en un modelo de rata con sección completa crónica de médula espinal (ME). Se realizó la lesión a nivel de T9, un mes después se hicieron 5 grupos de tratamiento: animales solo con lesión (control); trasplante de CEMO; trasplante de NPP; trasplante NPP+CEMO y trasplante de NPP+CEMO+ChABC. Se observó que los animales con tratamientos combinados (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC) tuvieron mayor crecimiento axonal, con un incremento de la expresión de GAP-43 y MAP-1B en fibras axónicas, además de mayor mielinización (mayor expresión de la proteína básica de la mielina), en comparación con el control y con los tratamientos únicos (NPP y CEMO). Esto se tradujo en una mejoría de la función locomotora (con un puntaje de 4 en la la escala de la BBB modificada). Nuestros resultados sugieren que las terapias combinadas favorecen un incremento en la regeneración axonal, remielinización y mejoría de la función locomotora después de una LTME crónica, llegando a ser una estrategia favorable para estudios pre-clínicos.

2. ABSTRACT.

Regenerative capability of the central nervous system (CNS) is limited after a traumatic spinal cord injury (TSCI) due to intrinsic and extrinsic factors that inhibit axonal growth, thus, resulting in a limitation of locomotor function. It has been shown that strategies such as pre-degenerated peripheral nerve grafts (PPN), the use of bone marrow stromal cells (BMSCs) or exogenous molecules such as chondroitinase ABC (ChABC), promote axonal growth and remyelination, resulting in an improvement of locomotor function. These treatments have been primarily proven in acute injury models. In chronic injuries, there are just a few studies related to combined treatments improving locomotor function. The aim of this study is to evaluate axonal growth, myelination and the evolution of locomotor function after the administration of combined treatment with ChABC, PPN, and BMSCs in a spinal cord complete transection rat model. The transection was done at T9. One month later, 5 groups of treatment were done; animals with the injury (control group), BMSCs transplant; PPN transplant, PPN+BMSCs transplant, and PPN+BMSCs+ChABC. In comparison to control and single-treatment groups (PPN and BMSCs), combined treatment groups (PPN+BMSCs, and PPN+BMSCs+ChABC) had a greater axonal growth with an increase in GAP-43 and MAP-1B expression in axonal fibers, besides of major myelination (expression of basic myelin protein), which led to an improvement in locomotor function. Our results suggest that combined therapies stimulate axonal regeneration, remyelination, and an improvement of locomotor function after chronic TSCI resulting in a favorable strategy for pre-clinical studies.

3. INTRODUCCIÓN:

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 debido a la baja regeneración celular y axonal, que es secundaria al bloqueo que ejercen los glicosaminoglicanos, entre otros factores. Hasta la fecha, no existe algún tratamiento eficaz para la fase aguda como en crónica, a pesar de haber probado diferentes tratamientos como: la utilización de fármacos, trasplante de tejidos, trasplante de células y utilización de factores exógenos.

3.1 ANATOMÍA DE LA MÉDULA ESPINAL

La ME se extiende desde el agujero magno, hasta el nivel de la primera o segunda vértebra lumbar. Muestra dos engrosamientos el ensanchamiento braquial (C3-T2) y el ensanchamiento toracolumbar (T10-L2). En el extremo caudal de la médula se forma el cono medular; la SE ME fija mediante el filamento terminal, que se extiende a partir del cono medular al coxis.

En el humano la ME está compuesta por 31 segmentos: 8 Cervicales, 12 Torácicas, 5 Lumbares, 5 Sacros y 1 Coxígeo (Figura 1).

En las ratas la ME está compuesta por 34 segmentos: 8 Cervicales, 13 Torácicas, 6 Lumbares, 4 Sacras y 2 Coxígeos.

EFFECTO DE LA CONDRINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

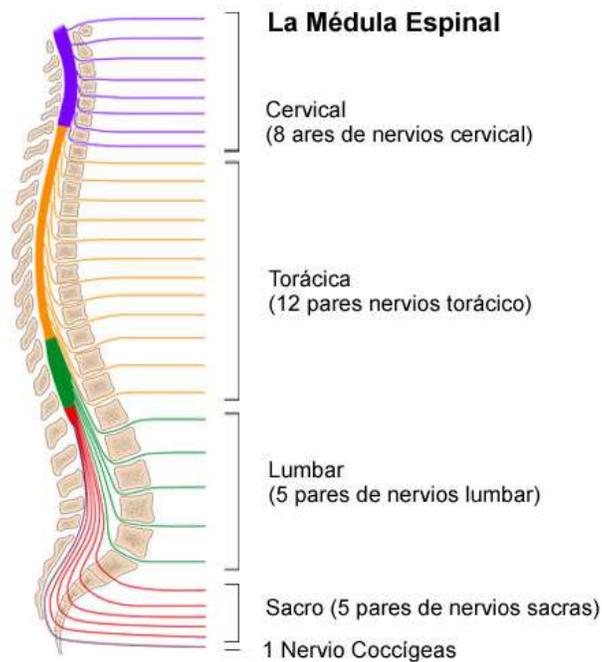


Figura 1. Esquema de los segmentos medulares en humano.

<http://healthcare.utah.edu/healthlibrary/related/doc.php?type=90&id=P05700>

La ME está recubierta por tres capas de meninges: la piamadre, aracnoides y la duramadre. La piamadre se compone de una capa membranosa interna (la pía interna) y otra superficial (la pía externa o epipia), la pía interna, está adherida de modo estrecho a la superficie de la médula espinal; la epipia está formada por los vasos sanguíneos, que irrigan y drenan a la ME. La aracnoides es la capa más adherida a la dura madre, el espacio entre estas es muy estrecho, y se le conoce como espacio subdural.

En un corte transversal la ME, está conformada de sustancia gris, en forma de H o mariposa extendida en el centro, la cual, está rodeada por la sustancia blanca. En la sustancia gris, se encuentran todos los cuerpos celulares de neuronas y células gliales y en la sustancia blanca podemos encontrar las fibras axonales. Las dos mitades de la ME están separadas por el tabique mediano dorsal y la fisura mediana ventral. También existe una estructura llamada surco

EFFECTO DE LA CONDRINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

dorsolateral, por donde entran las fibras de la raíz dorsal; y el sitio de salida de las raíces ventrales, es el surco ventrolateral.

La sustancia gris que forma una H, se divide en un asta dorsal, que es la parte más pequeña, y un asta ventral, que es la parte más ancha de la H. El asta o columna dorsal, es la zona que recibe los axones de los ganglios de la raíz dorsal, y contiene células relacionadas con funciones sensoriales. El asta ventral o columna ventral, contiene neuronas motoras multipolares, cuyos axones constituyen el principal componente de la raíz ventral (Figura 2).

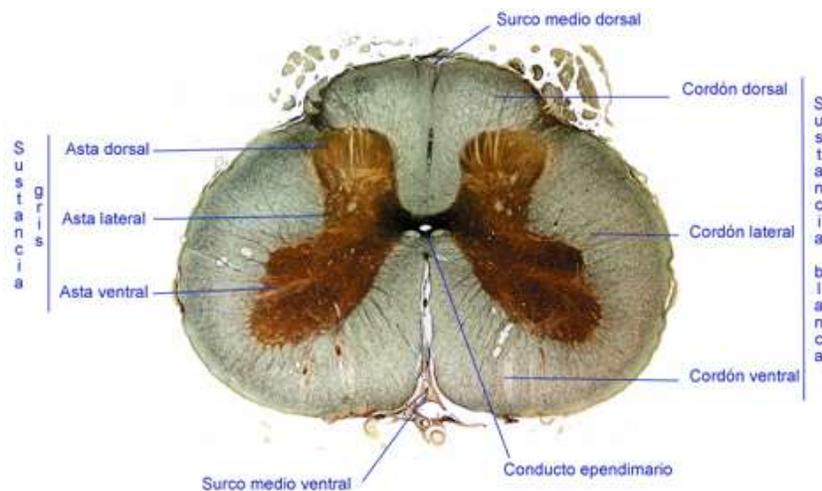


Figura 2. Esquema de la Médula Espinal. Corte transversal. https://curiosoando.com/wp-content/uploads/2014/10/corte_medula_espinal.jpg

Además de las estructuras, la sustancia gris de la ME está dividida en 10 zonas o láminas de Rexed (Figura 3). Las láminas de I a IV, son zonas relacionadas con las sensaciones exteroceptivas; las láminas V y VI, se relacionan con sensaciones propioceptivas. La lámina VII actúa como, un relevo entre el mesencéfalo y el cerebelo. La lámina VIII, modula la actividad motora, a través de neuronas tipo gamma. La lámina IX, es la principal área motora de la ME. Está zona, contiene neuronas alfa y gamma, las cuales están, dispuestas en columnas (dorsolateral, ventrolateral,

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

ventromedial y medial). Las neuronas motoras de esta zona, reciben aferencias directas de las raíces dorsolaterales (para reflejos espinales), y vías descendentes relacionadas al control motor. La lámina X, es la zona la cual rodea al conducto central, contiene comisuras ventrales, dorsales y la sustancia central gelatinosa. Las neuronas de esta región, reciben aferencias somáticas, viscerales y nociceptivas (Tabla 1).

LAMINAS	CITOARQUITECTURA	CONEXIONES	FUNCION
Lamina 1	Capa más delgada que recubre la zona marginal dorsal del cuerno dorsal. Esta zona, las neuronas están clasificadas en 4 tipos diferentes: Fusiformes, Multipolar, Aplanadas y Piramidales.	Las neuronas de esta, reciben los impulsos de fibras de pequeño diámetro (Fibras A δ , y Fibras C) que inervan en piel, músculos. Estas fibras viajan por las raíces dorsales hasta la lámina 1. Llevan información sobre la temperatura y dolor.	Las neuronas de esta zona están clasificadas por su función en tres tipos: Neuronas específicas Nociceptivas; Nociceptivas polimodal y neuronas termoreceptivas específicas.
Lamina 2	Es conocida como sustancia gelatinosa. Está formada por una zona dorsal externa y una zona ventral interna. Hay dos tipos de células: células de islote y estrelladas. Las células islote están ubicadas en la parte central de la lámina 2, tienen muy pocas espinas dendríticas. Las células estrelladas son las más encontradas en la lámina 2; tienen una forma redonda u ovalada y sus árboles dendríticos están	Principal zona de terminaciones aferentes de las raíces dorsales (fibras A- δ , y fibras C).	La principal función de las neuronas de esta lámina es modular la transmisión nociceptiva del asta dorsal. Las neuronas de la zona externa, responden a intensos estímulos nociceptivos, y las neuronas de la capa interna, son células mecanoreceptoras y responden a estímulo mecánico.

EFEECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

	en dirección ventral.		
Lamina 3	Es una capa muy delgada, puede ser distinguida porque tiene fibras mielinizadas. Las células pueden tener formas redondas y elongadas. Existe dos formas de dendritas: 1) neuronas con árboles dendríticos que se extienden a lo largo del eje rostro caudal. 2) neuronas con dendritas orientadas dorsoventralmente.	Esta zona recibe fibras aferentes cutáneas de gran diámetro de tipo A-β, también fibras de diámetros pequeños principalmente A-δ, las cuales inervan en el cabello.	Las neuronas de esta zona poseen un receptor NK1 (receptor a la sustancia P). Las neuronas pueden recibir estímulos táctiles y otras pueden ser estimuladas mediante una presión.
Lamina 4	Esta lámina es más delgada que la lámina 3, está rodeada por la sustancia blanca medial y lateral. Podemos encontrar el núcleo de Clarke. Contiene 4 tipos de neuronas de diferentes tamaños y formas. Todas se caracterizan porque sus dendritas tienen forma de antena y están orientados dorsalmente.	Esta zona recibe información no-nocioceptivas, y proyecciones de los tractos: < Espinocerebelar. < Espinohipotalámico. < Espinomesencefalico. < Espinotalámico.	Las neuronas de esta zona responden a pequeños estímulos mecánicos.
Lamina 5	Esta lámina está localizada en el cuello del asta dorsal, está caracterizada por la presencia de fibras	Recibe directamente impulsos de fibras mielinizadas largas A-β y pequeñas A-δ. La mayoría de sus proyecciones están encontradas en la zona	Hay neuronas multireceptivas, las cuales tienen largos cuerpos, con dendritas que se extienden en cualquier dirección.

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

	<p>delgadas, las cuales se encuentran a lo largo de la parte media lateral. Existen diferentes tipos de neuronas, las cuales se diferencian por su tamaño y forma; sus dendritas generalmente están dispuestas dorsoventralmente.</p> <p>Puede dividirse en dos zonas: la zona medial y la zona lateral. En la zona medial se encuentran las células de menor tamaño, y en la zona lateral se encuentran neuronas de mayor tamaño.</p>	<p>medial, conectando al área supraespinal (cerebelo, núcleo de a columna dorsal, medula rostromedial, núcleo parabraquial.</p> <p>Las células de la zona lateral, son neuronas espinales preganglionares, donde pasan principalmente las vías aferentes viscerales.</p>	<p>Las células de tipo nociceptivas, son pequeñas con sus dendritas muy similares.</p> <p>Las células de tipo mecanoreceptoras tienen amplios árboles dendríticos.</p>
Lámina 6	<p>Es una zona más gruesa y de apariencia más compacta. Puede dividirse en dos zonas; medial y lateral.</p> <p>Hay dos tipos de células; las células de tamaño pequeño las cuales pueden tener formas elongadas. Las de tamaño grande las cuales pueden ser de forma estrelladas, sus dendritas generalmente están dispuestas dorsoventralmente.</p>	<p>Recibe proyecciones nociceptivas y cutáneas, también pueden recibir proyecciones descendientes de neuronas del núcleo rojo.</p>	<p>La principal función de las células, es actuar como interneuronas las cuales ayudan a la vía refleja.</p>

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

Lamina 7	Esta zona corresponde al área central de la sustancia gris, conocida como sustancia gris intermedia. Hay diferentes tipos de neuronas: triangulares, multipolares, fusiformes. Sus dendritas pueden extenderse principalmente en el plano mediolateral.	Las proyecciones se conectan como interneuronas, involucran en funciones motoras; incluyendo corteza motora, núcleo rojo. También pueden recibir pequeñas proyecciones de tractos aferentes primarias.	Actúan como interneuronas las cuales se pueden conectar a las vías descendentes motoras las cuales son controladas por las motoneuronas.
Lamina 8	Esta zona se extiende a través del cuerno ventral. Hay diferentes tipos de células, en formas y tamaño, algunas parecidas a las motoneuronas. Sus dendritas están orientadas dorsoventralmente.	Las proyecciones de las neuronas de esta zona se encuentran en la parte contralateral del asta ventral, son fibras principalmente propioespinales.	La principal función de las neuronas es la coordinación de la actividad motora.
Lamina 9	Se localiza en la base del asta ventral, es el sitio donde se encuentran las motoneuronas de la ME. Hay dos tipos de neuronas las α -motoneuronas, las cuales sus axones inervan los músculos estriados. El segundo tipo son las motoneuronas γ , las	Sus proyecciones reciben aferencias directas de las raíces dorsales (para los reflejos espinales) y también de vías descendentes con control motor.	Su principal función de las neuronas es el control motor.

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

	cuales inervan con los elementos contráctiles del músculo.		
Lamina 10	Esta zona se encuentra en la parte central de la sustancia gris de la ME, cerca al canal central. Hay dos tipos de células, las de forma triangular y las de formas estrelladas. Sus árboles dendríticos son bipolares y se extienden en el plano dorsoventral.	Recibe Proyecciones de fibras tipo C y fibras A- δ , las cuales se proyectan hacia el núcleo lateral parabraquial.	Las células de esta zona reciben información nociceptivas y viscerorecepción.

Tabla 1. Láminas de Rexed. Organización y función.

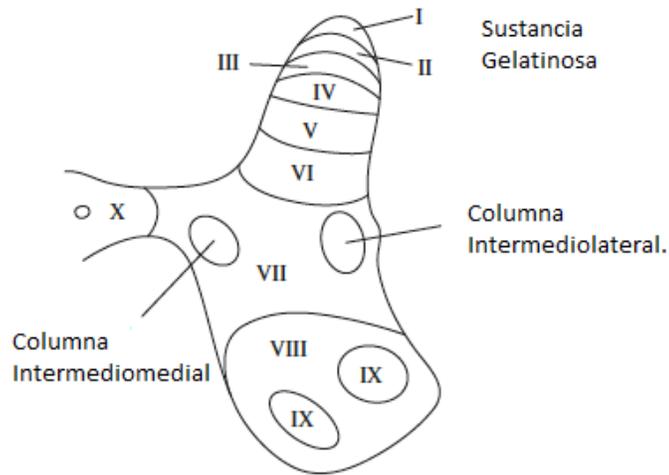


Figura 3. Esquema de las Láminas de Rexed de la Médula Espinal.
<https://quizlet.com/36581152/n5a-rexeds-laminae-flash-cards/>

EFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVIOS PERIFÉRICOS PREDEGENERADOS SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÚDULA ESPINAL.

La sustancia blanca de la ME, está organizada en tres funículos: Funículo posterior o dorsal; funículo lateral y funículo anterior o ventral. Cada uno de estos funículos se compone de fibras nerviosas que comparten un origen, destino y función común. Los Funículos o tractos ascendentes son las proyecciones que conectan a la ME hacia niveles supraespinales, participan en las funciones propioceptivas consistentes, como dolor, temperatura, presión, posición, y sus células provienen de los ganglios de las raíces dorsales.

Los tractos ascendentes se dividen en: Grácil, Cuneiforme, tracto espinocerebeloso dorsal, tracto espinocerebeloso ventral, tracto espinotalámico, tracto espinotalámico lateral y tracto espinotalámico anterior (Tabla 2).

Los funículos o tractos descendentes, sus proyecciones van desde el cerebro hacia la ME, su principal función es el control del movimiento. Dentro de estos podemos encontrar: tracto corticoespinal lateral, tracto corticoespinal anterior, fascículo de Barnes, tracto rubroespinal, tracto vestibuloespinal lateral, tracto vestibuloespinal medial, tracto reticuloespinal, tracto tectoespinal, tracto autónomo descendente y tracto monoaminérgico (Tabla 3).

TRACTOS ASCENDENTES.

NOMBRE DEL TRACTO	ORIGEN	LOCALIZACIÓN	EXTENSIÓN	TERMINACIÓN	FUNCIÓN
Grácil	Ganglio de la raíz dorsal	Parte medial del funículo posterior	Se encuentra a lo largo de la médula espinal.	Núcleo Grácil en la médula oblongada	Propiocepción
Cuneiforme	Ganglio de	Parte lateral	Se	Núcleo	Propiocepción

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

	la raíz dorsal	en el funículo posterior	encuentra por arriba del sexto segmento torácico.	cuneiforme de la médula oblongada	
Espinocerebeloso dorsal	Núcleo dorsal de Clarke	Funículo Lateral	Por arriba del segundo segmento lumbar.	Cerebelo ipsilateral	Propiocepción
Espinocerebeloso ventral	Asta dorsal	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Cerebelo contralateral.	Propiocepción
Espinotalámico cervical	Ganglio de la raíz dorsal ipsilateral	Funículo lateral.	A lo largo de la médula espinal.	Núcleo cervical lateral	Propiocepción
Espinotalámico lateral	Asta dorsal	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Tálamo (núcleo posterolateral ventral)	Sensaciones de dolor y térmica.
Espinotalámico anterior	Asta dorsal	Funículo lateral y anterior	A lo largo de la médula espinal.	Tálamo (núcleo posterolateral ventral)	Tacto ligero

Tabla 2. Tractos ascendentes de la médula espinal.

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

TRACTOS DESCENDENTES.

Nombre del Fascículo	Origen	Localización	Extensión	Terminación	Función
Corticoespinal lateral	Corteza	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Astas ventral y dorsal	Control del movimiento hábil, modulación de la actividad de la sensación
Corticoespinal anterior (haz de Türk)	Corteza	Funículo anterior	A lo largo de la médula espinal.	Astas ventral y dorsal	Control del movimiento hábil, modulación de la actividad de la sensación
Fascículo de Barnes	Corteza	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Astas ventral y dorsal	Control del movimiento hábil, modulación de la actividad de la sensación
Rubroespinal	Núcleo rojo	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Asta ventral	Control del movimiento.
Vestibuloespinal lateral	Núcleo vestibular lateral	Funículo lateral	A lo largo de la médula espinal.	Asta ventral	Control de músculos para la postura y equilibrio.
Vestibuloespinal medial	Núcleo vestibular	Funículo anterior	En la zona cervical de la médula	Asta ventral	Posición de la cabeza relacionada con

EFFECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

	medial		espinal.		el estímulo vestibular.
Reticuloespinal	Formación reticular de la médula oblongada	Funículo lateral y anterior	A lo largo de la médula espinal.	Asta ventral zona intermedia	Control del movimiento y la postura, modulación de la actividad sensorial.
Tectoespinal	Colículo superior contralateral	Funículo anterior	Zona cervical de la médula espinal.	Asta ventral	Posición de la cabeza relacionada con el movimiento ocular.
Autónomo descendente	Hipotálamo	Funículo anterior	A lo largo de la médula espinal.	Columna celular intermediolateral y grupo celular preganglionar del sacro.	Control de músculos lisos y glándulas.
Monoaminérgico	Núcleo del rafe, locus coeruleus	Funículo lateral y anterior	A lo largo de la médula espinal.	Asta dorsal	Control de la transmisión del dolor.

Tabla 3. Tractos Descendentes de la Médula Espinal.

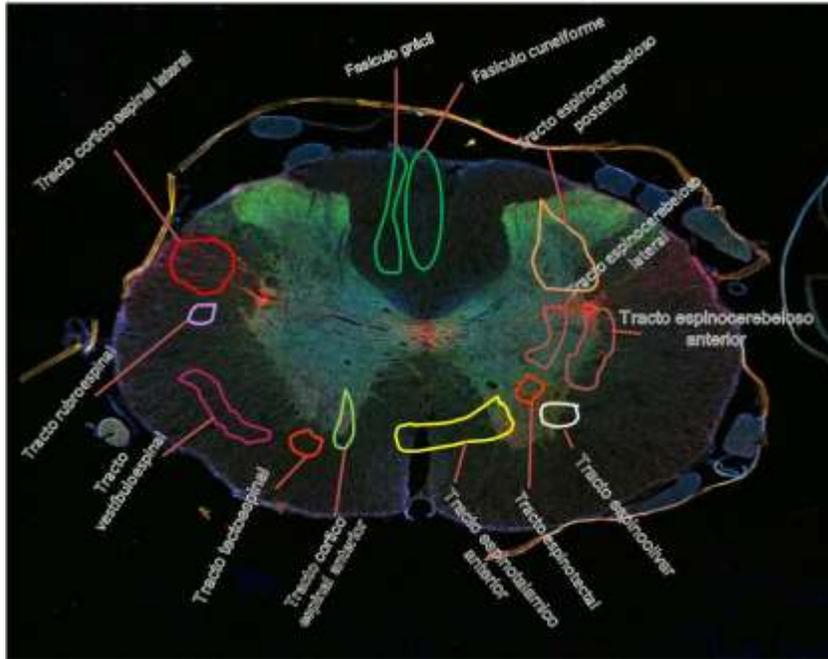


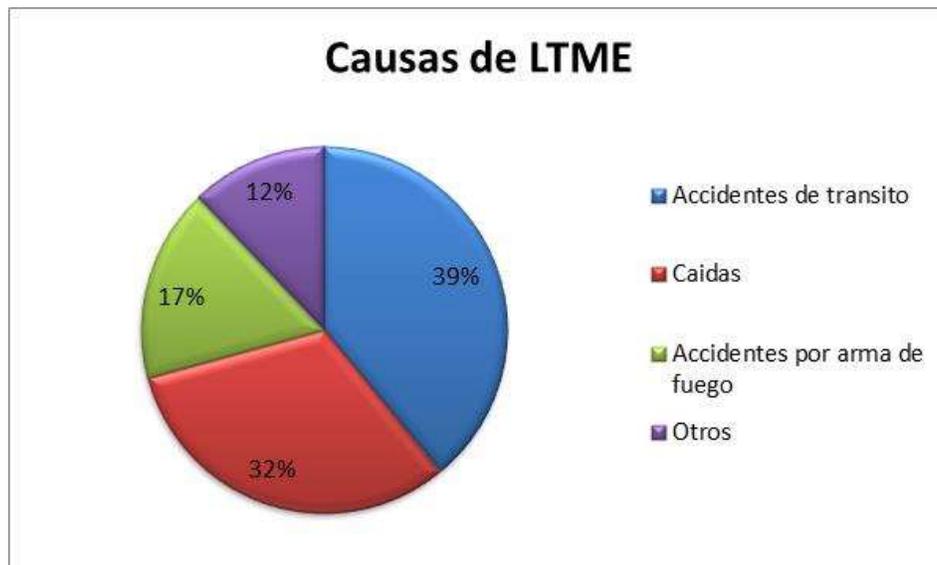
Figura 4. Tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal. De lado derecho están los tractos ascendentes (sensitivos); de lado izquierdo están los tractos descendentes (motores).

3.2 LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL.

La lesión traumática de médula espinal (LTME), es un evento traumático que provoca, un déficit sensorial, motor, así como de las funciones autónomas, las cuales impactan a los pacientes tanto física, fisiológica y socialmente (Singh y cols. 2014; Jain y cols. 2015). Se ha estimado una prevalencia mundial entre 236 y 1009 casos por millón de habitantes; con una incidencia de 39 casos por millón de habitantes (Furlan y cols. 2013). En Estados

Unidos, se ha estimado una incidencia de 40 casos por millón de habitantes, con una prevalencia de 12 500 000 casos por año (Jain y cols. 2015).

El gasto económico anual, está estimado en 1.47 millones de dólares por paciente con paraplejía; y de un paciente con tetraplejía, el gasto económico anual es de 3.03 millones de dólares (Singh et al. 2014). La población más afectada, son los jóvenes en etapa productiva entre 16 -40 años de edad, y las causas más comunes son:



Grafica 1. Causas de Lesión Traumática de Médula Espinal (Bellucci et al. 2015).

3.3 MODELOS DE LESIÓN DE MÚDULA ESPINAL

Cuando ocurre una LTME, suceden dos eventos importantes: el primero es la lesión por el daño mecánico, que puede ser provocado por golpe (laceración parcial, o

completa), por calor o por una compresión persistente. Dentro de este primer evento, se han realizado diferentes modelos animales, para semejar la lesión en un paciente. Los modelos son contusión (daño por un golpe), compresión (daño por compresión en la ME), hemisección (corte parcial de la ME) y sección completa (corte total de la ME); este último es el mejor modelo para observar recrecimiento axonal. El segundo evento involucra todos los eventos celulares que ocurren por el resultado del daño mecánico, provocando así una muerte celular por apoptosis.

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 médula espinal. La contusión torácica se realiza exponiendo la médula espinal y dejando caer sobre ella un peso determinado. Después de 2 o 3 semanas la disfunción motora es recuperada; 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 completa 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 2011, 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 láser 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 fibroglial 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 realizada 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).

4 EVENTOS SECUNDARIOS.

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

4.1 FASE AGUDA.

Cuando ocurre una LTME, el daño comienza con una hemorragia en el sitio de lesión, donde se forman numerosas petequias hemorrágicas formándose una zona de infarto, la cual ayuda a la activación y propagación de la necrosis en el tejido del SNC. Este evento afecta principalmente a neuronas, provocando un daño vascular a arterias, capilares y venas, limitando el flujo de sangre. Esta zona de infarto es intensificada por el choque neurológico, el cual causa una bradicardia e hipotensión (Caballero y Nieto-Sampedro 2005; Profyris et al. 2004; Oyinbo 2011).

A nivel celular este daño provoca una pérdida de la fosforilación oxidativa y de la glicosilación, lo cual favorece a una necrosis por la depleción del ATP, provocando, una pérdida de permeabilidad de la membrana celular, liberando los contenidos lisosomales y activando a enzimas autodestructivas calcio-dependientes como proteasas, fosfolipasas, ATPasas y endonucleasas; las cuales pueden degradar a las membranas plasmáticas y componentes del citoesqueleto. (Profyris y cols. 2004) (Figura 5).

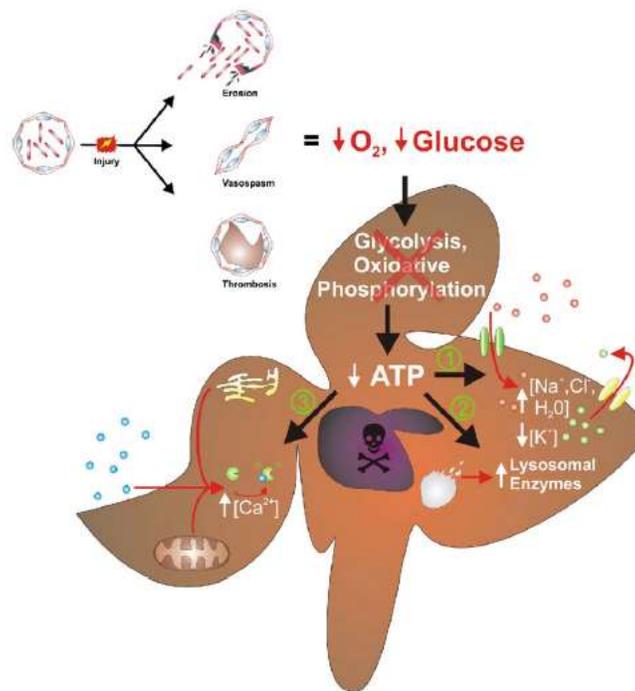


Figura 5. Mecanismo de depleción del ATP en el proceso isquémico después de una LTME. Se produce una muerte celular medida por tres mecanismos diferentes: 1) pérdida de la permeabilidad de la membrana; 2) aumento en el contenido lisosomal produciendo una autofagia; 3) incremento del calcio intracelular por la activación de proteasas dependientes de calcio. (Profyris y cols. 2004)

Debido al estrés mecánico que se produce en el tejido, además, del rompimiento de los vasos sanguíneos y de la barrera hematomedular se produce un edema, este se

puede presentar durante los primeros días después de una LTME. (Caballero and Nieto-Sampedro 2005)

El calcio, juega un rol importante en la regulación de la conducción del sodio y del potasio, sobre la excitación neuronal, en la regulación de enzimas y en el almacenamiento de neurotransmisores. La acumulación de calcio intra-axonal, empieza a los 30 minutos después de la lesión; y éste se incorpora a través de los canales Ca^{2+} dependiente de voltaje, o a canales asociados a los receptores NMDA (n-metil-de aspartato). La salida de este calcio esta mediada, por la calcio-ATPasa; la producción exacerbada de calcio activa a fosfolipasas C y A2, provocando un daño en la membrana, activando al ácido araquidónico. Está activación produce metabolitos como los tromboxanos, leucotrenos y radicales libres de oxígeno (ROS), provocando un daño tisular y una inflamación. (Profyris y cols. 2004; Caballero y Nieto-Sampedro 2005).

Además del incremento del calcio, existe también un incremento de potasio; el cual provoca una despolarización de la neurona, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, favoreciendo a un bloqueo de la conducción (Profyris y cols. 2004).

La activación de las fosfolipasas dependientes de calcio, provoca que los lípidos se hidrolicen, y que haya una liberación de ácidos grasos entre los 5-15 minutos después de la lesión; además, los metabolitos secretados por el ácido araquidónico, afectan al flujo sanguíneo, activando una inflamación. La inducción de la fosfolipasa A2, incrementa los niveles del factor plaquetario, lo que contribuye a una reducción del flujo sanguíneo.(Caballero y Nieto-Sampedro 2005; Oyibo 2011)

También la hidrólisis de los fosfolípidos, promueven una liberación de radicales libres, los cuales pueden ser activados por el ácido araquidónico y por la muerte eritrocitaria, que provoca una alta fuente de hierro, que cataliza la formación de estos

radicales libres. Estos radicales libres pueden dañar a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; los cuales permiten la formación de lipoperóxidos destruyendo las membranas celulares de las células no dañadas.(Profyris y cols. 2004; Caballero y Nieto-Sampedro 2005)

Al mismo tiempo se inicia una respuesta inflamatoria, esta comienza horas después de la lesión, durando varios días, esta respuesta inflamatoria incluye el daño endotelial, liberación de citocinas pro-inflamatorias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y proteínas inflamatorias de macrófagos MIP 1 α y β .(Profyris et al. 2004; Caballero y Nieto-Sampedro 2005)

Tanto la IL-1 como TNF- α y IL-6, son co-estimuladoras de sí mismas, lo que provoca un aumento en la expresión de estas citocinas. El aumento de TNF- α es atribuido, a la infiltración leucocitaria, y a la secreción de citocinas pro-inflamatorias al inicio de la lesión. Cuando TNF- α y IL-1, se unen a sus receptores causan una respuesta inflamatoria mediante la activación de NF κ B, estimulando una producción de ROS, citocinas, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), prostaglandinas (sintasa-2, ácido araquidónico, proteasas) y moléculas de adhesión de células endoteliales (CAMs).(Profyris y cols. 2004; Chacón and Nieto-sampedro 2005)

Otro de los eventos que se producen es la isquemia; durante esta isquemia, la xantina deshidrogenasa, provoca que las células endoteliales se sometan a proteólisis, produciendo moléculas de oxígeno, las cuales favorecen a la formación de ROS desarrollando una muerte celular.(Profyris y cols. 2004; Caballero y Nieto-Sampedro 2005).

4.2. FASE SUB-AGUDA.

En la fase subaguda continúa la reactivación de las células gliales como consecuencia de la necrosis, la hemorragia e isquemia (Caballero y Nieto-Sampedro 2005). En esta fase son importantes la excitotoxicidad, la apoptosis, la inflamación incluyendo moléculas pro y anti-inflamatorias, entre otros fenómenos.

La excitotoxicidad por glutamato es un fenómeno secundario que ocurre después de una lesión medular. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC. El glutamato se une a sus receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico (AMPA) y kainato; provocando un cambio en el flujo de canales de potasio y calcio estimulando la introducción exacerbada de Ca^{2+} intracelular a la neurona y a las células gliales (astrocitos) despolarizando la membrana celular, también se activan fosfolipasas y proteasas las cuales provocan 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 $\text{TNF-}\alpha$; estas especies de óxido nítrico se juntan con otros radicales libres como el anión superóxido, dando como resultado la formación de ROS, provocando así muerte celular en los astrocitos y la neurona pre-sináptica, y favoreciendo la desmielinización (Acevedo González y cols., 2008) (Figura 6).

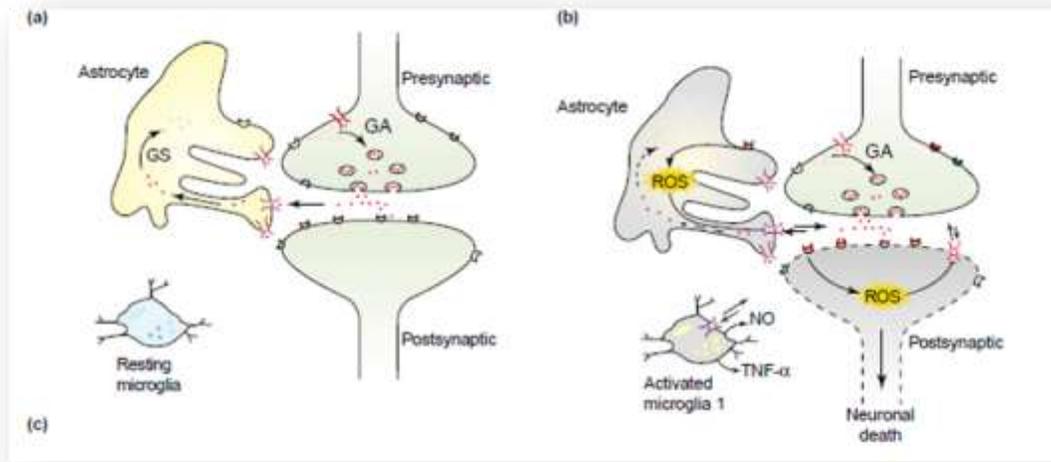


Figura 6. Mecanismo de neurotoxicidad por glutamato. A): Transporte normal del glutamato en el SNC. El glutamato (círculos rojos) que se encuentra en la neurona pre-sináptica es capturado por las vesículas sinápticas transportadoras en donde son transportadas hacia el espacio sináptico. Ya en el espacio 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 óxido nítrico (NO) y TNF- α produciendo una toxicidad; en estas condiciones el astrocito y la neurona post-sináptica producen ROS provocando una muerte celular (Schwartz y cols., 2003).

La apoptosis es la muerte celular activada, la cual es un importante mediador de daño secundario; de la que se pueden diferenciar dos fases: 1) la fase inicial, donde la

apoptosis acompaña a la necrosis en la degeneración múltiple de células y 2) fase tardía, donde actúa directamente en la sustancia blanca por los oligodendrocitos y microglía (Profyris y cols. 2004). 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- α ; 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).

En esta fase continúa la inflamación, por la infiltración de células; las primeras en infiltrarse son los granulocitos polimorfonucleares, y el segundo tipo celular son los monocitos macrófagos que invaden el sitio de lesión. Esta infiltración de células, es dada por la sobre regulación de CAMs, interleucina 8 (IL-8) y proteínas inflamatorias de los macrófagos MIP α y β , seguido de este reclutamiento de macrófagos y de la microglía, son activadas por TNF- α , el ligando a receptores del complemento C3 y receptores a manosa, provocando una elevada concentración de ATP extracelular.

La activación de la microglía, favorece la secreción de glutamato y citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6, además de enzimas como la iNOS. Los macrófagos pueden sobre regular a ciclooxigenasas, las cuales son importantes para conversión del ácido araquidónico, favoreciendo la producción de prostaglandinas. Después de que los macrófagos y la microglía, fagocitan los detritos celulares, se vuelven reactivas tomando

una forma ameboide, lo que provoca una activación de moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II (ya que actúan como células presentadoras de antígeno), junto a sustancias co-etimuladoras como citocinas pro-inflamatorias TH1, IL-1, IFN- γ y TH2, favorecen a la activación y al reclutamiento de células T autorreactivas CD4⁺, las cuales provocan un ambiente autoinmune (Profyris et al. 2004; Chacón and Nieto-sampedro 2005).

Durante esta fase continua la formación de zonas de penumbra isquémicas, provocando una muerte neuronal secundaria, formando cavidades y quistes. Estos quistes formados principalmente por células gliales reactivas (microglía y astrocitos) comienzan a formar una cicatriz fibrogliar. Además comienza una degeneración Walleriana de los axones dañados (Caballero y Nieto-Sampedro 2005)

4.3 FASE CRÓNICA.

En esta etapa, continúa el daño a los axones debido a la degeneración Walleriana, la cual se extiende a lo largo de la médula espinal. La degeneración Walleriana provoca un daño axonal, que separa los axones de su soma; además, existe una desmielinización de los axones, por las células inflamatorias, provocando que los axones queden desnudos, disminuyendo su grosor, favoreciendo la separación de fibras y la fragmentación de la mielina, originando que los desechos celulares sean fagocitados por los macrófagos y la microglía (Profyris y cols. 2004). Posteriormente, la infiltración de las células inflamatorias disminuye, y los macrófagos migran al sitio de lesión, donde forman una cavidad (quiste), carente de células y lleno de líquido cerebrospinal; esta zona es rodeada por glía reactiva (Caballero y Nieto-Sampedro 2005).

5. PROCESOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO AXONAL.

Como se sabe la capacidad regenerativa del SNC es limitada debido a la presencia de factores extrínsecos o intrínsecos, que restringen el crecimiento axonal en animales adultos. Estos factores incluyen proteínas asociados a la mielina o proteínas provenientes de la matriz extra celular que forman una barrera química; por otro lado, el desarrollo de la cicatriz fibrogliar, forma una barrera física (Silver y Miller 2004).

5.1. INHIBIDORES ASOCIADOS A MIELINA.

Se demostró que la primera molécula de inhibición del crecimiento en el SNC es la mielina; las proteínas implicadas son Nogo A, OMgp (glicoproteína de mielina asociada a oligodendrocitos), y MAG (Glicoproteína asociada a la mielina) (Martin E. Schwab y Stephen M. Strittmatter 2014).

NOGO.

Las proteínas Nogo, son pertenecientes a la familia del reticulón (RTN), localizadas en el retículo endoplásmico. Existen tres tipos de NOGO: Nogo A la cual se expresa en el SNC, Nogo B la cual se expresa en el SNP y en el SNC, y Nogo C la cual se expresa en el músculo esquelético (Fang y Zheng Binhai 2008; Liu y cols. 2006) .

Se ha demostrado que la capacidad inhibitoria de Nogo en el SNC, es detener el crecimiento neurítico; el cual es mediado por dos dominios, una región N- terminal específica para Nogo A y una región extracelular de 66 amino ácidos Nogo 66. Además, Nogo 66 se ha visto implicada directamente en el colapso del cono axónico (Fang y Zheng Binhai 2008; Liu y cols. 2006).

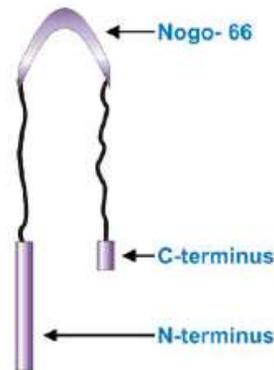


Figura 7. Estructura de la proteína Nogo A. La proteína Nogo A tiene tres dominios, dos dominios transmembranales C-terminal y N-terminal y un dominio extracelular de 66 aminoácidos el cual es el que favorece a la inhibición del crecimiento axonal (esquema modificado de (Profyris y cols. 2004).

MAG.

La glicoproteína asociada a la mielina fue descubierta por primera vez en los 70, en la mielina del SNC. Esta proteína es expresada en células mielinizadoras (oligodendrocitos y células de Schwann), tanto en el SNC como en el SNP; esta ayuda a la formación y mantenimiento de las vainas de mielina (Fang y Zheng Binhai 2008).

MAG son proteínas parecidas a las inmunoglobulinas, las cuales poseen un dominio transmembranal, encontrado en la superficie de las células mielinizadoras, localizadas en la zona perinodal. Existen dos isoformas de MAG, S-MAG (forma corta) y L-MAG (forma larga), las cuales, difieren entre sí por sus dominios citoplasmáticos formados por 44 aminoácidos. L-MAG tiene una función, de molécula señalizadora, la cual, por su dominio

largo en el citoplasma se une a una citocina Fyn; esta unión favorece a la maduración de los oligodendrocitos (Liu y cols. 2006).

MAG también, participa en la regulación del calcio en las células mielinizadoras, por la interacción de proteínas que se unen al calcio como S100B y la calmodulina; se sabe que MAG tiene un efecto dual, ya que, promueve un ambiente permisivo para el crecimiento axonal, durante las etapas del desarrollo, pero en un sistema adulto y después de una LTME, esta favorece a la inhibición del crecimiento neurítico y a la formación de conexiones aberrantes (Liu y cols. 2006; Giger, Hollis, y Tuszynski 2010).

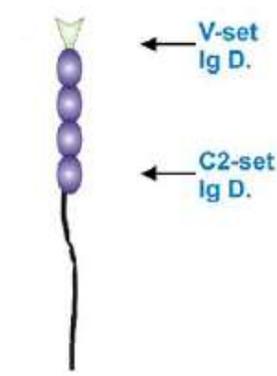


Figura 8. Esquema de la Glicoproteína asociada a la mielina (MAG). La MAG es una proteína parecida a la Siglec (proteínas parecidas a la inmunoglobulinas que se unen al ácido siálico). La estructura contiene dos dominios V set, que es la parte N-terminal y C2-set que es la parte C-terminal (esquema modificado de (Profyris et al. 2004).

OMgp.

Es una glicoproteína de mielina asociada a los oligodendrocitos, está formada por 4 dominios, un dominio N-terminal rico en residuos de cisteína; un dominio rico en residuos de leucina (LRR), un dominio rico en residuos de serina-treonina y un grupo glucosilfosfatidilinositol (GPI) por el cual se ancla a la membrana. La región de LRR, es la que permite que la OMgp se una a su receptor NgR1; esta unión favorecerá la función inhibitoria sobre el crecimiento neurítico, e inhibición del crecimiento de colaterales (Liu y cols. 2006).

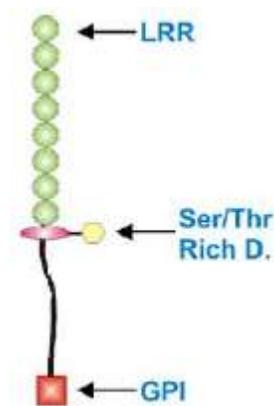


Figura 9. Esquema de la glicoproteína de mielina asociada a los oligodendrocitos. La estructura OMgp contiene un dominio rico en leucinas LRR, un dominio rico en serina/treonina y un dominio glucosilfosfatidilinositol (GPI). (esquema modificado de (Profyris et al. 2004).

Para la activación de las proteínas MAG, Nogo A y OMgp, se necesita de la activación de receptores. El receptor NgR, es una proteína la cual se puede anclar a la proteína GPI; este receptor se ha reportado que se une específicamente a las proteínas de

mielina MAG, Nogo A y OMgp, la unión de este receptor, promueve el efecto inhibitorio para el crecimiento axonal después de una LTME (Giger, Hollis, y Tuszynski 2010).

Existen tres isoformas del receptor: NgR1, NgR2 y NgR3. El NgR1 es el receptor que se une al dominio Nogo 66, favoreciendo la activación del efecto inhibitorio; NgR2 y NgR3 no se unen a Nogo 66, pero se ha demostrado que estos receptores tienen una alta afinidad a los dominios LRR (Liu et al. 2006). Se ha demostrado que el receptor NgR1 puede unirse a las tres proteínas de mielina MAG, Nogo A y OMgp; aunque también se ha demostrado que el receptor NgR2 tiene una alta afinidad de anclarse a los sitios LRR de MAG (Liu y cols. 2006).

Cuando NgR1, se ancla a su proteína GPI, en su dominio intracelular, se activan diferentes co-receptores que favorecen la activación de la señalización de la inhibición axonal. En esta activación, están implicadas dos moléculas P75 (molécula perteneciente al receptor de TNF) y TOY (LINGO-1). La activación de este complejo de co-receptores, favorecen a la activación de una cinasa RhoA, la cual activa a otra cinasa ROCK, promoviendo a su vez la activación de LIM; esta cinasa LIM puede activar al factor de la cofilina, provocando así, el colapsamiento del cono axonal y despolimerizando los filamentos de actina (Filbin 2003; Giger, Hollis, y Tuszynski 2010).

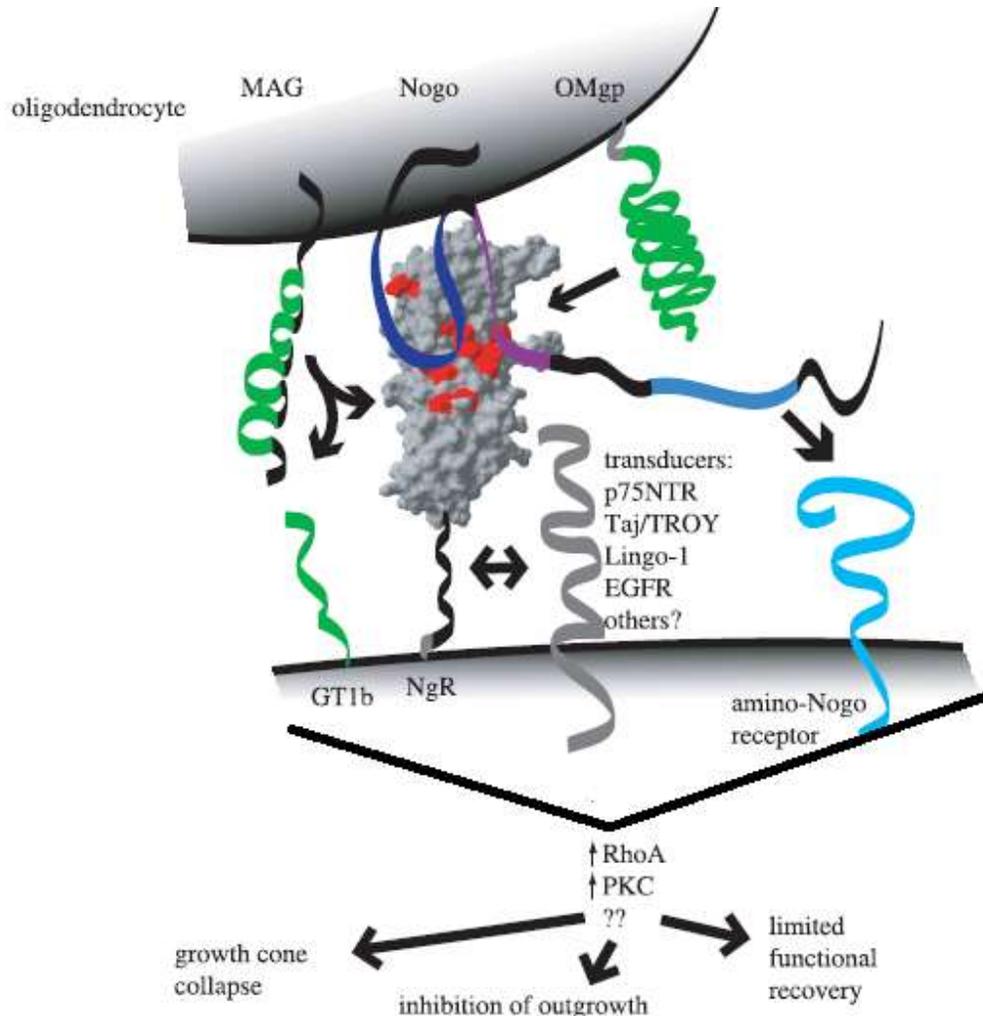


Figura 10. Estructura de la unión ligando Receptor de las proteínas de mielina. Las proteínas MAG, NogoA y OMgp se encuentran en los oligodendrocitos. Estos se unen a su receptor NgR1, este activa a co-receptores como P75, TROY los cuales forman un complejo de activación de señalización con RHOA y PKC, promoviendo el colapsamiento del cono axónico, inhibición del crecimiento axonal, lo que limita la recuperación funcional (esquema modificado de (Liu y cols. 2006).

5.2. CICATRIZ FIBROGLIAL.

La reacción glial, que resulta después de la lesión, promueve el reclutamiento de microglía, precursores de oligodendrocitos, células de las meninges y astrocitos en el sitio de la lesión (Caballero y Nieto-Sampedro 2005) (Sampedro 2005). El resultado de esta migración celular, es la formación de una barrera física, la cicatriz fibroglial.

La cicatriz, tiene como función el aislamiento de la zona de lesión, del resto del tejido, y produce factores que hacen que, la zona inhiba el crecimiento axonal, para evitar conexiones aberrantes. Los factores que están presentes en la cicatriz glial son: tenacinas, semaforinas, efrinas y proteoglicanos-condroitín sulfato (Silver y Miller 2004) (Figura 11).

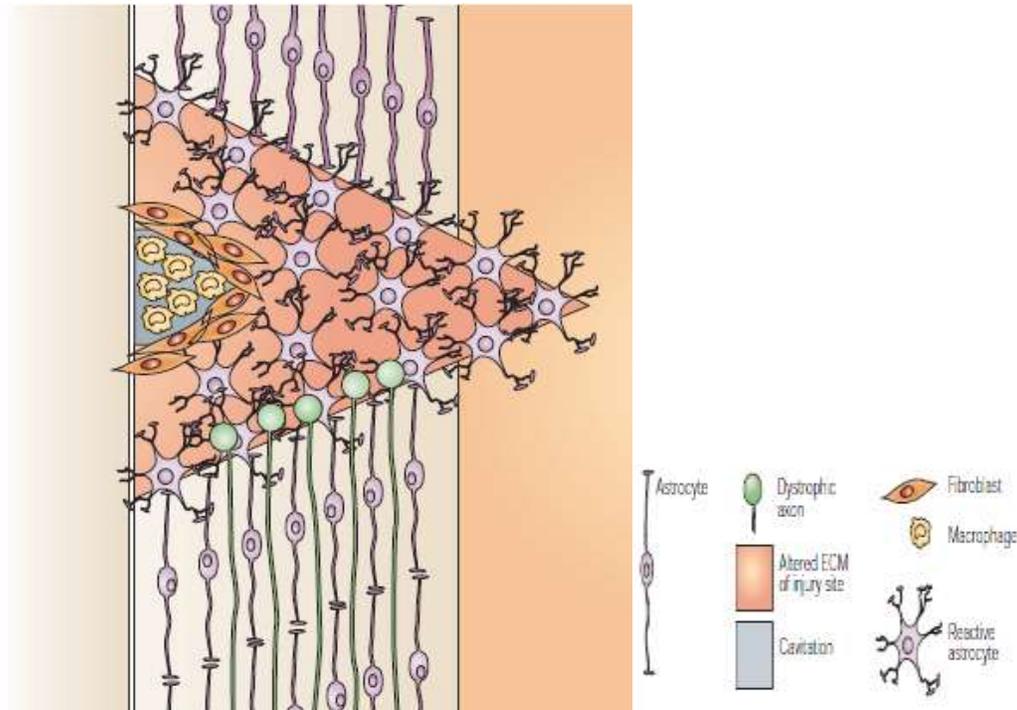


Figura 11. Esquema de la formación de la cicatriz fibroglial. Hay una infiltración de macrófagos (amarillos), fibroblastos (naranjas) y astrocitos reactivos (morados) en la zona de lesión, formando una barrera para los axones (Silver and Miller 2004).

5.3. PROTEÍNAS REPELENTES DEL CRECIMIENTO AXONAL.

Después de una LTME, existe una activación de inhibidores del crecimiento neurítico, presentes en el sitio de lesión, lo que puede provocar el pobre crecimiento axonal y funcionalidad. Dentro de estas moléculas inhibitorias se encuentran las moléculas repelentes de guía axonal (RGM), las RGM son proteínas ancladas a una GPI (Kubo y cols. 2007; Kubo y Yamashita 2007; Fujita y Yamashita 2014).

Existen tres moléculas identificadas de la RGM: RGMa, RGMb y RGMc. En el SNC se encuentra expresada la forma RGMa, la cual está implicada, en la inhibición del crecimiento axonal (Kubo y cols. 2007). Estas moléculas son secretadas por células de la microglía, macrófagos y oligodendrocitos del sitio de lesión (Fujita y Yamashita 2014).

La RGMa es activada, cuando se une a su receptor neoginina, provocando una activación de RHO-GEF (Factor de intercambio de guanina), activando a su vez a la cinasa RhoA. Esta activación promueve la activación a su vez de otra cinasa ROCK, por medio de la fosforilación de una GTP (guanosin trifosfato). Esta activación desencadena la regulación de varias proteínas como MCL (cadena ligera de miosina), la cual promueve la inhibición del crecimiento neurítico. Otra proteína es la cinasa LIM, que provoca la activación del factor de polimerización de actina y cofilina; por último, la proteína activada es la colapsina CRMP2 (proteína mediadora de la respuesta de la colapsina 2), la cual provoca una inhibición del crecimiento neurítico e inhibición del crecimiento axonal (Fujita y Yamashita 2014) (Figura 12).

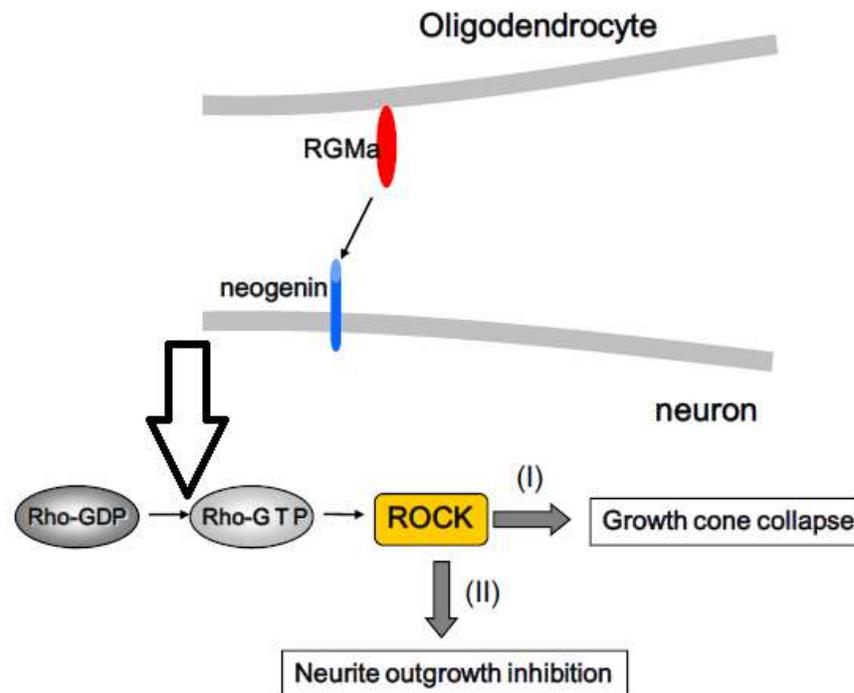


Figura 12. Activación de la molécula RGMa mediante la vía Rho. Cuando RGMa se une a su receptor neogenina, este activa la vía de señalización Rho, la cual por una fosforilación de GDP-GTP se activa ROCK provocando el colapsamiento del cono axónico y la inhibición del crecimiento neurítico (esquema modificado de (Kubo and Yamashita 2007)).

5.4 MOLÉCULAS DE INHIBICIÓN ASOCIADAS A LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Los astrocitos son capaces de secretar moléculas de la matriz extracelular, como proteoglicanos. Estas moléculas son glucoproteínas glucosiladas, con un núcleo proteico, unido covalentemente por varias cadenas de glucosaminglicanos (GAG) (Yiu y He 2006). En condiciones normales estas moléculas, están implicadas en el crecimiento axonal,

adhesión, migración e interacción con otras moléculas de la matriz extracelular (Yiu y He 2006).

Los astrocitos secretan cuatro clases de proteoglicanos:

- ✓ Proteoglicano heparan sulfato (HSPG).
- ✓ Proteoglicano dermatan sulfato (DSGP).
- ✓ Proteoglicano keratan sulfato (KSGP).
- ✓ Proteoglicano condroitin sulfato (CSPG).

Los CSPG, están conformado de seis familias: agrecan, brevican, neurocan, NG2, fosfocan y vervican. Estos son activados por la vía de señalización RhoA, provocando la disminución de la actividad RAC1, a través, de la unión al receptor $PTP\alpha$ (proteína transmembranal tirosinafosfatasa), además de la fosfatasa antígeno-relacionada a leucocitos LAR y NGR1 y 3 (Fujita y Yamashita 2014; Ohtake and Li 2015). Cuando se activa RhoA, mediante fosforilaciones de Rho-GDP a Rho-GTP, hay una activación de la cinasa ROCK, promoviendo la inhibición del crecimiento axonal (Fujita y Yamashita 2014; Ohtake y Li 2015) (Figuras 13 y 14).

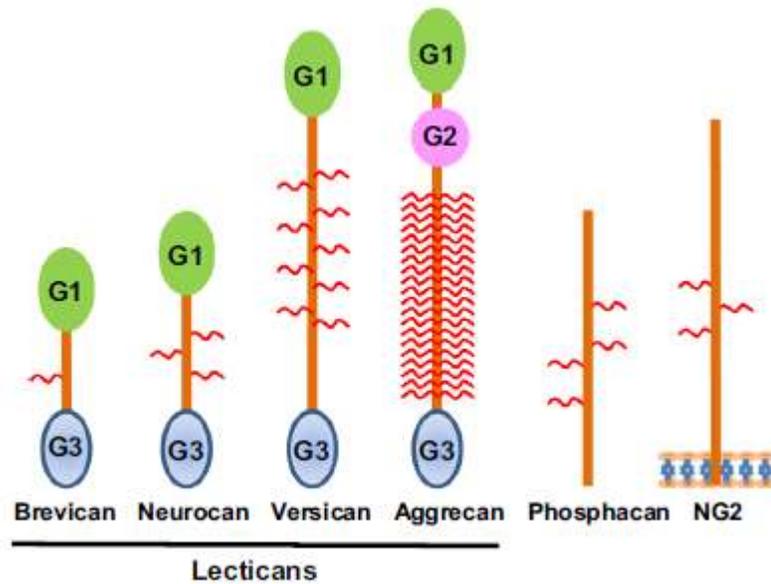


Figura 13. Esquema de las familias de los CSPG. G1, es la zona N-terminal dominio donde se une el ácido hialurónico; G2 dominio globular del agrecan y G3 dominio C-terminal de lectinas, donde se unen la tenacina (Ohtake y Li 2015).

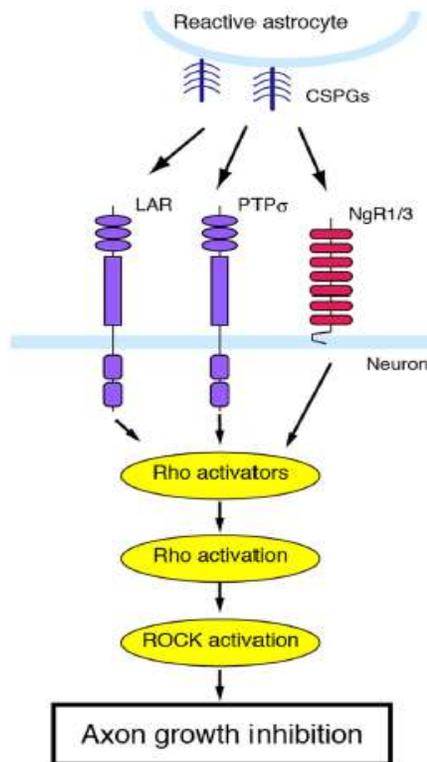


Figura 14. Activación de los CSPG por la vía Rho. Los astrocitos reactivos, secretan los CSPG, los cuales se unen a sus diferentes receptores, activando a la cinasa Rho, la cual por fosforilaciones de RhoA, activa otra cinasa ROCK promoviendo la inhibición del crecimiento del axón (Fujita y Yamashita 2014).

Neurocan:

Es una proteína proveniente de CSGP, la cual contienen dos fragmentos, uno C-terminal (neurocan-C) y uno N-terminal (neurocan-130), los cuales son sulfatados; pueden ser secretados por los astrocitos y por las células progenitoras de los oligodendrocitos, y están concentrados en la sustancia blanca. Se ha observado que el neurocan in-vitro, actúa como inhibidor del crecimiento neurítico (Liu y cols. 2006). Después de una LTME, el neurocan es altamente expresado, en el sitio del daño isquémico, el cual actúa junto con

moléculas como N-CAM, Ng-CAM/L1, TAG-1 y tenacinas, promoviendo la inhibición del crecimiento axonal (Liu y cols. 2006; Dyck y Karimi-Abdolrezaee 2015).

Versican Y Fosfacan:

El versican es un proteoglicano, que contiene unidades α y β . Se ha demostrado, que después de una LTME, restringe la plasticidad y la regeneración. Esta expresión es presentada a partir de las dos semanas después de la lesión, y puede mantenerse en etapas crónicas (Liu y cols. 2006; Dyck y Karimi-Abdolrezaee 2015).

El fosfacán es otro CSPG del SNC, este, se puede expresar en la membrana celular en forma de RPTP- β ; se ha observado que después de una lesión, puede favorecer a la inhibición del crecimiento axonal (Liu y cols. 2006; Dyck y Karimi-Abdolrezaee 2015).

OTRAS MOLÉCULAS

Otras moléculas relacionadas y que participan en el ambiente repulsivo para el crecimiento axonal, después de una lesión son las semaforinas, efrinas y nefrinas.

Las efrinas y sus receptores Eph, son secretadas por los astrocitos reactivos después de una lesión. La expresión bidireccional de la efrina B2, de los astrocitos y fibroblastos, favorecen la regulación de ambas células, para la formación de la cicatriz fibrogliosa (Liu et al. 2006; Thiede-Stan and Schwab 2015). Esta interacción de las efrinas y sus receptores, puede durar hasta etapas crónicas, lo que favorece la inhibición del crecimiento axonal. Además, se ha observado que la EphA4 secretada por los astrocitos, y la efrina B3, secretada por los oligodendrocitos mielinizadores, promueven también la inhibición del crecimiento neurítico (Liu y cols. 2006; Thiede-Stan y Schwab 2015).

Las semaforinas, son moléculas que actúan como repulsivas para el crecimiento axonal. Su función es mediada por los receptores de las plexinas. Se ha observado, que la

semaforina 3 es expresada por los fibroblastos del sitio de lesión, y la semaforina 4D, es expresada por los oligodendrocitos; éstas promueven la inhibición del crecimiento axonal después de una lesión (Liu y cols. 2006).

Por último, las nefrinas, son moléculas que tienen una capacidad dual; ya que pueden trabajar como moléculas repulsivas o quimio-atrayentes. Se ha demostrado que la nefrina-1, la cual es expresada por oligodendrocitos, favorece al ambiente repulsivo para el crecimiento axonal después de una lesión (Liu y cols. 2006; Thiede-Stan y Schwab 2015).

6. PROCESOS DE CRECIMIENTO AXONAL.

Las neuronas, son células que procesan la información. Se encuentran compartimentalizadas en dos formas: el dominio molecular y el dominio funcional; o el compartimento axonal y el somatodendrítico. Las dendritas tienen una múltiple función, pueden ser cortas o muy ramificadas, y se encargan de recibir e integrar las entradas sinápticas entre miles de neuronas (Kevenaar y Hoogenraad 2015).

El axón, es el responsable de transmitir la información integrada en forma de potencial de acción, que viaja a lo largo de la membrana axonal. Para que la información, se transmita correctamente, el axón tiene una organización en su citoesqueleto, el cual contiene estructuras especializadas como el segmento inicial del axón (AIS) y botones presinápticos (Kevenaar y Hoogenraad 2015) (Figura 15).

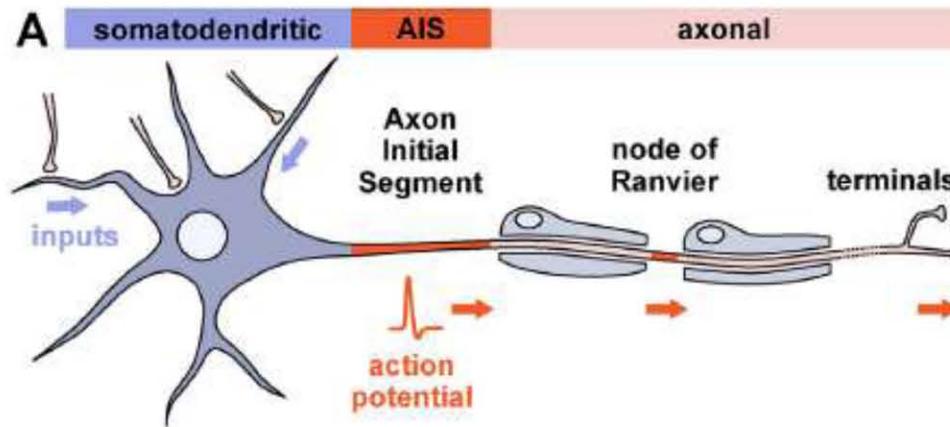


Figura 15. Estructura del axón. La información captada en la neurona por el área somatodendrítica, el potencial de acción generado viaja a través del axón hasta llegar a los pies terminales de la neurona (Leterrier and Dargent 2014).

6.1 MECANISMOS DE PROYECCIÓN AXONAL:

El cono de crecimiento, es una estructura que se encuentra en la parte final del axón; éste es capaz de recibir señales que están implicadas en el avance, retroceso o cambio de dirección del axón. Esta estructura, tiene una región periférica constituida por lamelopodios y filopodios, y un dominio transmembranal dividido, en el dominio periférico (P) y el dominio central (C), compuestos por organelos y vesículas (Dent, Tang, y Kalil 2003) (Figura 16).

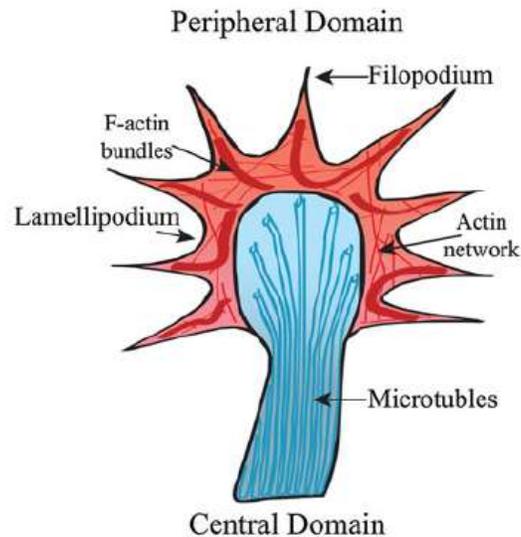


Figura 16. Estructura del cono de crecimiento. Está formado por un dominio periférico, donde encontramos el filopodio; las fibras de actina y el lamelopodia; y el dominio central donde encontramos los microtúbulos (McCormick and Leipzig 2012).

El crecimiento de las prolongaciones neuronales o neuritas, comprenden tres pasos; 1) el avance de la zona periférica del cono de crecimiento; 2) el llenado de la zona periférica con organelos, adquiriendo características de la zona central y 3) la consolidación donde se lleva a cabo la construcción y la formación de una estructura cilíndrica, que favorecerá la formación del nuevo axón (Dent, Tang, y Kalil 2003).

Existen señales, GTPasas, como Rho y RAC, las cuales están encargadas de la polimerización y despolimerización de los filamentos. Los filamentos de actina, como los microtúbulos, son estructuras polimerizadas, las cuales tienen un segmento positivo y un segmento negativo. En el segmento positivo se añaden monómeros de actina globular o heterodímeros de tubulina α y β ; en el extremo negativo, se produce la despolimerización de los filamentos (Bouquet y Nothias 2007).

La polimerización y despolimerización, está regulada por proteínas que favorecen la formación de los filamentos, como, la profilina o proteínas de la familia Ena/VASP. En la despolimerización, actúan proteínas como la gelsolina y cofilinas; además de estos eventos, se produce el avance del cono axónico por el acoplamiento del citoesqueleto y el sustrato a través de receptores transmembranales, los cuales forman sitios de adhesión, que permiten el avance del cono de crecimiento y la contractilidad de la actina-miosina (Bouquet y Nothias 2007).

6.2 REGULACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN Y DESPOLIMERIZACIÓN.

Para la regulación de estos eventos, se produce una activación del complejo Cdc42-N-WASP, la cual, activa al factor ARP2/3, para estimular a la polimerización de la actina. Este factor, activa a RAC y efectores IRSp53 y WASP. Para la despolimerización de la actina, es inducida por el complejo cofilina/ADF; la cofilina es activada por la fosfatasa SSH e inhibida por la cinasa LIM. La unión de RAC/Cdc42, puede activar a LIM, a su vez la señal de Rho/ROCK, activa a la fosfatasa SSH, lo cual promueve la despolimerización de la actina (Bouquet y Nothias 2007).

Al finalizar la polimerización, y despolimerización, continúa la contractibilidad de la actina-miosina. Esta, inicia por la activación del complejo Rho/ROCK, la cual incrementa la contractibilidad de la miosina. ROCK puede inducir la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina 2 (MLC2), por la activación de la cinasa de las cadenas ligeras de miosina; al mismo tiempo inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina. Al incrementarse la fosforilación de MLC, comienza la contracción de la miosina-actina, lo cual favorecerá a la elongación del axón (Bouquet y Nothias 2007).

La activación de Rho, por la forma, favorece a la nucleación de los microtúbulos (MTs), por proteínas como EB1 y APC. Se ha demostrado, que la activación de RhoA, el cual es activado por GEF, promueve la despolimerización de los MTs y su polimerización se da por la activación de RAC1. Estos eventos, son conocidos como señales retrogradadas, los cuales pueden regular el dinamismo de la actina y MTs, para los movimientos; esta coordinación de filamentos de actina y MTs es regulada por el cono de crecimiento. También, se dice que, en este movimiento coordinado, están implicadas moléculas motoras como la dineína o kinesinas, las cuales pueden controlar el avance o retracción del axón (Bouquet y Nothias 2007).

Una vez que el axón ha crecido, este realiza funciones específicas como: la transmisión de información en forma de potencial de acción a través de su membrana axonal. Esta información es transmitida, por estructuras como el segmento inicial del axón AIS, y los bastones presinápticos. El AIS, está localizado en la parte proximal del axón, es rico en canales iónicos, proteínas de soporte, moléculas de adhesión y proteínas del citoesqueleto.

Esta estructura es importante para el mantenimiento del axón, ya que, puede actuar como una barrera, para restringir el paso de proteínas y lípidos hacia el axón, esta barrera está conformada principalmente por las proteínas Ankirina-G (proteínas transmembranales) y la β IV espectrina (Bouquet y Nothias 2007).

Los botones sinápticos, son sitios presinápticos, los cuales son esenciales para transmitir la información conectando con su célula diana o célula postsináptica. En esta zona se realiza la liberación de los neurotransmisores mediante el mecanismo de exocitosis de las vesículas sinápticas (SVS).

Esta liberación regula el reclutamiento, el acoplamiento de las SVS a la membrana plasmática, la cual es regulada por la liberación de calcio. Posterior a esto, continúa la endocitosis de las SVS, a la membrana plasmática para reponer las vesículas liberadas.

6.3 TRANSPORTE AXONAL.

El citoesqueleto del axón juega un rol esencial para la distribución de proteínas en el axón, las vesículas, organelos y moléculas de señalización, para controlar la polimerización, elongación axonal y la función sináptica (Kevenaar y Hoogenraad 2015).

Los MTs y los filamentos de actina son estructuras polarizadas, con un segmento positivo, donde se unen los monómeros de actina globular o heterodímeros de tubulina α y β , y un segmento negativo, donde se lleva a cabo la despolimerización de cada filamento. Existen tres clases de proteínas motoras: kinesinas, dineinas y miosina. La miosina, se mueve a lo largo de los filamentos de actina y está involucrada con la contractibilidad. La kinesina y la dineina, se mueven en sentido opuesto; la dineina se mueve hacia la parte negativa de los microtúbulos, mientras que la kinesina se mueve hacia la parte positiva de los MTs. Todas estas proteínas, contienen dominios conservados asociados al citoesqueleto, los cuales se unen al ATP para generar energía para el movimiento (Kevenaar y Hoogenraad 2015).

Para el tráfico vesicular, las proteínas de la familia de las kinesinas-3, como KinesinaF1A, KinesinaF1B β y KinesinaF5, se adaptan a proteínas como DENN/MADD o a liprin- α , lo cual favorece al transporte de los componentes sinápticos. La kinesina F5, puede transportar a proteínas específicas hacia la membrana presináptica, también se ha visto que favorece el transporte de otras proteínas como el BDNF (factor de crecimiento

derivado de cerebro), APP (proteína precursora amiloide) entre otras (Kevenaar y Hoogenraad 2015).

6.4 PROTEINAS FRAGMENTADORAS Y DESESTABILIZADORAS.

Estas proteínas, están implicadas en la remodelación y desestabilización de los MTs durante el crecimiento axonal. La katanina y espastina, son proteínas fragmentadoras que favorecen la ramificación axonal (D. J. Sharp y Ross 2012).

La katanina, es una proteína que estimula el crecimiento del axón, por la liberación de los MTs del centrosoma; los segmentos más cortos de estos MTs, viajan a través de los microtúbulos del axón para favorecer el crecimiento. El efecto que tiene, sobre los centrosomas es controlado por la regulación negativa de proteínas asociadas a los microtúbulos MAP y tau.

La espastina, afecta a la morfología axonal y su función específicamente en la organización de los MTs de los axones. Ésta trabaja en conjunto con la katanina, para regular la morfología del axón, promoviendo la formación de colaterales, además de que, está implicada en el control morfológico de las dendritas (D. J. Sharp y Ross 2012).

Dentro del grupo de las proteínas desestabilizadoras, se encuentra la estatmina. La estatmina-1, es una proteína con gran importancia en la diferenciación neuronal. La estatmina-3, regula el dinamismo de los MTs; esta depende de la fosforilación de los MTs en el axón, la cual es activada por la tubulina (Chauvin y Sobel 2015).

6.5 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES.

Las proteínas estructurales, están implicadas en la regulación de la organización dinámica de los MTs y su polarización.

CRMPs:

Las proteínas mediadoras a la respuesta de la colapsina (CRMP) son fosfoproteínas, citosólicas de la familia CRMP/TOAD, existen cinco isoformas CRMP1-CRMP5. La expresión de las CRMP puede ser inducida por factores de diferenciación neuronal como, Noggin, GDNF (factor de crecimiento derivado de glía), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos). Se ha observado que CRMP1, 2 y 5, pueden ser expresadas en interneuronas del bulbo olfatorio adulto, donde existe neurogénesis (Schmidt y Strittmatter 2007). La isoforma CRMP2, juega un rol importante en la polaridad neuronal, regulando el dinamismo de los microtúbulos, ésta se colocaliza con los MTs, induciendo así el ensamblaje de los Mts por la unión de los heterodímeros α y β tubulina; además se sabe que CRMP2, puede mediar el colapsamiento del cono axónico, la cual, es dependiente de la fosforilación inducida por la semaforina Sema3 (Schmidt y Strittmatter 2007). En respuesta a la activación de la Sema3, se produce la fosforilación de las proteínas CRMP, promoviendo la activación de varias cinasas como, fyn, cdk5, Gsk3 β , Lim y Fes. Lo que producirá que las CRMP, favorezcan el crecimiento neurítico y promuevan la polaridad neuronal, además de jugar un rol importante en el dinamismo de los filopodios en el desarrollo del cono axónico (Schmidt y Strittmatter 2007; Brot y cols. 2010).

Otras proteínas estructurales importantes son las proteínas asociadas a los microtúbulos MAPs.

MAP1:

La familia de las proteínas MAP-1 está compuesta por tres miembros: los de alto peso molecular MAP 1A y MAP 1B; y las de bajo peso molecular MAP 1S. Estas proteínas tienen la capacidad de estabilizar a los microtúbulos (Mohan y John 2015). Las proteínas MAP 1 están conformadas por dos cadenas; una cadena pesada y una cadena ligera. Las regiones de unión a los MTs de MAP 1A y 1B, se encuentran en ambas cadenas; MAP 1A tiene tres regiones de unión, dos en la cadena pesada y una en la cadena ligera; mientras que MAP 1B tiene solamente dos regiones de unión a los MTs, una en la cadena pesada y otra en la cadena ligera, MAP 1S solo cuenta con una sola región de unión en la cadena ligera (Mohan y John 2015).

MAP 1A y MAP 1B, son de tipo neuronal, estas modulan la guía axonal y funciones sinápticas, mientras que MAP 1S está encargada de regular la división celular y la autofagia. MAP 1B es importante para la formación, maduración de las espinas dendríticas y la regulación de la actina del citoesqueleto, coordina el dinamismo de la actina y los MTs, la cual es esencial para la regulación de las espinas dendríticas (Mohan y John 2015).

MAP2:

Es una proteína abundante en el SNC, principalmente expresada en dendritas y en los cuerpos neuronales. MAP2 está asociada con los filamentos de actina en las etapas tempranas del desarrollo axonal, además, está asociada a los MTs para hacerlos más estables. Se ha demostrado que se asocia a actina mediante las espinas dendríticas, las cuales son el principal sitio para la plasticidad (Mohan y John 2015).

Existen cuatro isoformas, las de gran peso molecular MAP 2a y 2b, y las de bajo peso molecular MAP 2c y 2d. MAP 2a, 2b y 2d, son expresadas en el cerebro adulto, mientras que MAP 2c es expresada únicamente en etapas embrionarias, la cual está asociada a la formación de las neuritas. MAP 2 juega un rol importante en la morfogénesis neuronal, especialmente, en el desarrollo de las neuritas y axones, mediando las interacciones entre los MTs y los filamentos de actina (Mohan y John 2015). La interacción de MAP2 con los MTs y la actina, es regulada por la fosforilación y la desfosforilación de la proteína, lo que promueve la interacción de los MTs y la actina, favoreciendo a la estabilidad del citoesqueleto. Puede ser fosforilada por diversas cinasas en los residuos de serina-treonina, ya sea por la Ca^{+} /calmodulina, o la proteína cinasa C, o la cinasa mitógeno activada, o la Rho cinasa, y proteínas dependientes del AMP cíclico (cAMP). Y también puede ser desfosforilada por las proteínas fosfatasa 1 o 2A (PP1/PP2A), o por calcineurinas (Mohan y John 2015).

TAU:

Es otra proteína neuronal asociada a los MTs, que está implicada en distintas enfermedades neurodegenerativas. TAU es el principal marcador para los axones, favorece la polaridad neuronal y la elongación axonal, lo que promueve la estabilidad del

ensamblaje de los MTs. Está conformada por una región N-terminal, la cual se proyecta en los MTs, y una región C-terminal, la cual interactúa con los MTs. En la región C-terminal se une a los MTs por regiones ricas en prolinas; entre la región N-terminal y las regiones de unión a los MTs existen también regiones ricas en prolinas, las cuales son importantes para la estabilización de los MTs (Mohan y John 2015).

TAU puede mediar las interacciones de los MTs y la actina en los conos de crecimiento, promueve su interacción con el citoesqueleto favoreciendo cambios morfológicos en el cono de crecimiento, importantes para el desarrollo neuronal (Mohan y John 2015).

6.6 PROTEINAS QUIMIOATRAYENTES Y REPULSIVAS PARA EL CRECIMIENTO AXONAL.

Existen proteínas que actúan como quimioatrayentes o repulsivas, las cuales pueden producir señales que favorecen a la elongación axonal, direccionamiento de las neuritas y las que indican el momento en el cual paran su crecimiento. Dentro de estas proteínas se encuentran las semaforinas, efrinas, netrinas y slits.

NETRINAS:

Son proteínas que favorecen la migración celular y del axón durante el desarrollo del SNC. Existen tres isoformas en los mamíferos, Netrina 1, 3 y 4 y dos relacionadas a GPI ancladas a las membranas, Netrina G1 y G2. Durante la embriogénesis de *C. elegans* y *D. melanogaster*, por ejemplo, existe la secreción de la Netrina UNC-6 y Netrina A/B respectivamente, las cuales son esenciales para la orientación celular y migración axonal

(Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007). La Netrina 1 se ha visto implicada, en la guía axonal dopaminérgica, así como también en la formación de proyecciones axonales en el hipocampo; además, se ha observado la expresión de la Netrina G1 y G2 principalmente en neuronas. También se ha observado que la Netrina 1, tiene la capacidad quimioatrayente, la habilidad de atraer el crecimiento axonal regulando el cono de crecimiento. Esta acción es regulada por la cinasa Rho GTPasa la cual coordina la organización del citoesqueleto y las interacciones adhesivas (Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007).

Dentro de las señales que se activan, ocurre la multimerización del dominio extracelular DCC, este dominio se asocia con proteínas adaptadoras como Nck1, la tirosin cinasa FAK, la cinasa Fyn, la cinasa serina/treonina PAK; así como también se asocia con proteínas de unión a la actina como Ena/Vasp y N-Wasp (Moore, Tessier-lavigne, and Kennedy 2007). Otras señales que se dan, es la activación de la cinasa Rac y Cdc42 que promueve el reclutamiento de la proteína fosfatidilinositol transferasa α , la cual activa al fosfatidilinosito 3 (IP3) y el diacilglicerol (DAG). La IP3 promueve la activación de segundos mensajeros como el calcio intracelular; y el DAG activa a la protein cinasa C (Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007).

Además de actuar como quimiorreceptora, la Netrina 1 ayuda a mediar la quimiorrepulsión; los receptores UNC-5 son los primeros mediadores para la respuesta repelente hacia los receptores UNC-6. En los mamíferos se han reportado 4 isoformas del receptor UNC-5 A, B, C y D, compuestos por dos dominios extracelulares de inmunoglobulinas Ig que se unen a la Netrina, y dos dominios extracelulares de trombospodina Tsp. El dominio intracelular de UNC-5 contiene tres dominios conservados ZU5, un dominio de unión a DCC y un dominio de muerte DD (Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007).

Cuando se activa UNC-5 promueve la respuesta repulsiva y se desencadena la activación de diferentes proteínas como la tirosin cinasa Src1, la tirosin fosfatasa Shp2, proteínas estructurales como la ankirina y proteínas adaptadoras como Max1; las cuales activan directamente a la Netrina 1, promoviendo la fosforilación de UNC-5, y así media la respuesta quimiorrepulsiva. En respuesta a la repulsión, actúan directamente en los conos de crecimiento parando el efecto atrayente de la Netrina 1 (Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007).

En el SNC adulto la Netrina 1 puede ser expresada en diferentes tipos de neuronas y células mielínicas como los oligodendrocitos y células de Schwann. Se sabe que la Netrina 1 se encuentra anclada en la zona periaxonal de la mielina lo que favorece la interacción de los axones y los oligodendrocitos, además de influir en la maduración de los oligodendrocitos promoviendo así una regeneración de axones dañados (Moore, Tessier-lavigne, y Kennedy 2007).

EFRINAS Y SUS RECEPTORES:

Los receptores Eph, son miembros de los receptores tirosin cinasa; estos están involucrados en señalizaciones que originan ellos mismos provenientes de los ligandos de las efrinas unidas a las membranas. Las efrinas están agrupadas en dos clases: efrinas As las cuales están ancladas a la membrana mediante una proteína GPI y las efrinas Bs la cual tiene un dominio transmembranal seguido de un dominio corto citoplasmático. La efrina A está constituida por 5 subclases A1 a la A5, y la efrina B contiene tres subclases B1 a la B3 (Huot 2004).

Los receptores Eph están divididos dentro de la subclase A los cuales contiene 8 miembros EphA1-EphA8, y la subclase B contiene 5 miembros EphB1-4 y EphB6. Los receptores tienen un dominio extracelular que contiene un dominio de unión al ligando, una región rica de cisteínas y dos dominios con una secuencia repetida de fibronectina tipo III, además de una región más corta transmembranal, el dominio citoplasmático (Huot 2004).

El sistema efrina-Eph, puede regular muchas funciones celulares que dependen de la remodelación del citoesqueleto, así como también guía axonal y plasticidad sináptica. La unión de las efrinas a sus receptores Eph, promueven una señalización hacia adelante en células que expresan sus receptores; pero también pueden favorecer una señalización reversa especialmente en células que expresen el receptor EphB. La activación intrínseca de las cinasas que comienzan los receptores, activan una auto-fosforilación del Eph en las regiones de los residuos de tirosina, lo que provoca una señalización hacia adelante, reclutando e interactuando con dominios Sh2 (dominio homólogo a Src), además de que se unen a proteínas adaptadoras. Esta fosforilación de efrinas-Eph producida en la cola de la región citoplasmática o en la región de los residuos de las tirosinas, pueden promover una señal reversa, la cual favorecerá la activación de moléculas como Grb4. Las efrinas A pueden secretar señales reversas, activando a la cinasa Fyn; el resultado de esta activación, va a promover el colapsamiento celular, la disminución de la regulación de moléculas de adhesión y la activación de señales de muerte (Huot 2004).

La señal hacia adelante de las efrinas, pueden regular el dinamismo de la actina por la activación de Rho; la efrina A5 activa a las cinasas RhoA y a ROCK, inhibiendo la actividad de RAS, este evento lo va a promover la efrina (factor de cambio de interacción con el Eph), lo que promoverá la unión a Rho al citoesqueleto. La efrina que se une directamente a la EphA4, activa a la cinasa Rho A e inhibe la actividad Cdc42 y Rac1, las

cuales a su vez, inhiben la acción de PAK favoreciendo así la regulación del dinamismo de los filamentos de actina (Huot 2004). Además se ha visto que EphB2 puede inhibir la actividad de RAS, lo que promueve la inactivación de la señalización intracelular, favoreciendo así a la retracción de las neuritas, la remodelación y movilidad de la actina de los conos de crecimiento para regular el flujo retrógrado de los filamentos (Huot 2004).

SLITS:

Son proteínas quimiotrópicas, de las cuales existen en mamíferos 3 isoformas: Slit 1, 2 y 3; sus receptores ROBO contienen 4 isoformas ROBO1-4. Los Slits y ROBO fueron identificadas por su función repulsiva las cuales pueden mediar la señalización de la Netrina-DCC (Mehlen, Delloye-Bourgeois, and Chédotal 2011). Los receptores ROBO contienen cinco dominios de inmunoglobulinas IgG, tres dominios de fibronectina tipo III y cuatro dominios citoplasmáticos. Las proteínas Slits poseen una estructura general, una región N-terminal, cuatro dominios D1-D4 con secuencias repetidas de leucina, un dominio parecido al EGF (factor de crecimiento endotelial), un dominio de laminina-G y una región C-terminal rica en cisteínas (Ypsilanti, Zagar, and Chédotal 2010).

La expresión de los Slits y ROBO puede ser de forma complementaria o sobre diferentes estructuras, lo que favorece a la orientación del cono de crecimiento; además actúan como guía del cono de crecimiento y en la migración neuronal (de Castro 2003). Su activación es mediante la citocina Rac, cuando Rac GAPs y GEF se une a ROBO, esto permite mediar su función repulsiva en el axón (Bashaw and Klein 2010). Se ha observado que Slits puede mediar la migración neuronal; este efecto es por la activación del Ca^{+} y de la cinasa Rho, las cuales van a modular la migración de neuronas corticales en la fase

embrionaria. El Ca^+ activado va a promover la activación de Rho el cual, ayudará a la direccionalidad de las neuronas (Ypsilanti, Zagar, and Chédotal 2010).

La señalización de ROBO, también puede estar mediada por moléculas secundarias o co-receptores como la DCC (receptor de Netrina 1), el cual se puede unir a ROBO-1 en su dominio CC1, esta unión favorece la activación de Rho, lo que a su vez, activará a un complejo de RhoA, Cdc42 y Rac1 y promoverá a una fosforilación para el cambio de GDP a GTP, favoreciendo así el dinamismo de la actina en el citoesqueleto (Ypsilanti, Zagar, y Chédotal 2010).

SEMAFORINAS:

Son proteínas que pueden ser secretadas o estar unidas a las membranas, éstas fueron identificadas principalmente como moléculas guadoras del crecimiento axonal, pero además se ha demostrado la función de mediadoras de señales repulsivas (Battistini y Tamagnone 2016). En invertebrados se expresan las clases 1 y 2 y un tipo de la clase 5 (Sema 5c); las semaforinas de la clase 5 son de tipo viral. En vertebrados se encuentran las semaforinas de la clase 3 de la A-G, las cuales son proteínas secretadoras; las semaforinas de la clase 4 a la 7 (Sema 4 A-D, F y G; Sema5 A y B; Sema6 A-D y Sema7A), son proteínas que se encuentran unidas a la membrana. Los receptores de las semaforinas son las plexinas y neuropilinas (O'Malley y cols. 2014).

Las semaforinas pueden actuar como señales repulsivas hacia el crecimiento axonal, también actúa sobre el direccionamiento de los axones, así como también, pueden inhibir a los axones cuando se dirigen a zonas inapropiadas. Estas funciones se presentan principalmente en etapas embrionarias, pero también se ha demostrado que se presentan en sistemas adultos después de una lesión (Artigiani, Comoglio, y Tamagnone 1999).

Otra de las señales que pueden mediar es la fasciculación o desfasciculación axonal. La Sema-1 puede actuar en la señalización para desfasciculación cuando se une a su receptor Plexina A en la membrana plasmática; esta señal puede actuar de forma bidireccional para mantener un balance entre las señales de atracción o repulsión (Battistini y Tamagnone 2016). Estas señales son dependientes a la unión de GPI, cuando se presenta una fosforilación promoviendo un intercambio de GDP/GTP, este intercambio promueve la activación de Rho1 promoviendo así la repulsión y desfasciculación axón-axón; mientras que el complejo P190-RhoGAP, que también es formado, puede actuar como antagonista para la atracción axonal (Battistini y Tamagnone 2016).

Se ha demostrado que la Sema3A, puede inhibir la motilidad de las células endoteliales y la formación de los microvasos, estas funciones son atribuidas a la unión de la Sema3A con receptores de VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) y a la neuropilina-1 (Artigiani, Comoglio, y Tamagnone 1999). Otras semaforinas como la Sema5A y Sema6A, pueden actuar en el crecimiento axonal por sus efectos duales; la Sema5A es expresada en los oligodendrocitos, lo que favorece al colapsamiento del cono de crecimiento. Otras como la Sema 4D, 4F están implicadas para promover la interacción de los axones, lo que favorece la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de los oligodendrocitos y células de Schwann; también se ha observado que la Sema4B y 4D están implicadas en la sinaptogénesis (Battistini y Tamagnone 2016) (Figura 17).

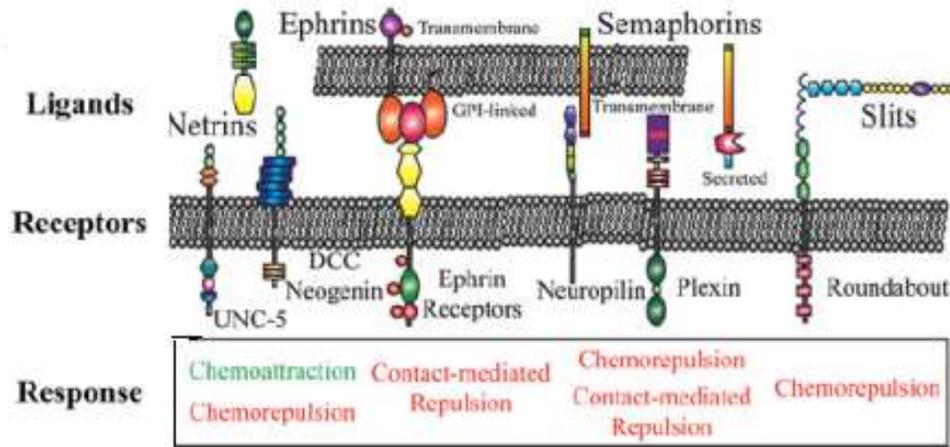


Figura 17. Esquema de las proteínas y sus receptores. La unión de la Netrina a su receptor da una respuesta dual como quimiorreceptora o quimiorrepulsiva; la unión de la Efrina a su receptor promueve la repulsión mediante el contacto; la Semaforina al unirse a sus receptores actúa como quimiorrepulsiva, además de mediar la respuesta de repulsión mediante el contacto; y los Slits al unirse a su receptor tiene una respuesta quimiorrepulsiva (modificado de McCormick and Leipzig 2012).

7. FASCICULACIÓN:

Dentro de los eventos de guía axonal, existen interacciones entre los axones una de ellas es conocida como fasciculación. La cual es mediada por proteínas de adhesión, como las inmunoglobulinas IgCAMS. Estas proteínas actúan tanto en la fasciculación como en la defasciculación, realizando la interacción y la formación de las fibras nerviosas. Estas interacciones pueden ser homofílicas (proteínas del mismo tipo que pueden estar en células o en los axones), o heterofílica (se da entre diferentes proteínas de adhesión o transmembranales) (Masuda and Shiga 2005). También estas proteínas de adhesión, pueden actuar como co-receptores como L1 y TAG-1 directamente de las neuropilinas,

modulando el efecto repulsivo o de atracción cuando se unen a la Sema3B y 3F (Masuda y Shiga 2005; Maness y Schachner 2007).

8. ANTECEDENTES.

8.1 ESTRATEGIAS PARA LA REINERVAÇÃO FUNCIONAL DESPUÉS DE UNA LESIÓN.

La capacidad regenerativa de las neuronas después de una lesión en el SNC es limitada y depende de la zona y la severidad de la lesión, causando un daño sustancial al tejido nervioso, que provoca un déficit neurológico, secundario al daño tanto vías ascendentes como descendentes (Giger, Hollis, y Tuszynski 2010). Se han propuesto hipótesis para la reinervación después de una lesión de médula espinal: 1) La regeneración a larga distancia que genere una conexión sináptica apropiada, mediante la ramificación de nuevos axones que podrían realizar nuevas conexiones con las células diana de los axones dañados originalmente; 2) regeneración de corta distancia, que posibilite la formación de ramas colaterales, que puedan formar contactos sinápticos con células vecinas, las que a su vez se pueden conectar con las células diana de los axones dañados; y 3) crecimiento de axones preservados, los cuales puedan mantener una conexión con las células diana del sitio de lesión (Giger, Hollis, y Tuszynski 2010) (Figura 18).

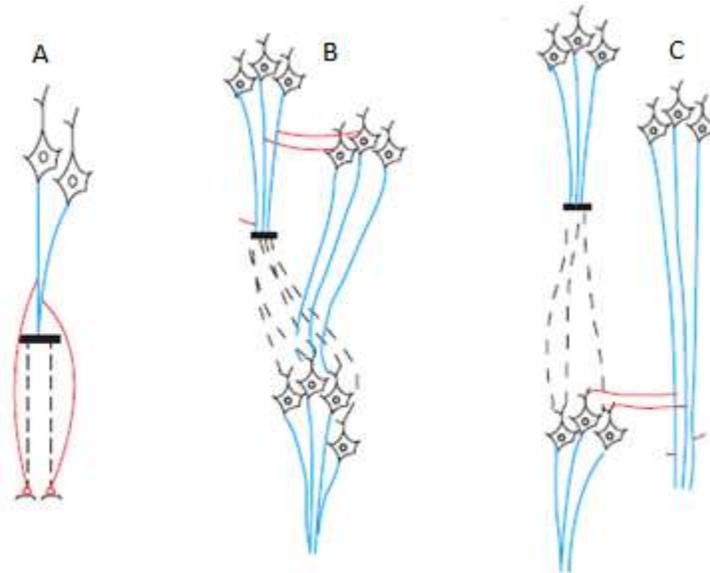


Figura 18. Esquema de las estrategias propuestas para la reinervación después de una lesión de médula espinal. A) Regeneración axonal a larga distancia; B) Regeneración a corta distancia; C) Crecimiento de axones preservados (Giger, Hollis, and Tuszynski 2010).

9. ESTRATEGIAS PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO AXONAL Y LA MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA.

La capacidad limitada que tiene el SNC para regenerarse, con el efecto secundario sobre la función locomotora en el caso de la LTME, ha favorecido el desarrollo de diferentes estrategias, como el uso de fármacos, puentes biológicos y químicos, terapias celulares y factores exógenos, para promover la mejoría estructural y funcional.

9.1 TRATAMIENTOS SIMPLES.

9.1.1 ESTRATEGIAS PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO ATRAVES DE PUENTES. TRASPLANTES DE TEJIDO FETAL.

Considerando que los axones del SNC crecen libremente en la etapa del desarrollo no sólo se han realizado trasplantes de tejido de médula espinal fetal para remplazar las neuronas dañadas, sino que también se han utilizado como puentes para promover la regeneración axonal (Rodriguez y cols., 2004), considerando que pueden secretar factores de crecimiento y pueden actuar favoreciendo la formación de puentes para promover la regeneración axonal. Coumans y cols, 2001, realizaron implantes de tejido fetal en un modelo de sección completa para lograr una reconexión y poder mejorar la función locomotora (Coumans y cols., 2001). De acuerdo a la revisión hecha por Rodriguez y cols., 2004, encontraron que los implantes llevados a cabo en animales neonatos con este modelo de lesión sí lograban una diferencia significativa tanto en la regeneración axonal como en la mejoría de la función locomotora; sin embargo, al compararlo con lo encontrado en animales adultos no se observó mejoría funcional (Rodriguez y cols., 2004). En los últimos diez años, no existen publicaciones con este tipo de paradigma.

9.1.2 USO DE PUENTES DE NERVI PERIFÉRICO.

Los trasplantes de nervio periférico se han utilizado para reparar las lesiones del SNP utilizándose como puente para favorecer la regeneración axonal y la refuncionalización (M.-P. Côté et y cols. 2011). Con el mismo objetivo también se han utilizado en SNC, el trasplante de nervio periférico fresco.

El nervio periférico predegenerado (NPP) favorece la regeneración axonal y la refuncionalización, después de una LTME 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), además, 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). Es una alternativa viable para estudios pre-clínicos y clínicos.

9.1.3 USO DE PUENTES INERTES.

El uso de puentes de biomateriales ha sido una alternativa atractiva para la neuroregeneración. Los puentes inertes son estructuras temporales que soportan el crecimiento celular y del tejido. Estos materiales tienen la característica de ser biodegradables, pueden favorecer la fuerza mecánica, pueden ser fibras o canales porosos y tienen la capacidad de la adhesión celular (Tsintou, Dalamagkas, and Seifalian 2015).

Existen diferentes tipos de materiales usados como los hidrogeles, los cuales son implantes biocompatibles para la reparación después de una LTME. Este material forma puentes para la regeneración, además, de que previenen la formación de la cicatriz fibrogliosa promoviendo así un ambiente permisivo para la regeneración. También se han diseñado nanofibras en tercera dimensión, las cuales proveen una mejor adhesión celular, favorecen a la migración, la proliferación y la diferenciación celular (Tsintou, Dalamagkas, and Seifalian 2015).

Los andamios o puentes pueden estar conformados de materiales biológicos como la colágena o fibronectina; o de polímeros naturales como el alginato, agarosa o quitosana; o también pueden estar compuestos de polímeros sintéticos como el ácido polihidroxi- α , poli-2-hidroxetilmetacrilato o el polietilenglicol (Sakiyama-Elbert et al. 2012; Raspa et al. 2015).

Se ha demostrado que estos materiales en modelos de LTME (contusiones, secciones o hemisecciones) que pueden favorecer el crecimiento axonal, y a direccionar este crecimiento, ya que actúan como puentes (Tsai et al. 2006; Günther et al. 2015). También se ha observado que son compatibles para usarse en combinación con otros tratamientos como células o factores tróficos, lo que promueve un ambiente permisivo para este crecimiento axonal (Tobias et al. 2005; Taylor et al. 2006; J. Zhang et al. 2016). Además se ha observado que favorece la mielinización de los axones, ya que ayuda a la adhesión de los oligodendrocitos o células de Schwann, favoreciendo así a la remielinización de los axones dañados (King et al. 2006).

9.2 TRASPLANTE DE CÉLULAS

El término 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 envoltantes de glía olfatoria (OEG), trasplante de células troncales embrionarias, hematopoyéticas, células troncales neurales y células estromales de medula ósea (CEMO) (Watt y Driskell 2010).

9.2.1 USO DE 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). 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 el segundo tipo son las Cs no mielinizadoras (Mirsky y cols., 2002)(Figura 17).

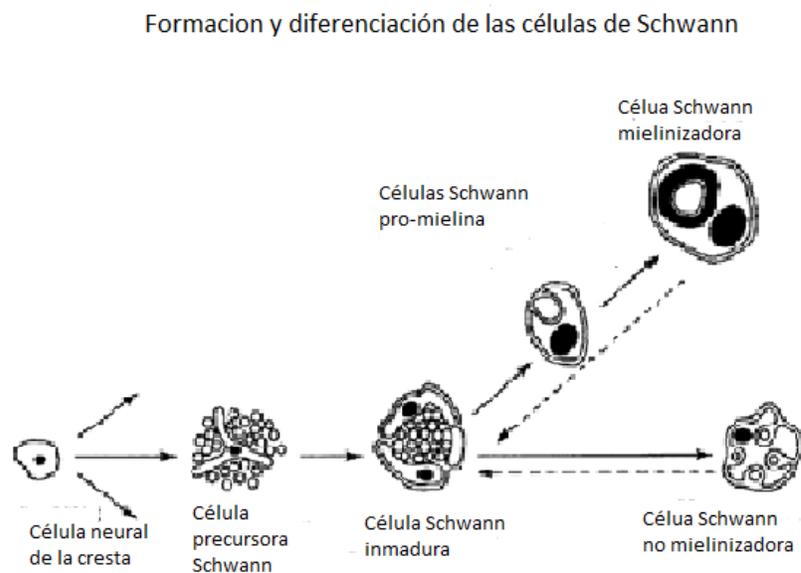


Figura 19. Formación y diferenciación de las células de schwann. De las células neurales de la cresta se pueden formar varios tipos celulares, dentro de ellas está se puede diferenciar en células precursoras de células de schwann; estas a su vez forman a las células de schwann inmaduras. Con el paso 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 mielinizadora (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., 2005, 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 sólo 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 et al. 2007; Guest et al. 1997). También se ha demostrado que combinación con otros materiales pueden ayudar como guía para el recrecimiento axonal después de una LTME (Martin Oudega and Xu 2006; Xu et al. 1997).

9.2.2 USO DE CÉLULAS ENVOLVENTES DE GLÍA OLFATORIA

OEG.

Las células de glía envolvente olfatoria (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).

Ramón-Cueto y cols; demostraron que las OEG ayudaban al recrecimiento de axones sensoriales después de una lesión medula (Ramón-Cueto y cols., 1998); Doucette`s y cols; describieron la sobrevivencia de las OEG después de haberlas trasplantado en cerebro (Doucette y cols.,1996). En modelos por contusión y sección completa se ha demostrado la capacidad que de las OEG para ayudar a la protección del tejido después de trasplantarlas, promueven el crecimiento axonal y favorecen la mejoría de la función locomotora (López-Vales et al. 2007; Torres-Espín et al. 2014).

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).

9.2.3 TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES.

Las células troncales son 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 se 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; en las que podemos encontrar 3 diferentes tipos: las células embriológicas (ES), células troncales derivadas del epiblasto (epiSC) y células embriológicas germinales (CEG). Estas células poseen características como: la isoenzima de la fosfatasa alcalina; el factor de transcripción Oct4, y marcadores de membrana reconocidos por anticuerpos monoclonales (Giraldo y cols., 2003).

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVIOS PERIFÉRICOS PREDEGENERADOS SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÚDULA ESPINAL.

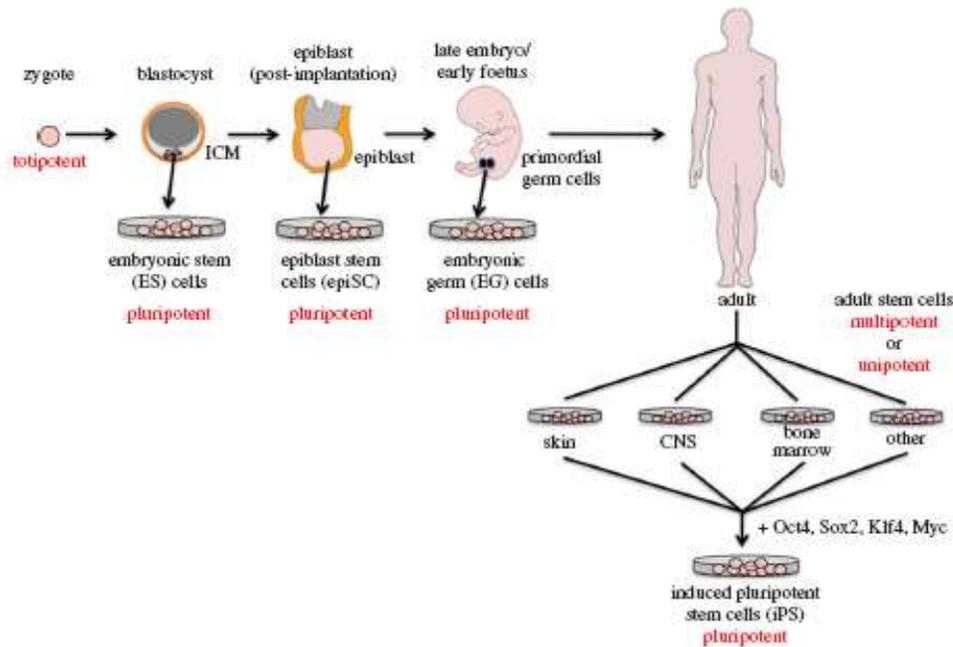


Figura 20. Origen de las células troncales. Las células madre se pueden dividir en cuatro tipos; las totipotenciales provenientes del cigoto y son las cuales pueden originar todo un organismo; las células pluripotenciales las cuales pueden formar las células de las tres capas ectodérmicas. Y en un adulto podemos encontrar células troncales llamadas multipotenciales o unipotenciales, las cuales se pueden diferenciar en diferentes tipos celulares de tejido adulto (Watt y Driskell 2010).

Las células multipotenciales, son células de morfología fibroblastoide, 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 tallos epidérmicos, encontrados 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), en base a esto se han utilizado células troncales embrionarias y células troncales adultas.

9.2.4 CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS.

Dentro de las células embrionarias pluripotentes encontramos a las células sanguíneas del cordón umbilical (UCBSCs), células troncales embrionarias (ESCs) y células troncales inducidas (iPSCs).

Las células de sangre de cordón umbilical (UCBSCs) inicialmente se usaron para el remplazo de células hematopoyéticas, recientemente se observó que tenían la capacidad de diferenciarse tanto *in-vitro* como *in-vivo* en células de tipo neural. En base a esta

característica, se han usado como trasplantes en diferentes modelos de LTME aguda (contusiones, secciones, hemisecciones), donde se ha demostrado que los animales con el trasplante de las UCBCs promueve la mejoría de la función locomotora, disminuye la formación de la cicatriz fibrogliosa y disminuye la apoptosis (Venkata Ramesh Dasari., Daniel G. Spomar., Christopher S. Gondi, Christopher A. Sloffer., Meena Gujrati., and Jasti S Rao., 2008). También pueden promover la expresión del factor de crecimiento derivado de glía GDNF y el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF en el sitio de lesión, además de que pueden incrementar los niveles de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y disminuir citocinas pro-inflamatorias TNF- α (Harris 2008; Sun and Ma 2011; Chung et al. 2015).

Otro tipo celular son las células troncales embrionarias ESCs, son células pluripotenciales derivadas de la capa interna del blastocisto. Las ESCs tienen la capacidad de replicarse indefinidamente y diferenciarse en cualquier tipo celular de la capa germinal, estas no se pueden trasplantar en su forma indiferenciada ya que son capaces de formar teratomas (Siddiqui, Khazaei, and Fehlings 2015). Ya que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular, estas se pueden diferenciar en células de tipo neural, con estas características se han realizado estudios en modelos de contusión, sección completa y hemisecciones para evaluar su efecto. Se ha demostrado que células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de las células troncales embrionarias ESC-OPCs, después de ser trasplantadas favoreció a la remielinización de los axones dañados, redujo la zona de lesión y favoreció a la mejoría de la función locomotora (Kerr et al. 2010; J. Sharp et al. 2010).

Por último, dentro de las células embrionarias se han utilizado células troncales pluripotenciales inducidas iPSCs, estas son células adultas ya diferenciadas que pueden ser reprogramadas genéticamente para regresar a su estado de célula troncal embrionaria.

Estas células tienen la capacidad de una célula pluripotente ya que expresan marcadores como Oct4 y Sox2. En modelos de LTME se ha demostrado, que las células progenitoras neurales derivadas de la iPSCs, pueden diferenciarse en neuronas y células gliales, además favorecen la remielinización de los axones dañados, pueden promover la sobrevivencia neuronal y ayudan a la mejoría de la función locomotora (Hatami et al. 2009; Nutt et al. 2013; Salewski et al. 2013).

9.2.5 CÉLULAS TRONCALES ADULTAS.

Dentro de las células troncales adultas tenemos a las células troncales progenitoras neurales NPCs, células troncales hematopoyéticas HSCs y células troncales mesenquimales o estromales de médula ósea CEMO.

Las células troncales progenitoras neurales NPCs, son células multipotentes capaces de auto-renovarse y diferenciarse principalmente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Siddiqui, Khazaei, and Fehlings 2015). En modelos por contusión, hemisección y sección completa se ha demostrado que el efecto que tienen las NPCs después de trasplantarlas, es promover el crecimiento axonal y la mejoría de la función locomotora (Karimi-Abdolrezaee et al. 2006). Los mecanismos de acción de las NPCs son, el reemplazamiento celular, el favorecimiento de la plasticidad, la promoción de la remielinización mediante la diferenciación hacia oligodendrocitos, el aumento de la regeneración axonal y efectos inmunomoduladores (Karimi-Abdolrezaee et al. 2006; Hawryluk et al. 2012; Yasuda et al. 2011).

Las células troncales hematopoyéticas HSCs son células mesenquimales multipotentes, que tienen la capacidad de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular, se ha observado que tienen la capacidad de diferenciarse en células de tipo neural como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Koshizuka et al. 2004). En base a esta característica, las HSCs se han utilizado como trasplante en modelos de LTME. Se ha visto

que favorecen un ambiente permisivo para el crecimiento axonal, promoviendo así una mejoría de la función locomotora (Koda et al. 2005; Koshizuka et al. 2004).

Por último, las células troncales mesenquimales o células estromales de médula ósea CEMO, son células multipotentes adultas que tienen la capacidad de auto-renovación, proliferación y diferenciación. Las células estromales son una alternativa para el tratamiento experimental de una lesión de médula espinal (contusiones, secciones completas o isquemia). Las CEMO 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 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), 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), proliferan después de haberlas trasplantado (Chen y cols., 2008), ayudan a la supervivencia neuronal y disminuyen la apoptosis.

Otro factor importante de las CEMO es el efecto inmunomodulador, al ser capaces de secretar factores solubles mediadores inflamatorios como la indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO), la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), y la hemo-oxigenasa 1; también pueden secretar el antígeno G de leucocitos humanos, factor transformante β (TGF- β), la interleucina 6 (IL-6) y la prostaglandina E2. Estos factores solubles promueven la inhibición de las células T CD4⁺ CD8⁺ (Jorgensen 2010). Se ha demostrado en contusiones y compresiones que el uso de las CEMO favorece la disminución de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-6; y promueve la secreción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, IL-10 e IL-13, las cuales van a favorecer a la activación de macrófagos M2 promoviendo un ambiente neuroprotector (Nakajima et al. 2012; Urdzíkova et al. 2014).

9.3 USO DE FACTORES EXÓGENOS.

Otra estrategia implementada es el uso de factores exógenos como los factores de crecimiento y la enzima condroitinasa ABC.

Las neurotrofinas son proteínas estructurales que están conformadas por cuatro familias, las cuales están implicadas en eventos en el desarrollo del SNC, como la supervivencia, la diferenciación y el crecimiento axonal (Harvey et al. 2015). Dentro de

estas encontramos al factor de crecimiento neuronal NGF, la neurotrofina 3 NT-3, la neurotrofina 4/5 NT-4/5 y el factor de crecimiento derivado de cerebro BDNF. Estas neurotrofinas se unen directamente a receptores Trk (receptores tropomiosina cinasa); el NGF se une a su receptor TrkA; el BDNF y la NT4/5 se unen al mismo receptor TrkB y la NT-3 se une a su receptor TrkC; también tienen una alta afinidad al receptor de p75, NTR.

Estudios en modelos de LTME como contusiones, secciones y hemisecciones, las neurotrofinas más estudiadas son el BDNF y la NT-3. El uso del BDNF ha demostrado que favorece la neuroprotección, la formación de ramas colaterales y promueven plasticidad (Kovalchuk, Holthoff, and Konnerth 2004), también se ha visto que favorece al crecimiento axonal mejorando así la función locomotora (Ziemlińska et al. 2014; Ollivier-Lanvin et al. 2015).

Se ha demostrado también en diferentes modelos de contusión, sección completa y hemisecciones, que el uso exógeno de la NT-3 favorece al recrecimiento axonal y a la mejoría de la función locomotora (Johnson et al. 2010; L.-J. Wang, Zhang, and Li 2014).

En cuanto al NGF y la NT4/5, son los menos estudiados en modelos de LTME. Se ha demostrado que el NGF que favorece el crecimiento de axones sensoriales (Huang and Reichardt 2001; S. Feng et al. 2009), además en un estudio por contusión se demostró que el NGF puede reducir la muerte neuronal, promoviendo así una mejoría en la función locomotora (H. Zhang et al. 2014). La NT4/5 al igual que el BDNF, puede promover la neuroprotección y al crecimiento axonal en un modelo de sección completa (Blesch et al. 2004).

Otro factor utilizado es el uso de la enzima condroitinasa ABC (ChABC), es una enzima proveniente de una bacteria *Proteus vulgaris*. Esta es capaz de unirse a las cadenas de los glicosaminoglicanos GAG, dentro de los disacáridos lo que favorece a la digestión de

los condroitin sulfatos CSPGs (R.-R. Zhao and Fawcett 2013). Se ha visto que tanto en modelos de hemisección y sección completa esta enzima favorece el crecimiento axonal (Difei Wang et al. 2011; Jefferson, Tester, and Howland 2011); también en presencia de factores de crecimiento como NT-3 y BDNF, promueve la proliferación de los oligodendrocitos incrementando la remielinización y favoreciendo la mejoría en la función locomotora (García-Alías y cols., 2011; Jefferson, Tester, y Howland, 2011; Karimi-Abdolrezaee, Schut, Wang, y Fehlings, 2012).

9.4 USO DE FÁRMACOS EN LTME.

Hasta el momento se han realizado ensayos del uso de fármacos en animales, donde se han demostrado sus efectos positivos; estos mismos se han aplicado en humanos realizando ensayos clínicos; sin embargo, ninguno de ellos ha mostrado una mejoría evidente para los pacientes. Se mencionarán algunos de los medicamentos usados en LTME.

La metilprednisolona (MPP) es un esteroide sintético del grupo de los glucocorticoides, que es utilizado por sus propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias. Su mecanismo de acción es inhibir la formación del ácido araquidónico y disminuye la inflamación. Se ha observado en estudios en modelos animales de LTME, que la administración de la MPP, favorece a la reducción de la apoptosis, se ha visto que induce la interacción con el receptor de glucocorticoides HIF-1 α , lo que promueve la disminución en el daño de los oligodendrocitos (Ramos and Alegrete 2015). En estudios clínicos con lesiones agudas se ha demostrado que el uso de la MPP favorecía la mejoría en la funcionalidad y en la sensibilidad, en comparación con los pacientes que solo tomaron el placebo (Fehlings, Wilson, and Cho 2014; Bowers et al. 2016; Evaniew et al. 2015).

Otro fármaco utilizado es el Riluzole un anticonvulsivo benzotiasílico, el cual actúa como bloqueador de los canales de sodio. Fehlings y cols, compararon el efecto del Riluzole con la fenitoína en un modelo de lesión aguda por contusión, donde observaron que el Riluzole promovía la recuperación funcional (Fehlings et al. 2015). En estudios con pacientes con lesión aguda, se ha observado que la administración de Riluzole promueve una mejoría sensitiva y locomotora (Fehlings et al. 2015; Nagoshi, Nakashima, and Fehlings 2015).

También se ha utilizado la minociclina es una tetraciclina sintética de segunda generación, usada como agente antibacterial. Este medicamento puede permanecer en el SNC más tiempo que la tetraciclina normal ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica. Este puede actuar como neuroprotector, reduciendo la inflamación y previniendo la muerte celular (Stirling, KOCHESFAHANI, and TETZLAFF 2005). En estudios con pacientes, con lesiones agudas cervicales y torácicos, se observó que la administración de la minociclina no provocó efectos secundarios en los pacientes, además, en los pacientes con lesiones cervicales favoreció la mejoría en la función locomotora en comparación con los pacientes que tomaron solo el placebo; pero en los pacientes con lesiones torácicas no se observaron cambios. En este estudio se concluyó que se debería evaluar el efecto de la minociclina con una N mayor para comprobar su eficacia (Casha et al. 2012).

También se han utilizado bloqueadores de canales de potasio K^+ , la Fampiridina también conocida como la 4-aminopiridina, es un bloqueador específico de canales de potasio K^+ dependientes de voltaje en los axones desmielinizados. El efecto de la Fampiridina es restaurar la conducción del potencial de acción de las fibras que están muy poco mielinizadas (Cardenas et al. 2007).

Cardenas y cols, demostraron en estudios con pacientes con lesiones agudas, que la administración de la Fampiridina tanto oral como vía intravenosa favorecía a la reducción de la espasticidad, mejoría en la función sensitiva y motora (Cardenas et al. 2007).

En este apartado, se mencionaron fármacos utilizados en ensayos clínicos con pacientes con lesión cervical o torácica; estos aunque han demostrado poca mejoría, siguen estando a prueba, ya que no han demostrado ser un tratamiento eficaz para los pacientes con LTME.

10. TRATAMIENTOS COMBINADOS.

Como se ha descrito, el uso de diferentes estrategias como tratamientos únicos en modelos de LTME favorecen la neuroprotección, el crecimiento axonal, la remielinización de los axones dañados y facilitan la mejoría de la función locomotora. Se ha determinado por lo tanto que la combinación de diferentes estrategias sería capaz de promover más eficazmente el crecimiento axonal y la remielinización, favoreciendo el incremento en la función locomotora.

Se ha descrito que la combinación de la ChABC con factores de crecimiento como BDNF y NT-3, puede promover un mayor crecimiento axonal, favorecer la proliferación de oligodendrocitos incrementando así a la remielinización en comparación con los animales que tuvieron solo los tratamientos por separado; esto favoreció a la mejoría de la función locomotora (García-Alías y cols., 2011; Jefferson, Tester, y Howland, 2011; Karimi-Abdolrezaee, Schut, Wang, y Fehlings, 2012).

También se ha estudiado el efecto de las CEMO en combinación con puentes de quitosana o factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias granulocitos G-

CSF, y se observó que los animales con los tratamientos combinados en comparación con los tratamientos simples, favorecía a un mayor crecimiento axonal favoreciendo así el incremento de la mejoría de la función locomotora (X. Chen et al. 2011; Luo et al. 2009).

Por otro lado, se ha evaluado el efecto que tiene el uso del trasplante de NPP en combinación con ChABC o factores de crecimiento, donde se demostró que los animales tuvieron una mayor cantidad de axones regenerados y un aumento en la mejoría de la función locomotora, a diferencia de los animales con el tratamiento simple (S.-Q. Feng et al. 2008; M. Côté et al. 2011; Pierdoná Guzen Fausto, Joacil Germano Soares, José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti, Francisco Gilberto Oliveira, and Jeferson de Souza Cavalcante, Judney Cley Cavalcante 2012).

En nuestro grupo de investigación, se evaluó el efecto de la combinación del NPP y las CEMO en un modelo de sección completa, donde se observó que los animales tuvieron mayor cantidad de axones en crecimiento mediante la detección de GAP43, además de una mejoría en la remielinización mediante la detección de PBM y mediante microscopía electrónica, a diferencia de los animales tratados con el trasplante simple; esto favoreció una tendencia en la mejoría de la función locomotora (Buzoianu-anguiano et al. 2015).

11. JUSTIFICACIÓN.

Hasta el momento no existe tratamiento eficaz para la LTME. No obstante, se ha continuado en investigación biomédica para promover nuevas estrategias para el tratamiento en modelos animales de LTME. Se sabe que el utilizar tratamientos simples como el uso de NPP, CEMO y ChABC en modelos de contusión y lesión aguda por sección completa, ayudan al recrecimiento axonal, generación de emisiones colaterales, remielinización de axones dañados y mejoría de la función locomotora. Sin embargo, a pesar de que la recuperación funcional en esos modelos es satisfactoria, no se ha

demostrado hasta el momento en modelos de LTME crónica. Por lo anterior, el presente protocolo pretende probar nuevas combinaciones de estrategias terapéuticas que promuevan el recrecimiento axonal, y la remielinización como consecuencia favorezcan la recuperación funcional.

12. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La investigación biomédica se ha enfocado en estos últimos años en el estudio de las LTME tanto en lesiones agudas como crónicas; hasta el momento no se ha encontrado un tratamiento eficaz, el cual pueda proveer a los pacientes con LTME una mejoría sustancial en las funciones locomotoras. En la literatura, se ha demostrado en modelos animales, en contusiones como en secciones completas resultados positivos para regeneración axonal, remielinización y mejoría de la función locomotora, utilizando diferentes estrategias como el reemplazo de tejidos y de células. Dentro de estas estrategias el uso de NPP y CEMO por sí solos han demostrado que favorecen el crecimiento axonal, además de actuar como guía para este, y promover la remielinización; estos resultados se han visto incrementados al usar la combinación de ambos tratamientos originando mayor regeneración y mejoría de la función locomotora en modelos animales. Además de la asociación ya mencionada hay que tomar en cuenta la utilización de la condroitinasa ABC, la cual, se ha visto que favorece el crecimiento axonal por su actividad inhibitoria sobre los proteoglicanos (condroitin sulfatos) que dañan al sistema nervioso central. Por todo lo anterior, se propone que la combinación del NPP, CEMO y ChABC, pueda favorecer a una mejoría funcional, gracias a los beneficios que cada una provee; dando como resultado un mayor recrecimiento axonal y mejoría en la función locomotora en animales con LTME crónica.

13. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿La condroitinasa ABC asociada al NPP y CEMO incrementará el recrecimiento axonal, la mielinización y la mejoría de la función locomotora, comparado a lo obtenido con solo NPP y CEMO en ratas con sección completa y crónica de ME?

14. HIPOTESIS.

La condroitinasa ABC asociada al NPP y CEMO en ratas con sección completa y crónica de ME incrementara el recrecimiento axonal, la remielinización tanto en la zona proximal y distal del sitio de trasplante, y la función locomotora, a diferencia de lo obtenido únicamente con el trasplante de NPP+CEMO.

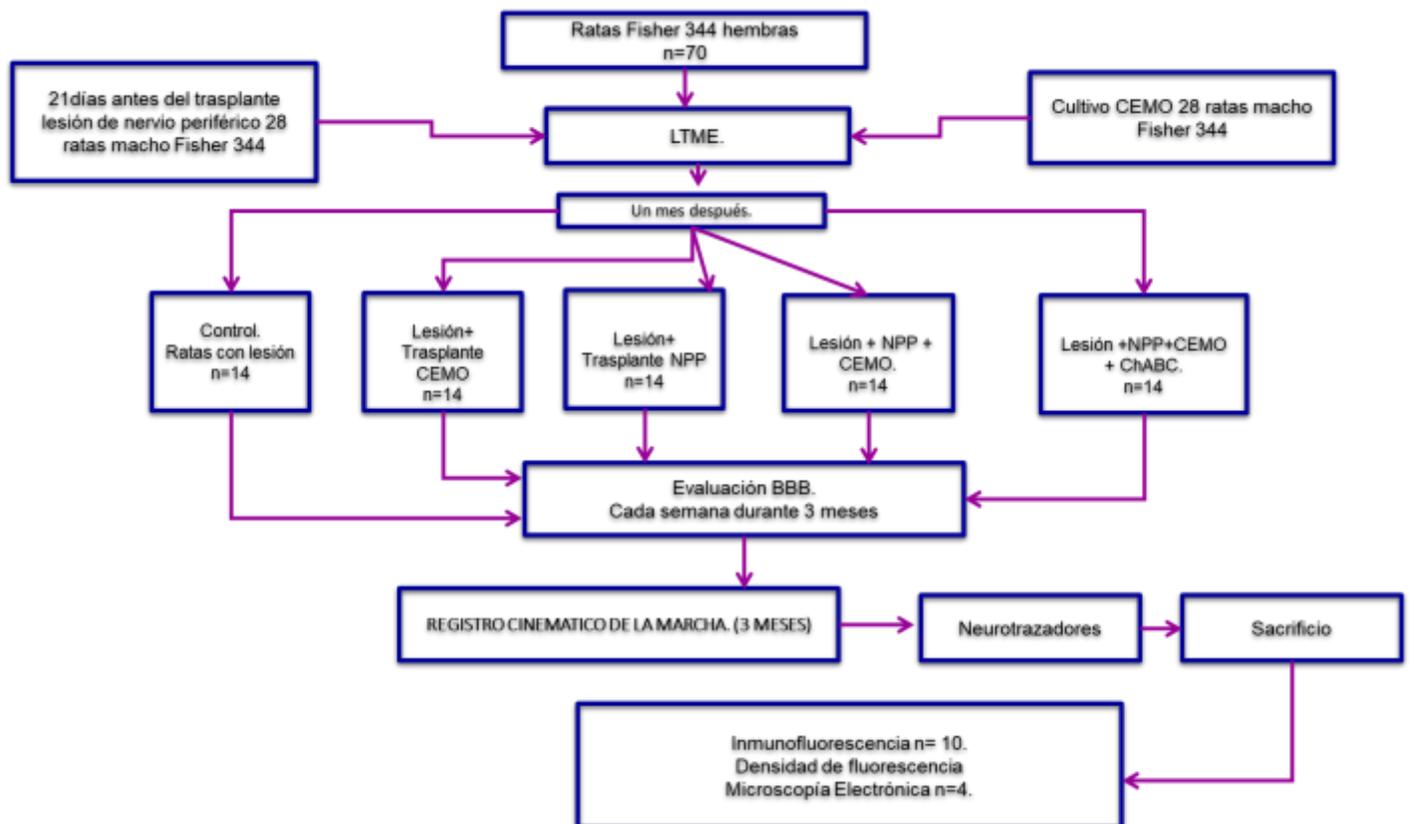
15. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el crecimiento axonal, la remielinización y la función locomotora en ratas con sección completa y crónica de medula espinal con el tratamiento de condroitinasa ABC, trasplante de NPP y CEMO y compararlo con el trasplante de NPP y CEMO.

16. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el recrecimiento axonal en ratas con sección completa y crónica de medula espinal con los trasplantes NPP + CEMO+ Coindroitinasa ABC y compararlo con lo obtenido con el trasplante de NPP + CEMO.
2. Evaluar la remielinización axonal en ratas con sección completa y crónica de medula espinal con los trasplantes NPP + CEMO+ Coindroitinasa ABC y compararlo con lo obtenido con el trasplante de NPP + CEMO.
3. Evaluar la función locomotora del tren posterior en ratas con sección completa y crónica de medula espinal con los trasplantes NPP + CEMO+ Coindroitinasa ABC y compararlo con lo obtenido con el trasplante de NPP + CEMO

17. DISEÑO EXPERIMENTAL.



18. METODOLOGÍA:

18.1 CULTIVO CELULAR.

Las células estromales de médula ósea se obtendrán de ratas donadores machos adultos Fisher 344, con un peso de 220-250g. Se les administrará una sobredosis de pentobarbital sódico 1ml intraperitoneal (i.p.). Con material quirúrgico estéril se disecarán las 2 extremidades inferiores del animal (Tibias y Fémures) y se limpiarán los huesos quitándoles la piel y el músculo para evitar contaminar la extracción de células. Con unas tijeras finas el hueso se cortará sagitalmente, para la extracción de la médula ósea se utilizará una micropipeta de 200 μ l y esta se depositará en un tubo cónico de 15 ml con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle MEM®). Esta se centrifugará a -4°C a 15000 rpm durante 5 minutos. La médula ósea se separará por medio del gradiente de Ficol (3ml) centrifugando la muestra a 24°C a 2000 rpm durante 30 minutos con paro lento. Se cuantificarán el total de células obtenidas por medio de la cámara de Neubauer, y 9×10^6 células nucleadas se sembrarán en un frasco de cultivo de 75cm^2 (en 5ml de MEM con 20% de suero fetal bovino (FSB), 1ml de L-glutamina, 5ml de HEPES y 1ml de Penicilina Estreptomocina) las cuales se pusieron a crecer a 37°C en una incubadora water-jacketed con 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 resembraron nuevamente células (9×10^6) con la finalidad de mantener estas nuevas células una semana en cultivo primario por flotación.

18.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

Sección de ME, predegeneración de nervio periférico, trasplante. Se utilizarán ratas hembras adultas Fisher 344 (8-10 semanas de edad, 200-220 g). Bajo anestesia con ketamina 70 mg/kg y Xilazina (10 mg/kg) todas las ratas se les realizará una sección completa de la ME a nivel T9. Después de la laminectomía y bajo visión en microscopio quirúrgico, la duramadre se abrirá longitudinalmente sobre la línea media (6mm) de longitud y la ME se cortará axialmente con tijeras de microcirugía. Posteriormente de suprimir el sangrado la sección de ME se inspecciona para asegurarse de que la lesión haya sido completa, se secciona la pia aracnoides de la porción anterior de la ME seccionada identificando los dos cabos de la me completamente separados. A continuación, se cerrará la duramadre con un punto (nylon nueve ceros), y un fragmento de tejido adiposo subcutáneo se colocará sobre la dura madre en lo posible la formación de la cicatriz de tejido fibroconectivo. El músculo y la piel se cerrarán en capas. Después de la cirugía se les inyectará 2 ml de solución salina isotónica intraperitoneal para prevenir la deshidratación. Se les dará enrofloxacin (1ml) VO en el agua para beber los primeros ocho días después de la cirugía como profiláctico. También se les administrará paracetamol (0.2ml) VO como analgésico. El alimento se les colocará sobre el piso de la caja add livitum. La vejiga será vaciada manualmente 2 veces por día hasta que sea necesario.

Veintidós días antes de la cirugía del trasplante, en la porción medial y posterior de los muslos de las ratas donadoras (machos Fisher 344) se prepararán asépticamente. Se les realizará una incisión longitudinal y disección por planos para identificar el nervio ciático, el cual será cortado transversalmente en la porción cefálica del muslo. El extremo

será fijado con un punto de nylon cinco ceros al musculo adyacente. El día de la cirugía del trasplante, los animales se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico 1ml intraperitoneal, y se reabrirá la zona operada para identificar el extremo proximal seccionado del nervio ciático disecando 2cm de longitud. El segmento se cortará y colocará en solución salina isotónica helada, en donde se mantendrá hasta el momento del trasplante.

La incisión dorsal previa de los animales lesionados se abrirá nuevamente y la cicatriz será removida cuidadosamente principalmente cerca de la dura madre. Después de identificar la incisión dural previa, esta será reabierto longitudinalmente. La ME lesionada será expuesta cuidadosamente para identificar la zona de la cicatriz con una longitud aproximada de 3 a 4 mm y será cortada 1 mm rostral y caudal a los bordes de la cicatriz. El sangrado será disminuido con un fragmento de Gelfoam impregnado de solución salina colocado en el espacio dejado por los muñones. Las ratas serán asignadas a los grupos en estudio el día de la cirugía para trasplante conformando los 4 grupos ya mencionados en el diseño experimental y asignados aleatoriamente.

A las ratas del grupo control positivo, además de trasplantarle el NPP se les realizarán 2 inyecciones con 5 µl cada una de medio conteniendo 3×10^4 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 experimental, además de ponerles NPP, se les realizarán 2 inyecciones de una solución en DMEM conteniendo 3×10^4 CEMO + Condointinasa ABC (2 unidades/ml Seikagaku 100332 de Cape Cod), tanto rostral como caudal de cada muñón. Para finalizar en todos los grupos se colocó Durafilm por fuera de la Dura Madre sobre la ME y los injertos.

18.3 EVALUACIÓN FUNCIONAL.

La locomoción del tren posterior se evaluó con la escala modificada para sección completa de la escala BBB; se evalúan 22 puntos divididos en 4 niveles, que evalúa la ritmicidad y la alternancia de los movimientos con presencia o ausencia del soporte de peso corporal y apoyo plantar (Antri et al. 2002) . Los animales fueron evaluados 24 horas después de la sección, a las 24 horas después del tratamiento y cada semana durante las siguientes 13 semanas. Los evaluadores desconocían el tratamiento asignado a cada animal.

18.4 REGISTRO CINEMATICO DE LA MARCHA.

El registro cinemático de la marcha se realizó una sola vez, a los tres meses después del tratamiento. Se colocarán marcas de tinta indeleble con plumón no tóxico (Sharpie®) sobre la piel tomando en cuenta: cresta iliaca, articulación cadera, rodilla, tobillo y tarso-metatarso de la pata posterior derecha de los animales. Posteriormente, cada uno de los animales se introducirá por separado, a una pasarela construida con paredes de acrílico transparente (60X5X5cm), en donde se video-grabará la marcha de los animales con una videocámara digital comercial, tomando cuando menos 4 zancadas consecutivas (posteriores a la primer zancada de los animales para excluir la fase de inicio de la marcha, “arranque”). Mediante un programa de computo comercial (Total Video Converter) se obtendrán fotografías digitales de cada uno de los cuadros de la grabación (30 cuadros / segundo). De cada una de las fotografías se determinaran las coordenadas cartesianas de las marcas colocadas en las articulaciones de los animales, utilizando para ello el programa ImageJ (NIH), la equivalencia de dichas coordenadas no es en centímetros sino en pixeles, por lo que se hace la conversión (de pixeles a centímetros) mediante un cuadro o marcas de referencia (5 cm) colocado en la pasarela.

Una vez obtenidos los valores de las coordenadas en centímetros, éstos se introducirán a un software, denominado “Ratitas caminado”, el cual fue diseñado, en el CINVESTAV- IPN. El

programa uno los puntos de las articulaciones, definidos por las coordenadas cartesianas, con una línea y exhibe en una sola exposición en el monitor de la computadora, a todas las líneas resultantes del movimiento que ejecuta la pata del animal durante la marcha, lo que permite visualizar la secuencia de movimientos del miembro del animal durante la deambulación.

18.5 ANALISIS DE LA INMUNOFLOURESCENCIA.

Trece semanas después del tratamiento, los animales se anestesiaron con 40mg/kg de pentobarbital sódico I.P, y fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% vía intra cardíaca. Se obtuvo un segmento de 2 cm de longitud de la ME, con el epicentro de la lesión / zona del tratamiento en el centro de la muestra. Los tejidos se colocaron en PBS con sacarosa al 30% durante 24hr, luego se hicieron cortes sagitales seriados, por congelación de 20µm de espesor en un criostato LEICA.

Para la inmunoreacción, los cortes se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios de Santa Cruz Biotech.: anti-myelin basic protein (MBP (D18), goat polyclonal IgG, Catalogue sc-13912 Santa Cruz Biotech.), anti-microtubule-associated protein 1B (MAP1-B (C-20), goat polyclonal IgG, Catalogue sc-8971 Santa Cruz Biotech.), anti-growth associated protein 43 (GAP-43 (H-100) rabbit polyclonal IgG, Catalogue sc-1779) , anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP (H-50) rabbit polyclonal IgG, Catalogue sc-65343) y anti NGFR p75 (mouse monoclonal IgG, Catalogo sc-71692) durante 48hr a 4°C. Posteriormente los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 Anti-conejo ó Anti-cabra, Molecular Probes In Vitro Gen) durante 2hr; se lavaron con PBS y se contrastaron con Hoesch (una dilución de 5µl/5ml de PBS; Molecular Probes) 3 min. Finalmente se cubrieron con Vectashield (Vector Lab). Se analizaron con un microscopio confocal invertido (Nikon Ti Eclipse equipado con un sistema de imagen

A1 con un software NIS Elements v.4.5.0). Los colorantes fueron excitados en un modo secuencial usando una línea de láseres: 403 nm Hoescht, 488 nm Alexa 488 In vitrogen Life; y 563 nm Alexa 546 In vitrogen life technologies. De cada espécimen se tomaron 6 fotografías del epicentro (zona del trasplante) y de la zona rostral y caudal a éste. Con el programa FIJI-Image J, se analizaron las imágenes mediante la cuantificación de la densidad de fluorescencia en píxeles, se cuantificó la intensidad de los píxeles del canal verde correspondiente a la Alexa 488. Se obtuvo un histograma a partir de los valores de intensidad contenidas en mapa de bits de la imagen, el cual se calibró previamente la intensidad y la escala espacial para establecer los valores de intensidad como la intensidad integrada de cada imagen. La densidad óptica se determinó en relación con el grupo de control y se expresa como píxeles/mm².

18.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Después del sacrificio y de la perfusión, a 4 animales de cada grupo se les realizará un estudio de Microscopía Electrónica para observar la mielinización de los axones y observar los cambios morfológicos en cada grupo. Las médula se post-fijaran con fijador de Karnovsky (glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en solución de Sorens) 4 hrs a 4 °C. Posteriormente se postfijarán en tetraóxido de osmio al 1% durante 45 minutos a temperatura ambiente. El exceso del tetraóxido de osmio se quitará mediante dos lavados con agua destilada de dos minutos cada uno. Se deshidrataran en alcoholes de concentración creciente (50%, 70%, 95% y 100%) hasta oxido de propileno. Después de la deshidratación, el tejido se incluirá en resina sintética de aradita a 60 o 70°C durante 24 horas. Ya realizados los bloques se realizaran 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 serán analizados con el

microscopio electrónico de transmisión LEO 906 E y se tomarán 6 fotografías de cada zona (zona de trasplante, zona proximal y distal) para ser analizadas.

18.7 ANÁLISIS DE LA REGENERACIÓN AXONAL MEDIANTE LA DETECCIÓN DE NEUROTRAZADORES.

Después de 3 meses, cuatro animales de cada grupo se les realizará dos inyecciones en cerebro y una inyección en médula espinal con neurotrazadores anterógrados y retrogrados (fluoro mini-rubi dextran, tetramethylrhodamina, Molecular Probes Invitrogen; y Fluoro esmerald dextran fluorescein, Molecular Probes Invitrogen). Se utilizarán ratas hembras adultas Fisher 344 (8-10 semanas de edad, 200-220 g). Bajo anestesia con ketamina 70 mg/kg y Xilazina (10 mg/kg). Para la primera cirugía en cerebro, los animales serán colocados en un aparato estereotáxico, sujetándolos por los conductos auditivos externos y la mandíbula del animal. Se les realizará una incisión longitudinal en el cráneo, y se descubrirán las suturas craneales. Se identificará primero Bregma y con el estereotáxico se medirá -1.2 (anteroposterior) para la identificación de la zona para realizar los trépanos correspondientes: se medirá para el lateral derecho (-2 mm) y se le realizará una marca con plumón; después se medirá, el lateral izquierdo (+2mm), realizando una marca con plumón. Ya marcadas las zonas se realizará un trepano en cada sitio, con una fresa quirúrgica de dentista. Posterior a ello, la aplicación del trazador se realizará mediante un micro-inyector (Kd Scientific 310-plus), conectado a una jeringa Hamilton de 20µl, a la que se le adapta una cánula de microdiálisis. La punta de la cánula se pondrá sobre la tabla externa del cráneo a nivel del trépano y se medirá la profundidad (2 mm en cada lado). Se inyectará 2µl del trazador fluoro esmerald (dextran fluorescein, Molecular Probes Invitrogen) a una velocidad de 0.5µl/minuto en cada lado

(el tiempo total de la inyección será de 15 minutos). Al terminar el animal se quitará del estereotáxico y se suturará la piel del cráneo.

Después a los mismos animales se les realizará una laminectomía en T12 para la inyección del trazador Fluoro mini-ruby (dextran, tetramethylrhodamina, Molecular Probes Invitrogen). Bajo microscopio se les realizará una incisión longitudinal sobre la línea media por debajo de la zona de trasplante (T9), se abrirá el músculo y se les realizará una laminectomía en T12. Al tener expuesta la medula, se hará un corte longitudinal de la dura madre para poder exponer la medula espinal. Después los animales serán puestos en el estereotáxico nuevamente, sujetándolos de la columna (sujetadores específicos para la maniobra), para mantenerlos suspendidos en el aire, y evitar que la respiración del animal afecte la inyección intra medular del trazador. La inyección se realizará también con un micro-inyector (Kd Scientific 310-plus), conectado a una jeringa Hamilton de 20 μ l, a la que se le adapta una cánula de microdiálisis. La cánula se acomodará sobre la superficie de la médula espinal, cercana a la arteria central del lado derecho. Se realizará una pequeña incisión en la medula y se cuantificará con el estereotáxico 1mm de profundidad; luego, se inyectará un volumen total de 1 μ l a una velocidad de 0.01 μ l/minuto (el tiempo total de la inyección será de 1hr 40 minutos). Al finalizar la inyección, el animal se quitará del estereotáxico y se suturará por planos.; a los animales se les administrará 0.03 ml de tramadol para el dolor durante 5 días. Los neurotrazadores se dejarán durante 2 semanas, y posteriormente, los animales serán perfundidos vía intra-cardiaca con paraformaldehído al 4%.

Al tejido se realizarán cortes longitudinales de 20 μ m por congelación; los cortes serán contrastados con Hoesh (una dilución de 5 μ l/5ml de PBS; Molecular Probes) durante 5 minutos y se montarán con Vectashield. El tejido será analizado mediante

microscopía Confocal (con un microscopio Nikon A-1) para la identificación de los neurotrazadores, que permitirá ver los axones marcados.

18.8 ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos obtenidos de la evaluación funcional así como de la cuantificación de densidad de fluorescencia e índice de mielinización se analizarán con un programa estadístico Graph Path 4. Para los datos de densidad de fluorescencia e índice de mielinización se utilizará una prueba estadística ANOVA no paramétrica, Kruskall Wallis para observar si existe diferencias significativas con el grupo control, además se realizará también una prueba no paramétrica U-MANN Whitney para observar si existe diferencias significativas entre los grupos, y para los datos de la evaluación de BBB se utilizara una prueba de ANOVA de medidas repetidas.

19. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Para la realización de este proyecto se tomara en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general en materia de investigación para la salud. (Título 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.

20. RESULTADOS.

20.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEMO.

Para verificar que las células trasplantadas fueran células estromales de médula ósea adultas e indiferenciadas, se realizó una fenotipificación mediante citometría de flujo utilizando los marcadores CD90, CD13, CD105 y CD34. De la población obtenida de células estromales de médula ósea obtuvimos el 66.5% de las células fueron positivas para el marcador CD90, el 37.4% fueron doble positivas tanto para el marcador CD13 como para CD105 y el 33% de nuestra población fue positivo para el marcador CD34 figura 21.

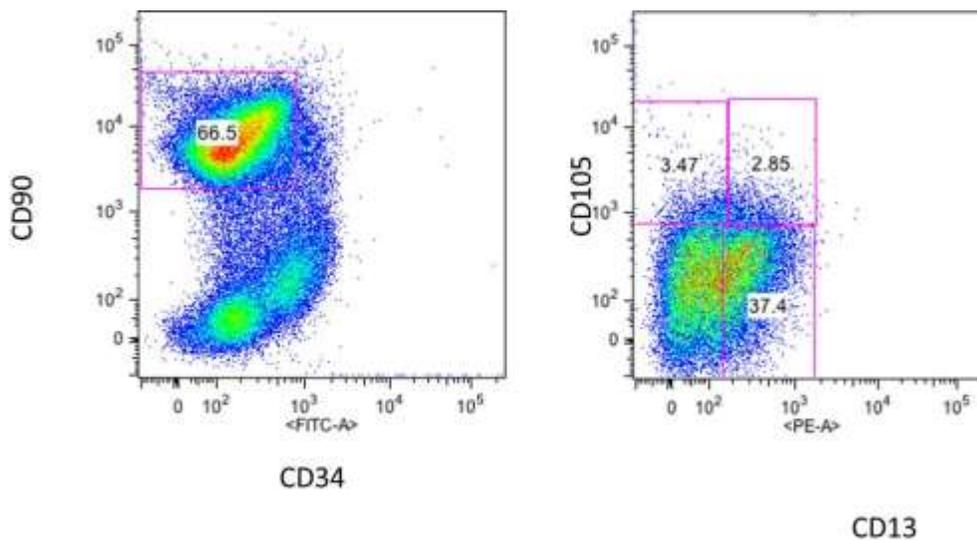


Figura 21. Caracterización de las CEMO con citometría de flujo. Se observa que el 66.5% las células fueron positivas para el marcador CD90, el 37% fueron doble positivas para CD105/CD13 y el 33% para CD34.

20.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

Después de tres meses de tratamiento, se usó la técnica histológica Tricrómica de Masón, para observar los cambios morfológicos de la médula espinal. Se puede observar que en los grupos con trasplante de NPP, NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC, el tejido de la médula se encontró preservado, además se observa un buen acoplamiento del tejido de nervio periférico con el tejido medular. También se observa en el tejido algunas fibras las cuales, se pueden ver en la zona de interface entre el NPP y la médula espinal figura 22.

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

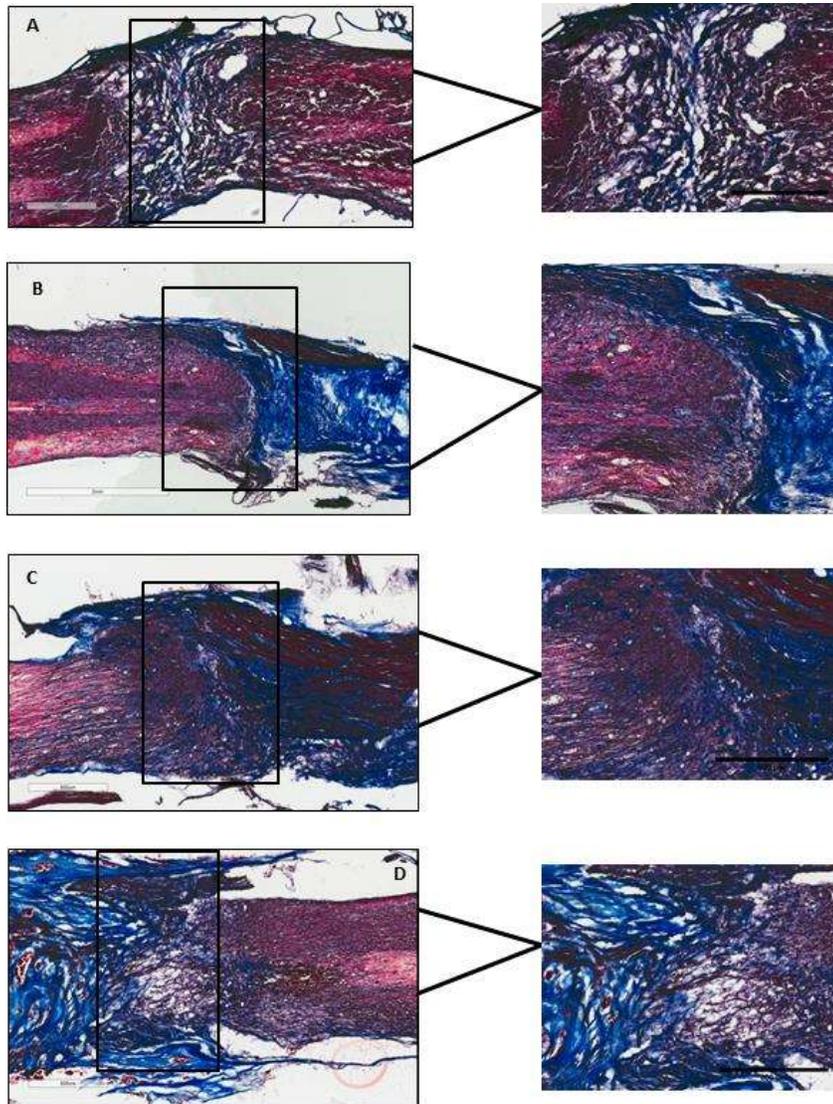


Figura 22. Microfotografía de la Médula Espinal de ratas por la técnica Tricrómica de Masón tres meses después de tratamiento. Panel A control, medula espinal en la zona de lesión. En el rectángulo señalado se hizo una ampliación del epicentro de la zona de lesión, se puede observar la zona dañada, con presencia de zonas quísticas. En panel B NPP, en la ampliación, se puede observar una buena aposición del tejido del NPP con la

médula espinal, además se observa algunas fibras provenientes del NPP cruzando la interface de la ME. Panel C NPP+CEMO y D NPP+CEMO+ChABC, podemos observar las zonas de trasplante en rectángulo (ampliaciones) se observa una buena interacción de la interface entre el tejido de la ME, con el tejido del NPP, de color azul observamos la presencia de colágena, además de que se observa en la zona del trasplante mayor cantidad de fibras cruzando a través hacia la zona de la ME. Barra de calibración panel A 700 μm , panel B- D 800 μm .

20.3 CRECIMIENTO AXONAL.

Para determinar el crecimiento axonal, se utilizaron dos marcadores GAP-43 y MAP-1B, los cuales son específicos para la elongación axonal. En la expresión de GAP-43, se observó que en los grupos con tratamientos simples CEMO y NPP hubo mayor cantidad de fibras inmunoreactivas, en comparación con el grupo control, donde las fibras fueron escasas y desorganizadas (Fig 23 B, G, L, C, H, M; Figura 24 A); los grupos con los tratamientos combinados NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC mostraron una mayor cantidad de fibras inmunoreactivas en la zona rostral, caudal y zona de trasplante, mejor organizadas y de mayor calibre comparadas con los grupos de tratamientos simples, (Fig 23 D, I, N, E, J, O; Figura 24 B, C). En cuanto a MAP-1B, se puede observar la misma tendencia en todos los grupos de tratamiento, que incluye mayor cantidad de las fibras inmunoreactivas positivas y mejor organizadas (Fig 25 D,I,N,E,J,O; Figura 26 A) a diferencia de los grupos con tratamientos simples y control (Fig 25 B,G,L,C,H,M; Figura 26 B, C).

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

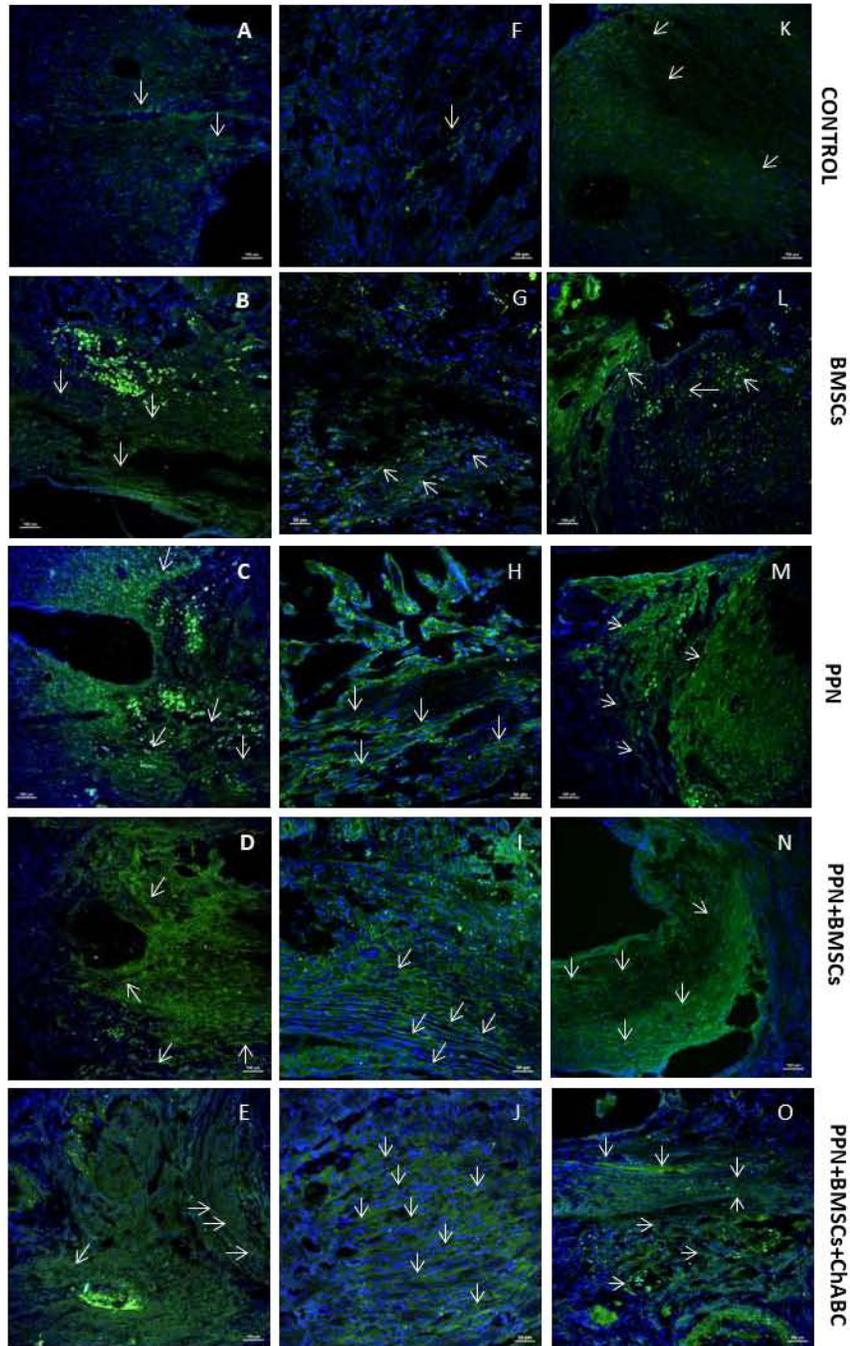


Figura 23. Expresión GAP-43 en médula espinal. En los paneles (A, B,C,D,E) fotomicrografía de la ME zona rostral, (F, G,H,I,J) zona del epicentro y paneles (K,L,M,N,O) zona caudal. En cada zona se observan las fibras inmunoreactivas de color verde (flechas) positivas para GAP-43. Se observa mayor cantidad y mejor homogenizadas de fibras positivas en todas las zonas, en los grupos de NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-E 100 μm ; F-J 50 μm ; K-O 100 μm .

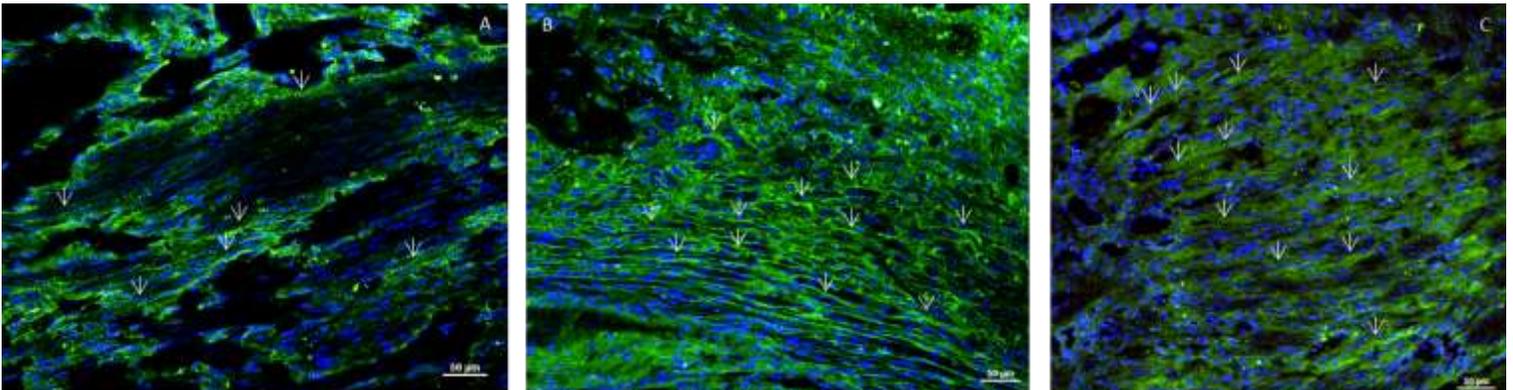


Figura 24. Expresión de GAP-43 en la zona de trasplante. Fotomicrografía aumentada de las zonas de trasplantes, Panel A (NPP), Panel B (NPP+CEMO) y Panel C (NPP+CEMO+ChABC). Se puede observar que el grupo con el trasplante de NPP la presencia de fibras inmunoreactivas para GAP-43, las cuales se ven en desorden, en menor cantidad y más finas (flechas), al comprarlas con los grupos (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC). Las fibras en los grupos combinados se ven en mayor cantidad, mejor organizadas y de mayor calibre. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-C 50 μm .

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

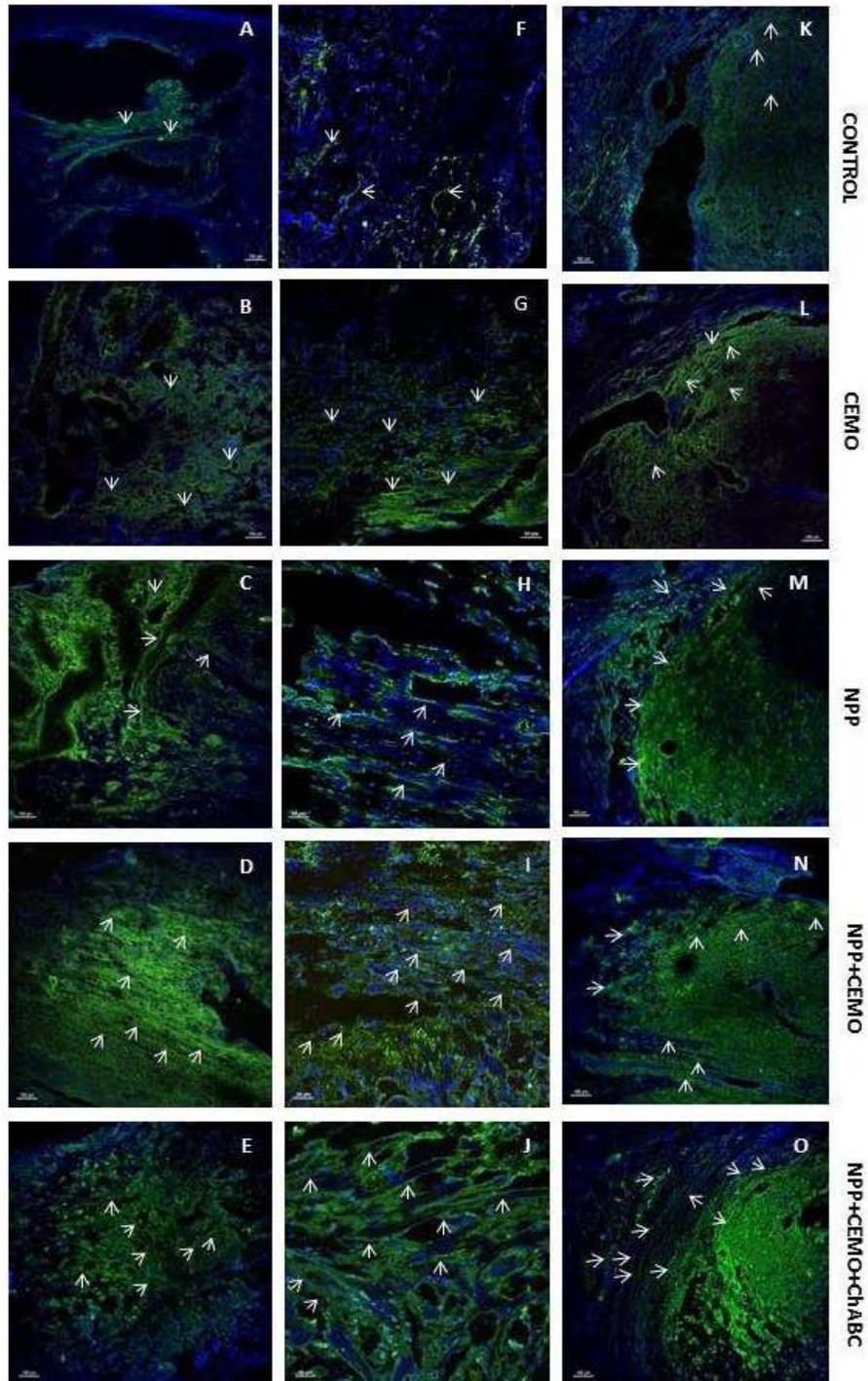


Figura 25. Expresión de MAP-1B en médula espinal. En los paneles (A, B,C,D,E) fotomicrografía de la ME zona rostral, (F, G,H,I,J) zona del epicentro y paneles (K,L,M,N,O) zona caudal. En cada zona se observan las fibras inmunoreactivas de color verde (flechas) positivas para MAP-1B. Se observa mayor cantidad y mejor homogenizadas de fibras positivas en todas las zonas en los grupos de NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-E 100 μ m; F-J 50 μ m; K-O 100 μ m.

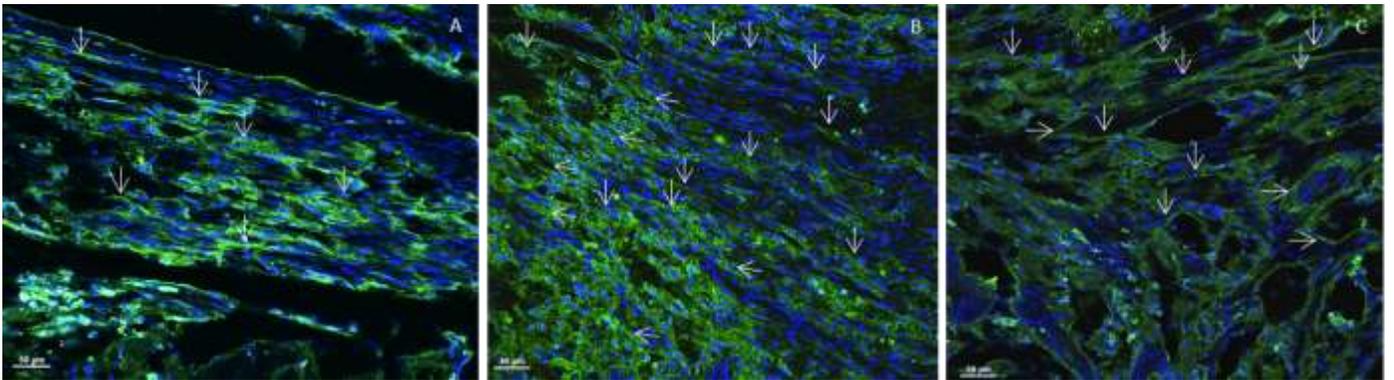


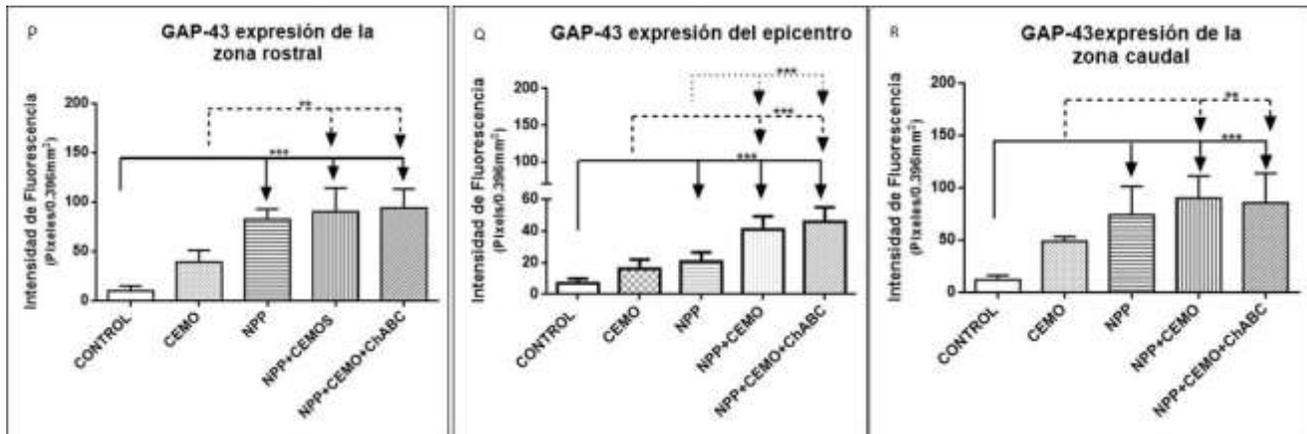
Figura 26. Expresión de MAP-1B en la zona de trasplante. Fotomicrografía aumentada de las zonas de trasplantes, Panel A (NPP), Panel B (NPP+CEMO) y Panel C (NPP+CEMO+ChABC). Se puede observar que el grupo con el trasplante de NPP la presencia de fibras inmunoreactivas para MAP-1B, las cuales se ven en desorden, en menor cantidad y más finas (flechas), al comprarlas con los grupos (NPP+CEMO y

NPP+CEMO+ChABC). Las fibras en los grupos combinados se ven en mayor cantidad, mejor organizadas y de mayor calibre. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-C 50 μm .

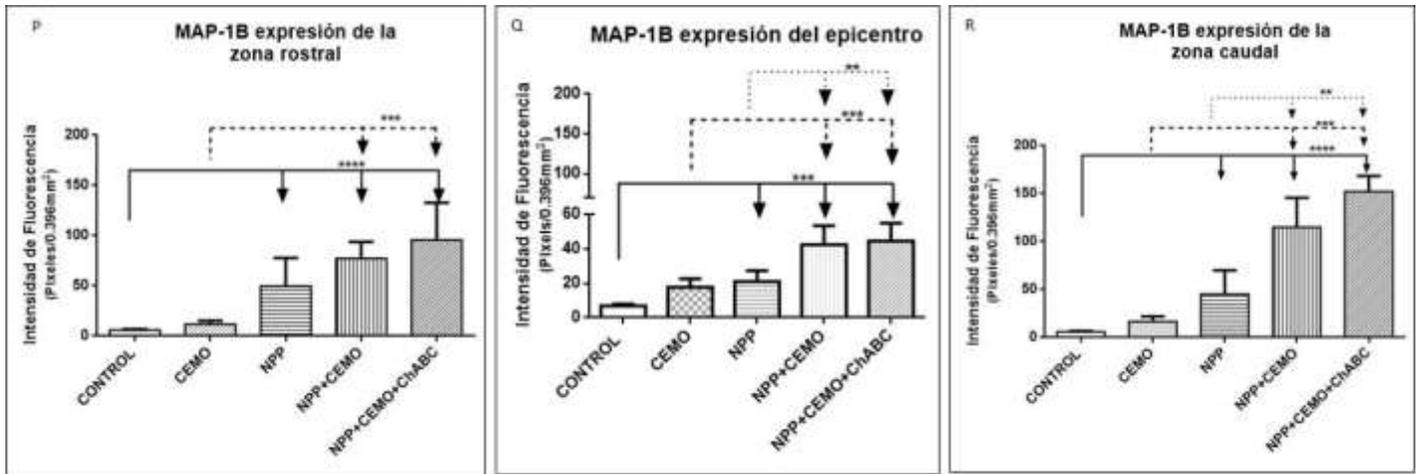
20.4 Cuantificación de la densidad de fluorescencia para GAP-43 y MAP-1B.

La densidad de fluorescencia para GAP-43 se muestra en la gráfica 2 (P, Q y R), en la zona rostral, zona del epicentro y zona caudal. Todos los grupos de tratamientos simples y combinados, tuvieron una diferencia significativa al compararlos con el grupo control ($p < 0.001$); sin embargo, al comparar los grupos de tratamiento, los combinados, tienen una expresión incrementada de GAP-43 en todas las zonas con una diferencia significativa contra los grupos de tratamientos simples ($p < 0.05$). En cuanto a la expresión de MAP-1B en la gráfica 3 (P, Q y R), los grupos con tratamientos simples y combinados también tuvieron mayor expresión en las tres zonas, con una diferencia significativa al compararlos con el grupo control ($p < 0.001$); igual que en el caso de GAP-43, hay una expresión significativamente aumentada de MPA-1B en los grupos de tratamiento combinados comparados con los simples ($p < 0.05$).

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.



Gráfica 2. Cuantificación de la Intensidad de la fluorescencia de GAP-43. En los paneles P, Q y R cuantificación de la expresión de GAP-43; los diferentes grupos de tratamiento, en las zona rostral, zona del epicentro y zona caudal presentan mayor expresión de GAP-43 con una $p < 0.0001$ a diferencia del control (Kruskal Wallis). Además en la comparación entre los grupos, en la zona rostral y caudal tuvieron una $P < 0.05$ de los grupos NNP, NNP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC contra el grupo de CEMO; en la zona del epicentro los grupos NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC tuvieron diferencia de $p < 0.05$ contra el grupo CEMO y NPP (U-Mann Withney).



Gráfica 3. Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de MAP-1B. En los paneles P, Q y R cuantificación de la expresión de MAP-1B; los diferentes grupos de tratamiento, en la zona rostral, zona del epicentro y zona caudal presentan mayor expresión de MAP-1B con una $p < 0.0001$ a diferencia del control (Kruscall Wallis). Además en la comparación entre los grupos, en las tres zonas, los grupos con NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC, tuvieron una diferencia significativa $p < 0.0001$ en comparación con los grupos con NPP y CEMO (U-Mann Withney).

20.5 Regeneración axonal.

El uso de neurotrazadores en los grupos que tenían el NPPP como puente, permitió ver fibras marcadas con rojo rubí (Fluoro mini-rubi dextran, tetramethylrhodamina) provenientes del área motora, y fibras provenientes del área lumbar marcadas de color verde esmeralda (Fluoro esmerald dextran fluorescein), tano en la zona rostral, en el NPP

y en la zona caudal. Además estas fibras inmunoreactivas positivas de ambos trazadores se ven incrementadas en los grupos con los tratamientos combinados (Fig 27). En los aumentos presentados en la figura 28 se observó que las fibras presentes en la zona de trasplante de los grupos combinados representan un aumento en la regeneración axonal.

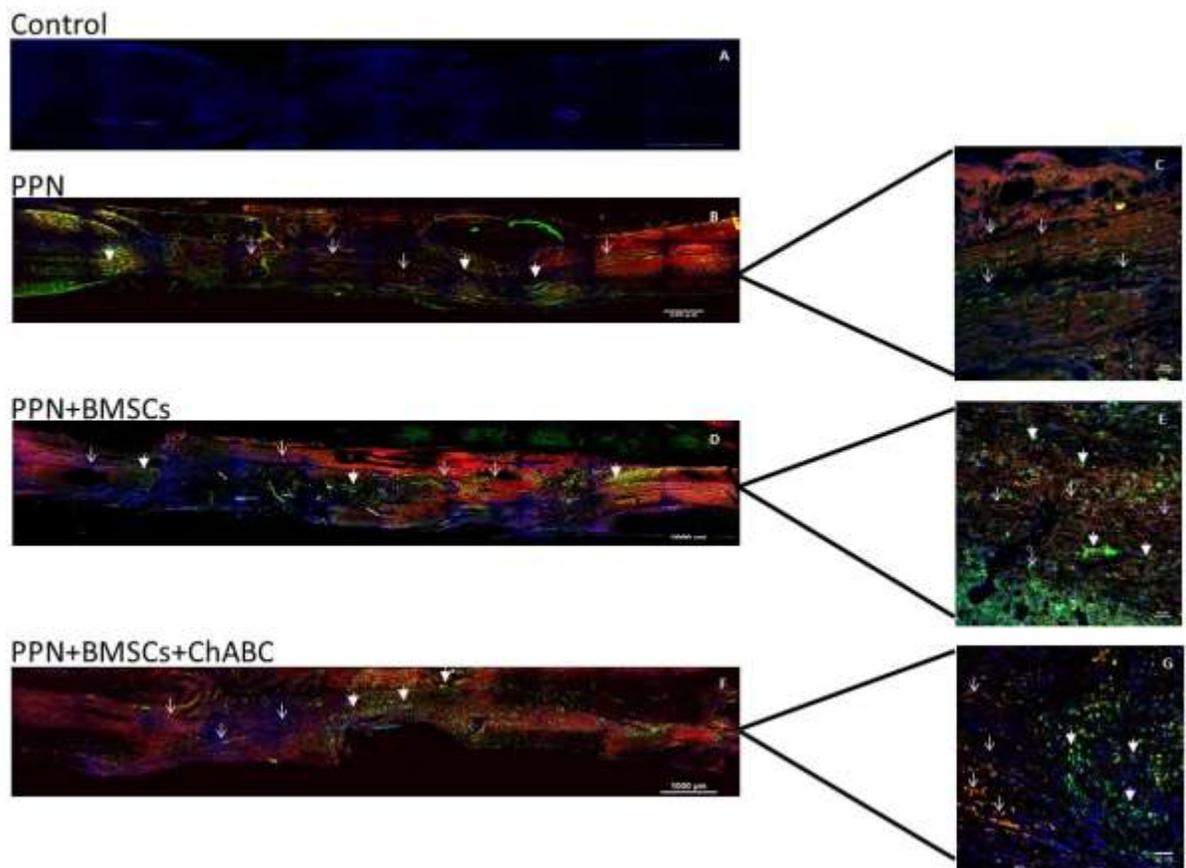


Figura 27. Regeneración axonal. En los paneles A, B, D y F; se observa las fibras inmunoreactivas positivas para los trazadores en color rojo (fluoro mini-rubi dextran,

tetramethylrhodamina, flechas) y verde (Fluoro esmerald dextran fluorescein, flechas) en las zonas rostral, zona de trasplante y caudal de la médula espinal. En los paneles C, E y G; podemos observar las fibras inmunoreactivas positivas para ambos trazadores en la zona de trasplante (flechas), además de la colocalización de algunas fibras marcadas para ambos trazadores (amarillo-flechas). Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A, B, D y F 1000 μm ; C, E y G 50 μm .

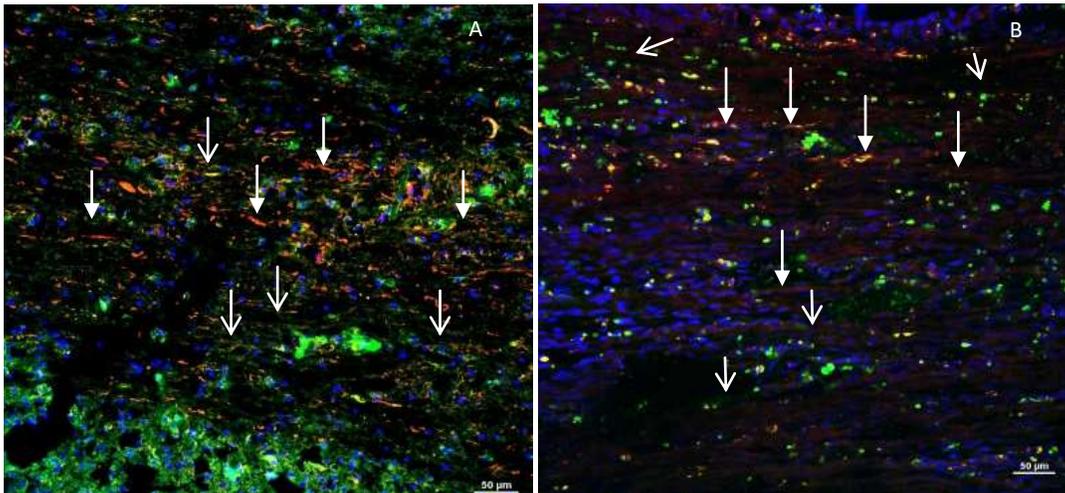


Figura28. Marcaje de fibras en la zona de trasplante con neurotrazadores. Panel A aumento de la fotomicrografía de la zona de trasplante (NPP+CEMO) donde se observan las fibras marcadas motoras de color rojo (flecha cabeza completa) y las fibras sensitivas de color verde (flechas cabeza abierta). Panel B, aumento de la fotomicrografía de la zona de trasplante (NPP+CEMO+ChABC) donde se observan las fibras marcadas motoras de color rojo (flecha cabeza completa) y las fibras sensitivas de color verde (flechas cabeza abierta). Podemos observar que en ambos grupos hay una gran cantidad de fibras inmunoreactivas positivas para el marcaje de neurotrazadores indicando la regeneración

axonal. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A, B, 50 μ m.

20.6 Efecto de diferenciación de CEMO a GFAP+, P75 y MAP-

1B.

En el grupo con tratamiento simple con CEMO y en los grupos combinados con CEMO, se observó la presencia de unas células inmunoreactivas positivas para GFAP+, p75 y MAP-1B (Fig 29 A-D). Estas células presentan una morfología de tipo glial (estrellada), y de gran tamaño, con prolongaciones largas (Fig 29 E, F) en las zonas de inyección de las CEMO (tanto rostral como caudal). A diferencia de los grupos Control y NPP que no hay presencia de estas células.

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

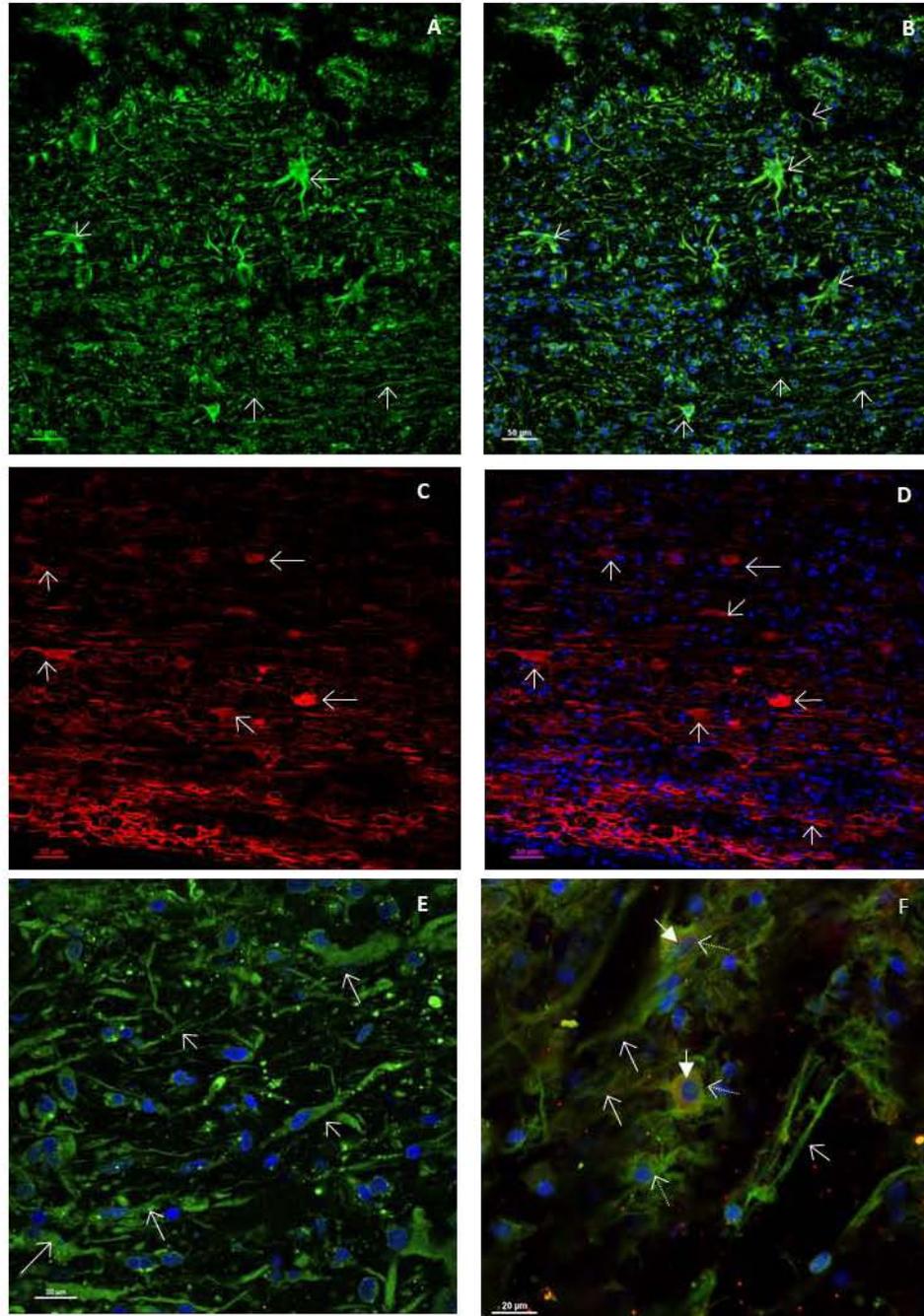


Figura 29. Expresión de GFAP, P75 Y MAP-1B en CEMO en médula espinal. Paneles A-B presencia de células inmunoreactivas positivas para MAP-1B de color verde. Paneles C-D células inmunoreactivas positivas para GFAP+ de color verde. Se observa las células con

una morfología estrellada. Panel E células inmunoreactivas de color verde para MAP-1B, donde se observa que las células tienen largas prolongaciones. Panel F células inmunoreactivas para p75 y MAP-1B. De color rojo se observa la célula con el marcaje para p75 (flechas punteadas), de color verde se observa la célula positiva para MAP-1B (flecha cerrada) y de color verde las prolongaciones positivas para MAP-1B (flecha abierta). Los núcleos se contrastaron de color azul con Hoesht. NIKKON A-1, escala de calibración A-D 50 μm ; E-F 20 μm .

20.7 Mielinización.

La detección de la proteína básica de la mielina (PBM) por inmunofluorescencia tanto en los grupos simples, como en los grupos con tratamiento combinado estuvo presente en la zona rostral, zona del NPP y zona caudal a diferencia del grupo control, se observó mayor cantidad de fibras inmunoreactivas en los grupos combinados (Fig 30), de igual manera se observó que los grupos con el tratamiento combinado (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC), las fibras encontradas fueron en mayor cantidad, grosor y mejor organizadas que las encontradas en los grupos con los tratamientos simples (Figura 31). Además, la cuantificación de la densidad de la fluorescencia de PBM, en la zona rostral, zona del NPP y zona caudal, mostró diferencias significativas al comparar los grupos con tratamiento simple y combinados contra el grupo control ($p < 0.0001$) (Gráfica 4 P, Q y R); también los grupos con tratamiento combinado, mostraron diferencias significativas contra los de tratamiento simple ($p < 0.005$) (Gráfica 4 P, Q y R).

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

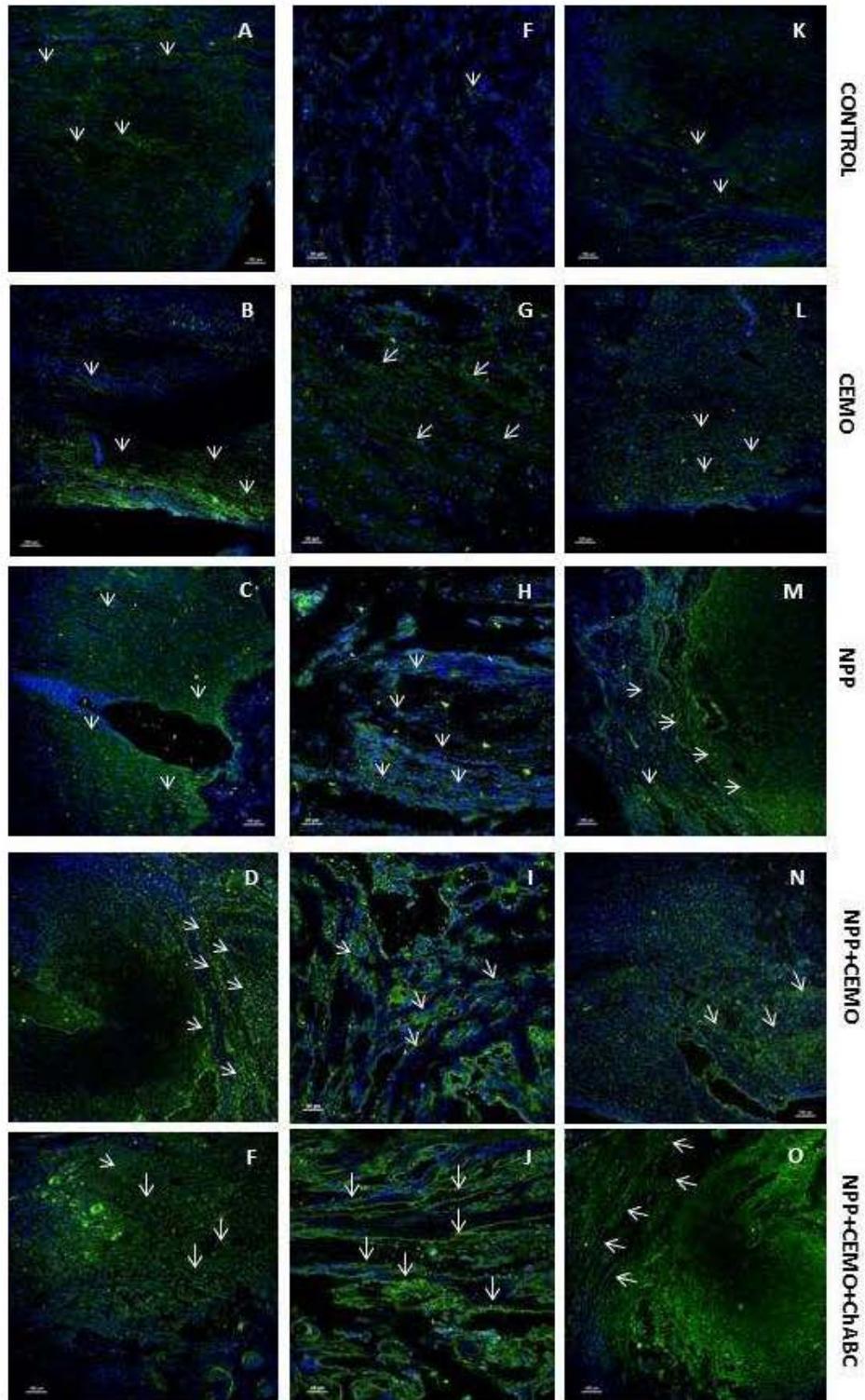


Figura 30. Expresión de PBM en médula espinal. En los paneles (A, B,C,D,E) fotomicrografía de la ME zona rostral, (F, G,H,I,J) zona del epicentro y paneles (K,L,M,N,O) zona caudal. En cada zona se observan las fibras inmunoreactivas de color verde (flechas) positivas para PBM. Se observa mayor cantidad de fibras y mejor homogenizadas positivas en todas las zonas en los grupos de NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-E 100 μm ; F-J 50 μm ; K-O 100 μm .

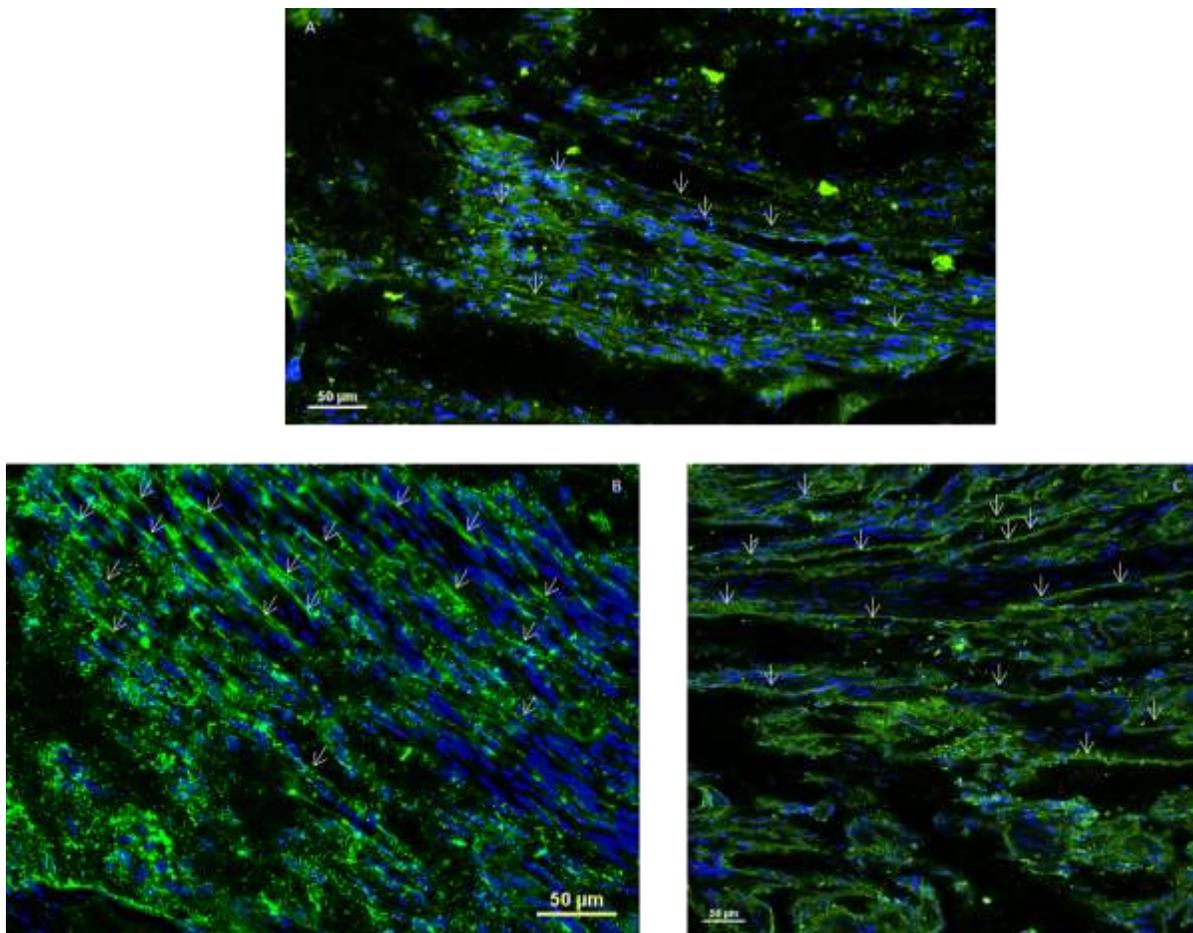
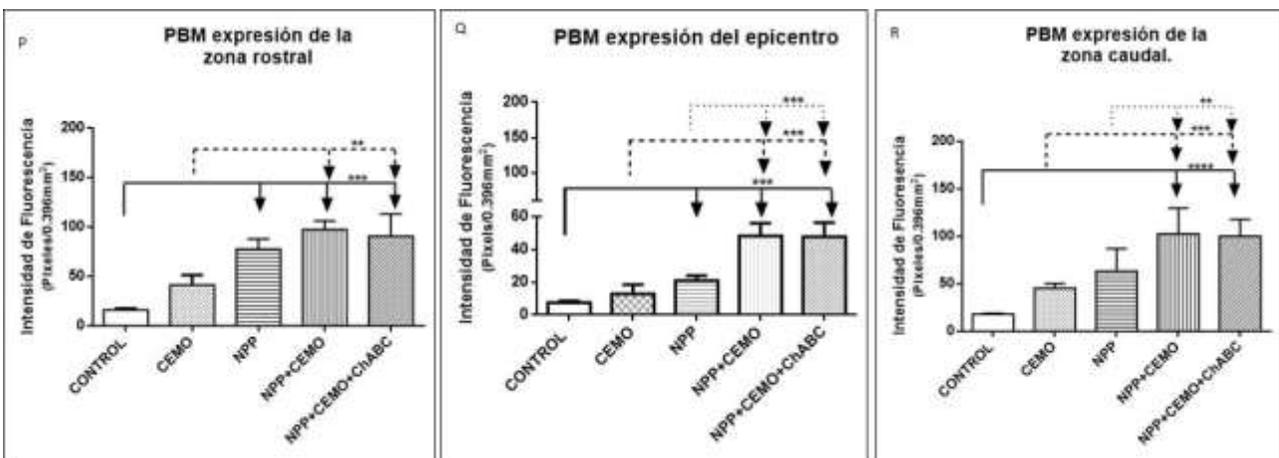


Figura 31. Expresión de PBM en la zona de trasplante. Fotomicrografía aumentada de las zonas de trasplantes, Panel A (NPP), Panel B (NPP+CEMO) y Panel C (NPP+CEMO+ChABC). Se puede observar que el grupo con el trasplante de NPP la presencia de fibras inmunoreactivas para PBM, las cuales se ven en desorden, en menor cantidad y más finas (flechas), al comprarlas con los grupos (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC). Las fibras en los grupos combinados se ven en mayor cantidad, mejor organizadas y de mayor calibre. Los núcleos se tiñeron con Hoesht azules; NIKKON A-1, escala de calibración A-C 50 μ m.



Gráfica 4. Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia de PBM. En los paneles P, Q y R cuantificación de la expresión de PBM; los diferentes grupos de tratamiento, en las zona rostral, zona del epicentro y zona caudal presentan mayor expresión de PBM con una $p < 0.0001$ a diferencia del control (Kruscall Wallis). Además en la comparación entre los grupos, en las tres zonas, los grupos con NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC, tuvieron una

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

diferencia significativa $p < 0.05$ en comparación con los grupos con NPP y CEMO (U-Mann Withney).

También se observó los cambios de la estructura de la mielina en los diferentes grupos evaluados con microscopía electrónica; se observó en el grupo control en la zona del epicentro, todos los axones dañados y desmielinizados por la lesión (figura 32 panel A), los grupos con los trasplantes simples se observan algunos axones mielinizados en la zona de trasplante, pero con una estructura no tan homogénea, (figura 32 paneles B y C), a diferencia de los grupos combinados donde se observa en la zona de trasplante que todos los axones se encuentran sin daño, mielinizados, además, de que la estructura de la mielina se encuentra mejor preservada y homogénea, también se observan axones de nueva formación (figura 32 panel D y E).

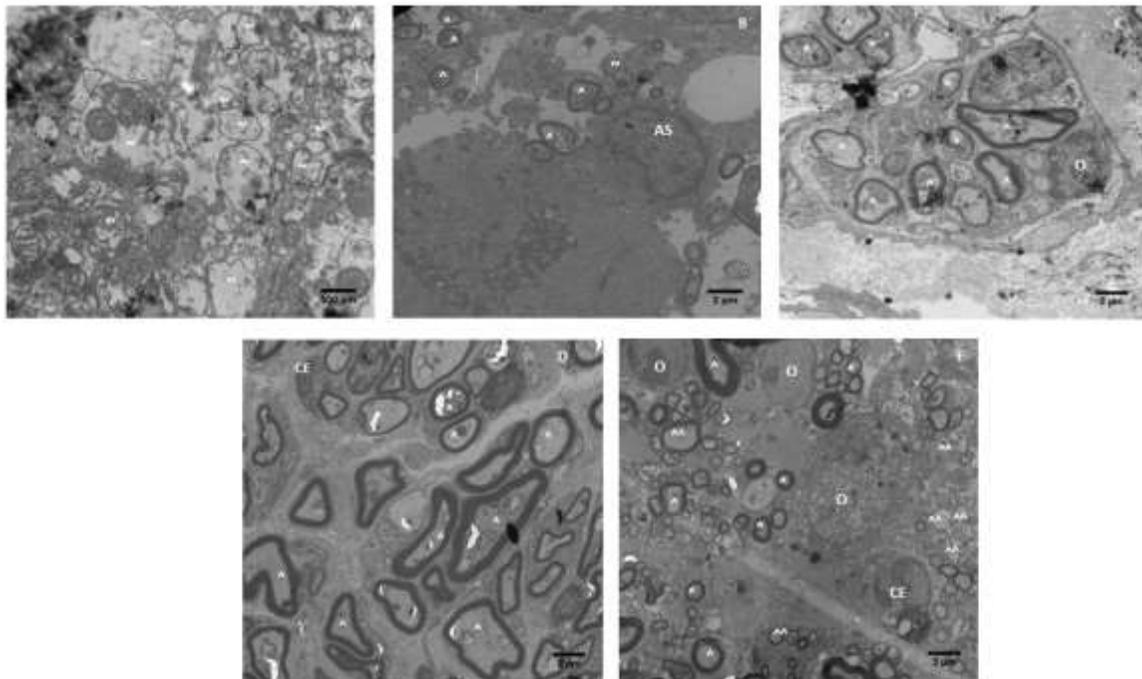
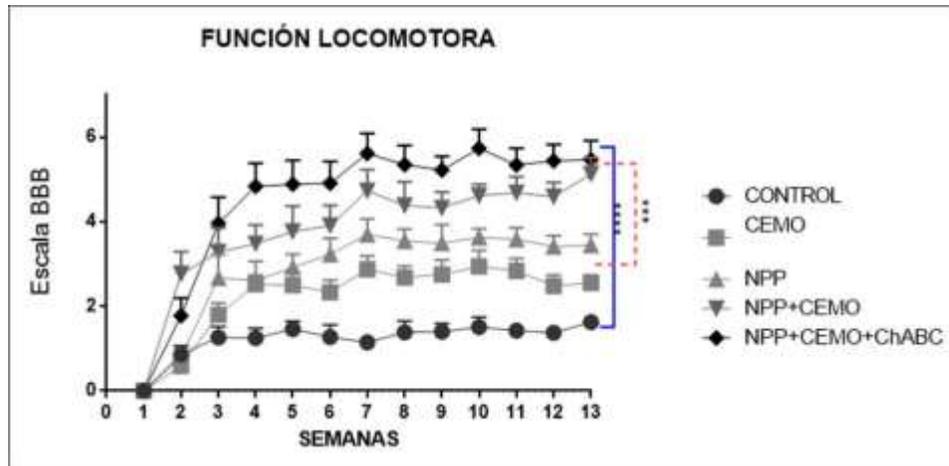


Figura 32. Electromicroscopía de la médula espinal en la zona del epicentro. Panel A control, observamos axones dañados y desmielinizados (~); Panel B CEMO, muñon distal, observamos algunos axones mielinizados (^), tambien se observa axones con daño (~) y astrocitos (AS); Panel C NPP en esta zona se observa un incremento de axones mielinizados (^), además de presencia de oligodendrocitos. Panel D NPP+CEMO y Panel E NPP+CEMO+ChABC, se observa mayor cantidad de axones mielinizados (^) a diferencia de los grupos con NPP y CEMO, además hay presencia de axones en proceso de remielinización (^ ^), en ambos grupos podemos observar células CEMO (CE) cercanas a axones, además de la presencia de oligodendrocitos (O). Barra de calibración panel A- 500nm; Paneles B-D 2µm.

20.8 Mejoría de la función locomotora.

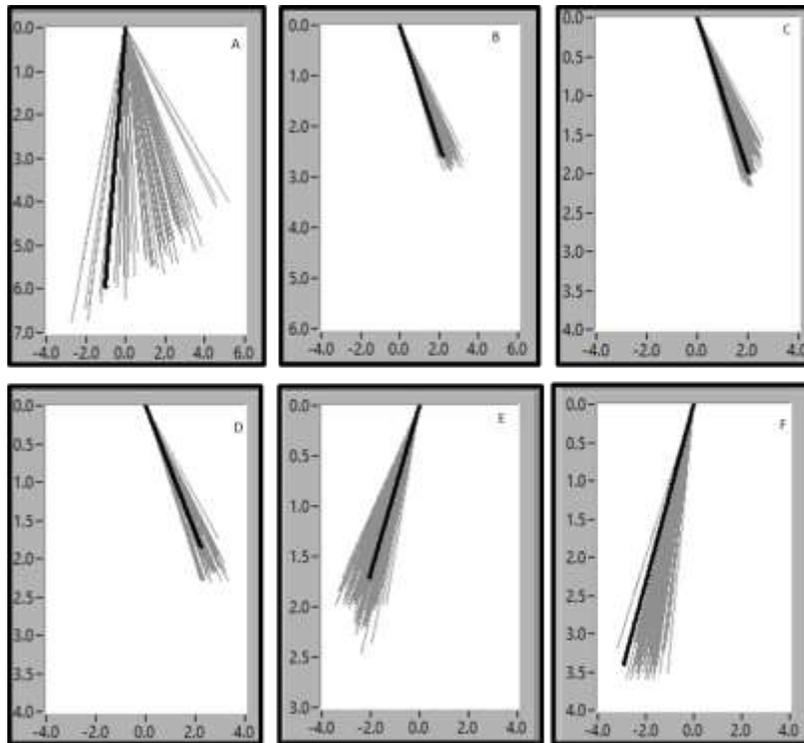
La evaluación de la función locomotora con la escala de la BBB modificada (Antri et al. 2002), mostró que a partir de la semana tres todos los grupos de tratamiento tuvieron una diferencia significativa al compararlos con el grupo control ($p < 0.0001$) (Gráfica5). A partir de la semana cinco; los grupos con los tratamientos combinados, mostraron diferencia significativa al compararlos con los grupos de tratamiento simple ($p < 0.0001$). Los grupos de tratamientos combinados, a partir de la octava semana, mostraron movimientos rítmicos frecuentes de ambas extremidades inferiores.



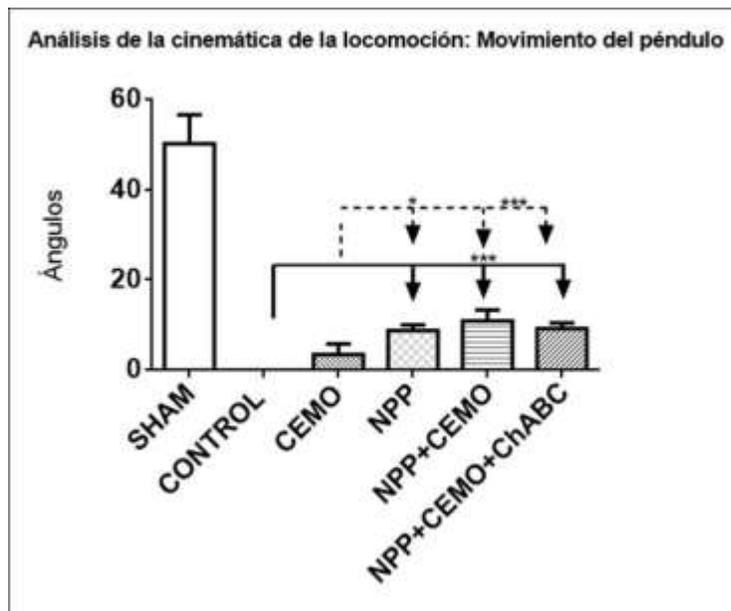
Gráfica 5. Recuperación de la función locomotora. En el panel A, se analizó con la BBB modificada para sección completa la función locomotora de los animales durante 13 semanas. Se observa que en la tercera semana hasta la treceava semana los diferentes grupos de tratamiento tuvieron una diferencia significativa $p < 0.0001$ en comparación con el control (Anova 2 vías medidas repetidas). En la quinta semana hasta la treceava semana, se observa un incremento en la mejoría de los grupos con tratamientos combinados con una $p < 0.001$ en comparación con los grupos con los tratamientos simples (Tukey).

Se realizó un análisis del registro cinemático de la marcha, donde se mostró un incremento en la amplitud del movimiento del péndulo de la zancada (Gráfica 6), se observó que la apertura del movimiento pendular de los grupos con el tratamiento combinado fue más amplia a diferencia de los grupos con tratamiento simple, al analizarlos los grupos con puente de NPP y tratamientos combinados tuvieron una diferencia significativa en comparación con el grupo control y CEMO ($p < 0.0001$) (Gráfica 7). Esta amplitud del movimiento se observó en movimientos de cadera y rodilla, mostrando ondas más marcadas y constantes (Gráfica 8 A y B).

EFFECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

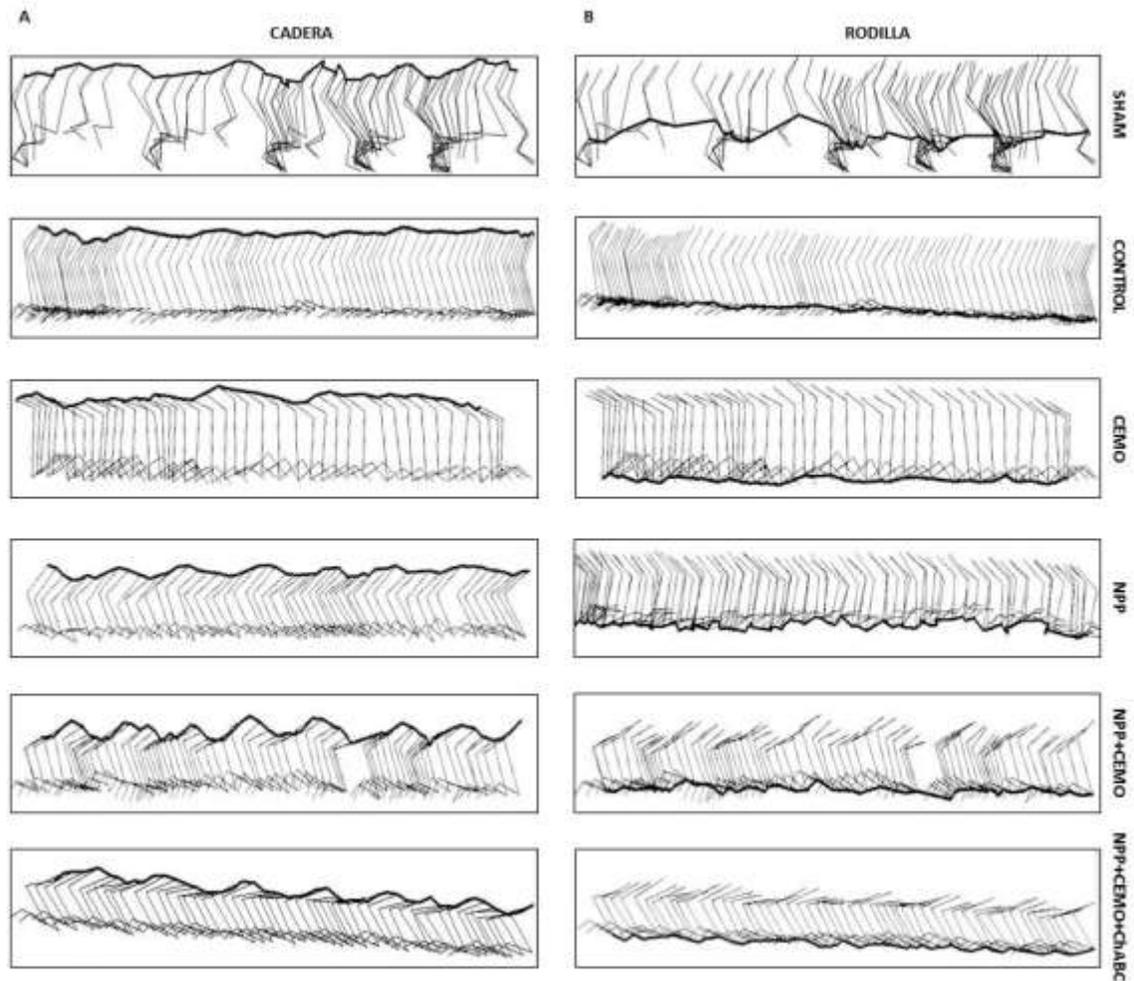


Gráfica 6. Apertura del movimiento pendular. En el panel A observamos el movimiento pendular de una ratita sin lesión. En el Panel B podemos observar como es el movimiento pendular del grupo control. En el Panel C se observa el movimiento pendular de grupo con CEMO. En el panel D podemos observar el movimiento pendular del grupo con NPP. En el panel E podemos observar el movimiento pendular del grupo con NPP+CEMO. En el Panel F podemos observar el movimiento pendular del grupo con NPP+CEMO+ChABC.



Gráfica 7. Movimiento del péndulo de la zancada. Registro cinemático del movimiento pendular, se observa una diferencia significativa $p < 0.0001$ en comparación con el control, se observa un incremento en los grupos de tratamiento de NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC en comparación a los grupos de NPP y CEMO. Únicamente tuvieron una diferencia $p < 0.05$ los grupos combinados en comparación con el grupo de CEMO.

EFEECTO DE LA CONDROINTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.



Gráfica 8. Registro de la Cinemática de la Marcha. Panel A cadera; Panel B rodilla. En la imagen del grupo Sham, se observa el movimiento de cadera y rodilla en forma de una onda. En el grupo control se observa que no hay ningún movimiento en cadera y rodilla demostrándolo con una línea recta. En el grupo de CEMO se observa la presencia de ondas no tan constantes; con el tratamiento de NPP observamos un incremento en la formación de las ondas en las dos articulaciones. La diferencia encontrada, en los grupos de NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC, hay un incremento de estas ondas, con mayor frecuencia y constantes en ambas articulaciones a diferencia de los demás grupos.

21 DISCUSIÓN.

Con el objetivo de promover regeneración neural después de LTME, las propuestas experimentales principales en la fase aguda son: trasplantes de células y tejidos (células troncales embrionarias, células mesenquimales, nervio periférico, etc.), sustancias exógenas (ChABC, Anti-NOGO 66), factores de crecimiento, biomateriales (Quitosa, polímeros) y fármacos (Fasudil, C3), entre otros, los cuales favorecen al crecimiento axonal y la mejoría de la función locomotora (Kabu et al. 2015; Smith George M 2009; McCall Julianne 2013). En la fase crónica pueden utilizarse las mismas estrategias, aunque existen pocos reportes al respecto (Tom and Houle 2015; Lu et al 2007; Wang et al 2011). A pesar de que los tratamientos simples dan resultados positivos tanto estructurales como funcionales, aparentemente son limitados; por lo que se ha propuesto el uso de estrategias combinadas para incrementar los efectos positivos ya señalados (Kabu et al. 2015; Tsintou et al 2015; Dalamagkas et al. 2018). En el presente estudio se demostró que usando tratamientos combinados, se incrementa el crecimiento y regeneración axonal, la remielinización, así como la recuperación de la función locomotora, en comparación con tratamientos únicos.

21.2 EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y REGENERACIÓN AXONAL.

Los resultados del presente trabajo, mostraron un incremento en la expresión de las proteínas GAP-43 y MAP-1B, las cuales, al ser activadas, actúan como guía para el crecimiento axonal (Mosevitsky 2005; Denny 2006; Storer 2003; Mohan and John 2015). Tom y cols 2013, en modelo de hemisección, y Buzoianu y cols 2015 en modelo de sección completa de médula espinal en fase crónica; así como Pierdona y cols 2012 y Côte y cols 2011^a, en sección completa en fase aguda, demostraron que el implante de NPP favorece

el crecimiento axonal, y los axones regenerados atraviesan la interfase de ambos sitios del trasplante (Pierdoná et al 2012; Tom et al. 2013; M. Côté et al. 2011; Buzoianu-Anguiano et al. 2015). El crecimiento axonal se debe al microambiente permisivo derivado de las células de Schwann y de los macrófagos presentes en el NPP, los cuales secretan factores de crecimiento como GDNF, BDNF, NGF, NT-3, NT-4, GM-CS (Höke et al. 2002; Bozkurt et al. 2009; Michalski, Bain, and Fahnstock 2008), además de formar bandas de Bügner, que dan soporte para el crecimiento axonal (Y. Zhang et al. 1995; Ribeiro-Resende et al. 2009; Y. Zhang et al. 1995; Tom and Houle 2015).

Se conoce que las CEMO son capaces de formar un nicho dentro del tejido hospedero, donde secretan factores de crecimiento como NT-3, BDNF, GDNF, NGF, moléculas para la guía axónica como la netrina-4 y el reticulón-4, los cuales promueven un ambiente permeable para el crecimiento axonal (Zeng et al. 2016; Maltman et al 2011; Shichinohe et al. 2008). Li y cols 2009, demostraron que las CEMO, promueven la formación de prolongaciones que actúan como estructuras de soporte, las cuales apoyan al crecimiento axonal (Q. ming Li et al. 2009). Okuda y cols 2016 y Stewart y cols 2017 en modelos de sección medular completa en fase aguda, describieron que el trasplante de CEMO promueve el crecimiento axonal (Okuda et al. 2016; Stewart et al. 2017); por otro lado, Lu y cols 2007 en un modelo de sección completa en fase crónica, también mostraron que trasplantar CEMO favorece al crecimiento axonal (Paul Lu, Jones, and Tuszynski 2007) lo que concuerda con lo mostrado en el presente trabajo, en el que se encontró que las CEMO pueden diferenciarse a células gliales tipo GFAP+, las cuales forman prolongaciones largas que tal vez podrían dar soporte y guía a los axones para su crecimiento.

En concordancia con nuestra observación de que la combinación de estrategias es más eficaz que los tratamientos únicos, en modelos de sección completa y hemisección en fase aguda Kuo y cols 2011; Côté y cols 2011 mostraron que al combinar el NPP+ FGFa,

NPP+ChABC, permitió un microambiente favorable, incrementando el crecimiento axonal, comparado con los tratamientos únicos (Kuo et al. 2011; M. Côté et al. 2011). Por otro lado, Tom y cols 2013, Buzoianu y cols 2015 en modelos de hemisección, y sección completa en fase crónica, también mostraron que la combinación del NPP+ChABC o NPP+BDNF y NPP+CEMO también promueven un ambiente favorable, que permite el incremento del crecimiento axonal comparado con los tratamientos únicos (Tom et al. 2013; Buzoianu-Anguiano et al. 2015). Además, Buzoianu y cols 2015 mostraron, que la combinación de NPP+CEMO favorecía mejor preservación del tejido hospedero, y mayor número de axones penetrando hacia la medula preservada (Buzoianu-Anguiano et al. 2015).

Por otra parte, Chen y cols 2011 y Luo y cols 2009 en sección completa en fase aguda, que el uso de la combinación de CEMO+quitosana y CEMO+G-CSF, respectivamente, permitió el incremento en el crecimiento axonal al compararlo con los tratamientos únicos (X. Chen et al. 2011; Luo et al. 2009). Como no hay trabajos en sección completa en fase crónica usando CEMO, vale la pena señalar que Lee y cols 2015 en un modelo de compresión medular en fase crónica, mostraron que la combinación de CEMO+ChABC incrementó el crecimiento axonal al compararlos con tratamientos únicos.

Además, García y cols 2011, mostraron en un modelo de sección completa en fase aguda que la combinar ChABC+NT-3 incrementó el crecimiento axonal a diferencia de los grupos con tratamientos únicos (García-Alías et al. 2011). Wang y cols 2011 mostró en sección completa en fase crónica, que la inyección de ChABC aunado a rehabilitación, inhiben la formación de los condroitin sulfatos, promoviendo también el aumento en el crecimiento axonal (Wang et al. 2011;).

La mayor parte de estudios donde se probaron tratamientos combinados han utilizado la suma de dos tratamientos. Para nuestro conocimiento, solo en el estudio de Paul y cols

2015 se combinaron tres (NPP+ChABC+FGFa) en un modelo de sección medular completa en fase aguda; en concordancia con nuestros resultados, ellos reportan mayor crecimiento axonal con el tratamiento combinado, en comparación con los tratamientos únicos (DePaul et al. 2015).

El mejor modelo para evaluar regeneración axonal después de LTME es la sección completa y el uso de neurotrazadores es un instrumento importante para demostrarla. En el presente trabajo la regeneración axonal se evaluó mediante el marcaje de vías descendentes y ascendentes con fluoro mini-rubí y fluoro esmeralda. Houle y cols 2006 en un modelo de hemisección en fase aguda y Tom y cols 2013, en un modelo por hemisección en fase crónica, mostraron que el uso del NPP como puente permitió visualizar los axones a travesando la zona de trasplante (Tom et al. 2013; Houle et al. 2006), lo que concuerda con lo mostrado en el presente trabajo al observar fibras ascendentes y descendentes atravesando la zona de trasplante. Además, los mismos autores usando la combinación de NPP+ChABC observaron mayor número de fibras atravesando la zona de trasplante, que también concuerda con lo que observamos en el presente trabajo. Por otro lado, Kohama y cols 2013 en un modelo de sección completa en fase aguda, también demostraron que el trasplante único de CEMO favorece la regeneración axonal (Misaki Aizawa-Kohama et al., 2013). Al realizar la combinación de CEMO con otras estrategias, el efecto se ve incrementado como lo mostrado por Lu y cols 2012 en sección completa fase aguda, en la que CEMO+BDNF favoreció mayor regeneración axonal (Paul Lu et al. 2012), lo que concuerda con lo observado en el presente trabajo, al utilizar NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC.

21.3 REMIELINIZACIÓN.

La desmielinización es una alteración estructural estrechamente relacionada con alteraciones funcionales presentes en la LTME, por lo que consideramos importante la evaluación de la remielinización en los estudios terapéuticos. Existe muy poca información sobre la remielinización en estudios que involucran sección medular completa en fase crónica (como el modelo usado aquí), por lo que contrastaremos nuestros resultados con los de estudios donde los tratamientos se aplicaron en fase aguda. Al igual que en el presente estudio, Côté y cols 2011, Tom y cols 2009, Hill y cols 2012 en modelos de hemisección en fase aguda; así como, Buzoianu y cols 2015 en un modelo de sección completa en fase crónica, mostraron que el NPP favoreció la mielinización en comparación con los controles, lo cual se atribuye a las células de Schwann (M.-P. Côté et al. 2011; Tom et al. 2009; Hill, Brodak, and Bartlett Bunge 2012; Buzoianu-Anguiano et al. 2015).

También en modelos de sección en fase aguda, se ha demostrado que el trasplante de las CEMO, favorece la mielinización; Akiyama y cols 2002, demostraron que las CEMO favorecen la mielinización, por su capacidad de diferenciación hacia células de tipo mielinizador; lo mismo fue propuesto Ding y cols 2014 y Qiu y cols 2015, quienes mostraron que las CEMO pueden diferenciarse hacia oligodendrocitos, favoreciendo a la mielinización (Ding P, Yang Z, Wang W, Wang J 2014; Qiu et al. 2015). En el presente trabajo, también se demostró que el trasplante único de CEMO, promovió la remielinización de los axones, aunque en menor cantidad que el NPP.

Al igual que en estudios previos, en este trabajo, los tratamientos combinados cursan con mejor remielinización en comparación con tratamientos únicos. Tal es el caso del estudio de Tom y cols 2010 en un modelo por hemisección en fase aguda, donde combinaron NPP+ChABC (Tom et al. 2010) y el de Buzoianu y col 2015 en un modelo de sección completa en fase crónica, donde combinaron NPP+CEMO (Buzoianu-anguiano et al. 2015).

Al considerar las CEMO, Chen y cols 2011, en un modelo de sección completa en fase aguda, demostraron que al hacer puentes de quitosana embebidas con CEMO, favorecen a la preservación y remielinización de los axones (X. Chen et al. 2011), lo que concuerda con nuestros resultados al utilizar NPP+CEMO. No hay estudios donde se hayan hecho tratamientos con combinación triple con los que podamos contrastar resultados con nuestra estrategia usando NPP+CEMO +ChABC, sin embargo, el incremento de la remielinización que observamos, fue similar al resultante de NPP+CEMO.

21.4 EFECTO SOBRE LA MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA.

Por último, al incrementarse la regeneración axonal y remielinización en los grupos combinados, es esperable obtener también el incremento de la recuperación funcional determinada mediante pruebas de evaluación locomotora. Debido a que la BBB estándar es la escala universalmente utilizada principalmente para lesiones parciales de la médula espinal, su evaluación está limitada para lesiones totales de la médula espinal, ya que no considera la probabilidad de recuperación de los movimientos endógenos por debajo de la lesión; en el presente trabajo se usó la BBB modificada, la cual es específica para modelos de sección completa, ya que toma en cuenta estas características para la refuncionalización (Basso, Beattie, and Bresnahan 1995; Antri et al. 2002). Además, el uso de otras formas de evaluación como la cinemática de la marcha, es siempre deseable (Rossignol and Frigon 2011).

En modelos de hemisección y sección en fase aguda, Lee y cols 2002, Houle y cols 2006 y Li y cols 2012, demostraron que el tratamiento con solo NPP favorece la recuperación de la función locomotora, con un promedio entre 4 y 5 puntos en la escala de la BBB estándar (Y.-S. Lee, Hsiao, and Lin 2002; Houle et al. 2006; C. Li et al. 2012). En modelos de sección

en fase crónica, Buzoianu y cols 2015, demostraron que el tratamiento único con NPP mejora la función locomotora en promedio 6 puntos en la escala de la BBB estándar (Buzoianu-Anguiano et al. 2015). En el presente trabajo, los animales con el tratamiento único de NPP, mejoraron en promedio 4 puntos en la BBB modificada, observando movimientos rítmicos y ocasionales.

Por otro lado, Kohama y cols 2013, Luo y cols 2009 y Chen y cols 2011 en modelos de sección completa en fase aguda, demostraron que el tratamiento único con CEMO, favoreció la recuperación funcional con un promedio de 5 puntos en la escala de la BBB estándar (Misaki Aizawa-Kohama, Toshiki Endo, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Akira Sumiyoshi, Dai Matsuse, Yasumasa Kuroda, Takahiro Morita, Jorge J. Riera, Ryuta Kawashima, Teiji Tominaga 2013; Luo et al. 2009; X. Chen et al. 2011). En comparación, aquí observamos que el tratamiento único con CEMO mejora en promedio 3 puntos en la BBB modificada, observándose movimientos ocasionales (equivalente a 5 en la BBB estándar).

En el presente estudio, al igual que en estudios previos, este efecto benéfico se incrementa aún más al usar tratamientos combinados. Lee y cols 2002, Houle y cols 2006 mostraron que en modelos de sección completa en fase aguda la combinación de NPP+FGFa, NPP+ChABC incrementó la mejoría de la función locomotora un promedio de 9 puntos en la BBB (Y.-S. Lee, Hsiao, and Lin 2002; Houle et al. 2006). Buzoianu y cols 2015 en un modelo de sección completa en fase crónica, mostraron que con la combinación de NPP+CEMO la mejoría en promedio es de 7 puntos (Buzoianu-Anguiano et al. 2015). Chen y cols 2011 y Luo y cols 2009 en modelos de sección completa en fase aguda, encontraron que la combinación de CEMO+quitosana y CEMO+G-CSF incrementó la mejoría en 8 puntos promedio (X. Chen et al. 2011; Luo et al. 2009).

Por otro lado, García y cols 2011, combinando ChABC+NT-3 en un modelo de sección completa en fase aguda, encontraron mejoría de 8 puntos en promedio (García-Alías et al. 2011). En concordancia, nuestras combinaciones NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC indujeron mejora promedio de 6 en escala de la BBB modificada (movimientos rítmicos y frecuentes, principalmente en cadera y rodilla), equivalentes a 9 puntos en la BBB estándar usada en el resto de estudios.

Además, en el presente estudio se realizó una prueba más exacta para evaluar la locomoción: la cinemática de la marcha, la cual analiza la amplitud del ángulo de la cadera, rodilla o tobillo; la velocidad, tiempo y longitud de la zancada; y la amplitud del movimiento pendular de la zancada. Debido a que existen pocos estudios con este tipo de evaluación motora, todos en fase aguda y solo uno con sección completa, se discutirá brevemente los resultados con otros modelos experimentales. Calderón-Vallejo y cols 2015 demostraron en un modelo por compresión medular, que el tratamiento con gonadotropina favoreció la amplitud de la zancada, produciendo un 43% de recuperación (Calderón-Vallejo et al. 2015). Ollivier-Lanvin y cols 2015, utilizando sección medular completa, mostraron que el implante de BDNF, NT-3 y entrenamiento previo en una caminadora, favoreció la amplitud de la zancada en un 49% (Ollivier-Lanvin et al. 2015). En contraste, en el presente trabajo encontramos que los grupos con tratamiento único lograron un 10% de recuperación en la amplitud de la zancada y 30% en los tratamientos combinados (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC), observando movimientos frecuentes y constantes principalmente en la cadera y rodilla, comparándolos con los animales sin lesión.

Esta recuperación funcional después de una LTME, de acuerdo a Tuszynski y cols 2010, se explica por: 1) regeneración a larga distancia, la cual puede generar una conexión sináptica apropiada, mediante la ramificación de nuevos axones, que a su vez realizan

EFEECTO DE LA CONDRONTINASA ABC, TRASPLANTE DE CÉLULAS ESTROMALES DE MEDULA ÓSEA Y NERVI PERIFÉRICO PREDEGENERADO SOBRE EL CRECIMIENTO AXONAL, REMIELINIZACIÓN Y MEJORÍA DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA EN RATAS ADULTAS CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE MÉDULA ESPINAL.

nuevas conexiones con axones dañados; 2) regeneración a corta distancia, donde se generan colaterales, las cuales puedan formar contactos sinápticos con células vecinas, las que a su vez se puedan conectar con células diana de axones dañados y 3) crecimiento de axones preservados, los cuales mantienen una conexión con sus células diana del sitio de lesión (Giger, Hollis, and Tuszynski 2010). Con lo descrito por Tuszynsky, se cree que el NPP funge como un puente que promueva una regeneración axonal de larga distancia, donde los axones llegan a la zona de la interfase y las CEMO activan moléculas de guía axónica, las cuales ayudaron a que estos axones crezcan dentro de la médula espinal, conectando con axones preservados, generando conexiones funcionales, favoreciendo así a la mejoría de la función locomotora.

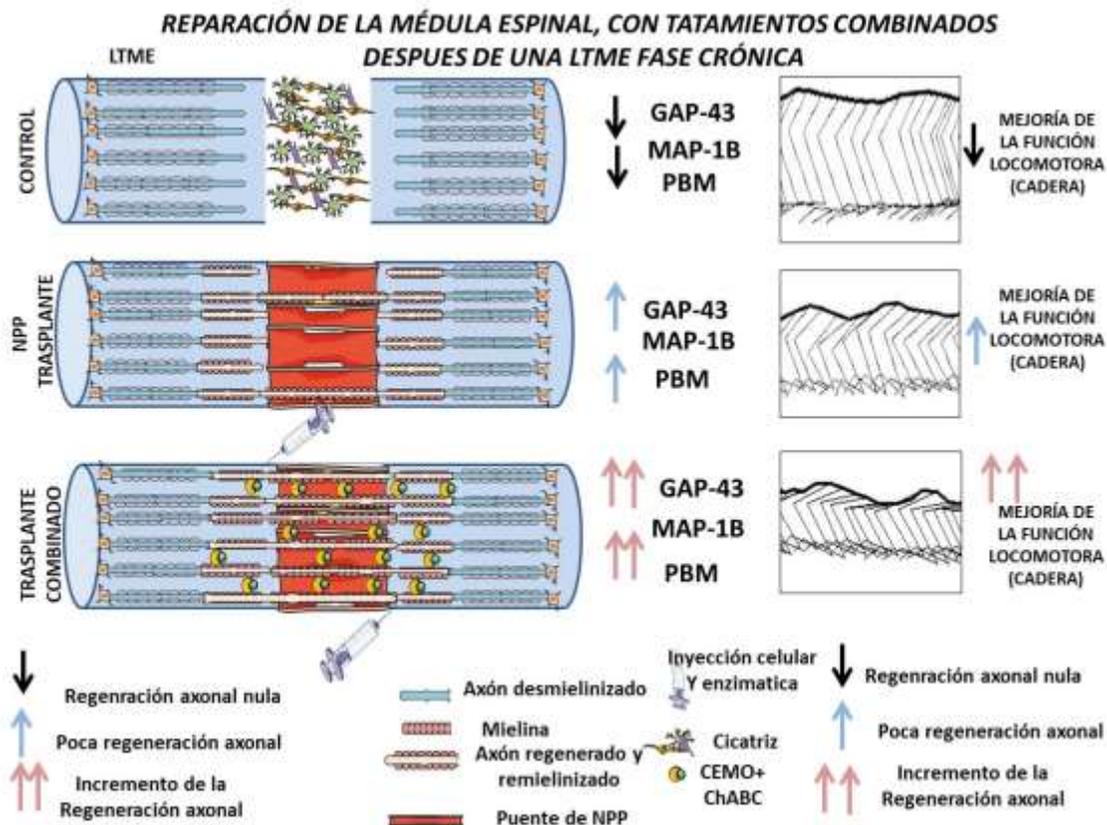


Figura 33. Esquema de la regeneración axonal y mejoría de la función locomotora con tratamientos simples y combinados. Panel A médula seccionada, donde se observa la formación de la cicatriz fibroglial, la cual impide el crecimiento axonal, provocando una falla en la locomoción. Panel B médula espinal trasplantada con tratamiento simple (NPP), se observa que existe poca regeneración axonal, remielinización y favoreciendo poca mejoría de la función locomotora, presentando pocos movimiento de cadera. Panel C. médula espinal con tratamiento combinado (NPP+CEMO+ChABC), donde observamos que hay un incremento en la regeneración axonal y remielinización, promoviendo un incremento en la función locomotora, presentando movimientos constantes de cadera.

22 CONCLUSIÓN.

En conclusión, en el presente trabajo se demostró que los tratamientos únicos (NPP y CEMO) favorecieron al crecimiento axonal, regeneración axonal, remielinización y mejoría discreta de la función locomotora. Con la combinación de tratamientos (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC) se logra mayor incremento del crecimiento y regeneración axonal, remielinización y consecuentemente mayor recuperación locomotora, por lo cual estos últimos se sugieren como terapia alternativa en estudios pre-clínicos.

23 REFERENCIAS.

1. 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*, 272–81.
2. 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): 177–84.
3. Antri, M, D Orsal, J Barthe, Â Pierre, and Marie Curie. 2002. "Locomotor Recovery in the Chronic Spinal Rat : Effects of Long-Term Treatment with a 5-HT 2 Agonist." *European Journal of Neuroscience* 16 (November 1986): 467–76. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x.
4. Artigiani, S, P M Comoglio, and L Tamagnone. 1999. "Plexins, Semaphorins, and Scatter Factor Receptors: A Common Root for Cell Guidance Signals?" *IUBMB Life* 48 (5): 477–82. doi:10.1080/713803563.
5. 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): 540–49. doi:10.1093/brain/awh406.
6. Bashaw, Greg J, and Rüdiger Klein. 2010. "Signaling from Axon Guidance Receptors." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a001941. doi:10.1101/cshperspect.a001941.
7. Basso, D M, M S Beattie, and J C Bresnahan. 1995. "A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats." *Journal Of Neurotrauma* 12 (1): 1–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783230>.

8. Battistini, Chiara, and Luca Tamagnone. 2016. "Transmembrane Semaphorins, Forward and Reverse Signaling: Have a Look Both Ways." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (8). Springer International Publishing: 1609–22. doi:10.1007/s00018-016-2137-x.
9. Bellucci, Carlos Henrique Suzuki, Jose Everton De Castro Filho, Cristiano Mendes Gomes, Jos?? De Bessa, Linamara Rizzo Battistella, Daniel Rubio De Souza, M??rcia Scazufca, Homero Bruschini, Miguel Srougi, and Tarcisio E P Barros Filho. 2015. "Contemporary Trends in the Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Changes in Age and Etiology." *Neuroepidemiology* 44 (2): 85–90. doi:10.1159/000371519.
10. Blesch, Armin, Hong Yang, Norbert Weidner, An Hoang, and Deborah Otero. 2004. "Axonal Responses to Cellularly Delivered NT-4/5 after Spinal Cord Injury." *Molecular and Cellular Neurosciences* 27 (2): 190–201. doi:10.1016/j.mcn.2004.06.007.
11. 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): 1239–41. doi:10.1096/fj.05-4382fje.
12. Bouquet, Celine, and Fatiha Nothias. 2007. "Molecular Mechanisms OfAxonal Growth." *Growth (Lakeland)*, 1–16.
13. Bowers, Christian A, Bornali Kundu, Jeffrey Rosenbluth, and Gregory W J Hawryluk. 2016. "Patients with Spinal Cord Injuries Favor Administration of Methylprednisolone." *Plos One* 11 (1): e0145991. doi:10.1371/journal.pone.0145991.
14. Bozkurt, Ahmet, Ronald Deumens, Christina Beckmann, Leon Olde Damink, Frank Schügner, Ingo Heschel, Bernd Sellhaus, et al. 2009. "In Vitro Cell Alignment Obtained with a Schwann Cell Enriched Microstructured Nerve Guide with Longitudinal Guidance

- Channels." *Biomaterials* 30 (2): 169–79. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.017.
15. Brot, Sébastien, Véronique Rogemond, Valérie Perrot, Naura Chounlamountri, Carole Auger, Jérôme Honnorat, and Mahnaz Moradi-Améli. 2010. "CRMP5 Interacts with Tubulin to Inhibit Neurite Outgrowth, Thereby Modulating the Function of CRMP2." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (32): 10639–54. doi:10.1523/JNEUROSCI.0059-10.2010.
16. Buzoianu-Anguiano, V., S. Orozco-Suárez, E. García-Vences, S. Caballero-Chacón, G. Guizar-Sahagún, L. Chavez-Sanchez, and I. Grijalva. 2015. "The Morphofunctional Effect of the Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Predegenerated Peripheral Nerve in Chronic Paraplegic Rat Model via Spinal Cord Transection." *Neural Plasticity* 2015. doi:10.1155/2015/389520.
17. Buzoianu-anguiano, Vinnitsa, Sandra Orozco-suárez, Elisa García-vences, Sara Caballero-chacón, Gabriel Guizar-sahagún, Luis Chavez-sanchez, and Israel Grijalva. 2015. "The Morphofunctional Effect of the Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Predegenerated Peripheral Nerve in Chronic Paraplegic Rat Model via Spinal Cord Transection." *Neural Plasticity* 2015: 12. doi:10.1155/2015/389520.
18. Calderón-Vallejo, Denisse, Andrés Quintanar-Stephano, Irma Hernández-Jasso, Violeta Jiménez-Hernández, Jannet Ruiz-Ornelas, Ismael Jiménez, and J. Luis Quintanar. 2015. "Functional and Structural Recovery of the Injured Spinal Cord in Rats Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone." *Neurochemical Research* 40 (3): 455–62. doi:10.1007/s11064-014-1486-9.
19. Cardenas, D D, J Ditunno, V Graziani, a B Jackson, D Lammertse, P Potter, M Sipski, R Cohen, and a R Blight. 2007. "Phase 2 Trial of Sustained-Release Fampridine in Chronic Spinal Cord Injury." *Spinal Cord : The Official Journal of the International Medical Society of Paraplegia* 45: 158–68. doi:10.1038/sj.sc.3101947.

20. Casha, Steven, David Zygun, M. Dan McGowan, Ish Bains, V. Wee Yong, and R. John Hurlbert. 2012. "Results of a Phase II Placebo-Controlled Randomized Trial of Minocycline in Acute Spinal Cord Injury." *Brain* 135 (4): 1224–36. doi:10.1093/brain/aws072.
21. Chacón, Sara Caballero, and Manuel Nieto-sampedro. 2005. "Pathophysiology of Spinal Cord Injury . A Review." *Medicina Veterinaria* 36 (1): 75–86.
22. Chauvin, Stéphanie, and André Sobel. 2015. "Neuronal Stathmins: A Family of Phosphoproteins Cooperating for Neuronal Development, Plasticity and Regeneration." *Progress in Neurobiology* 126: 1–18. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.09.002.
23. 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): 249–58. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00948.x.
24. 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* 22 (11): 2347–56. doi:10.1007/s10856-011-4401-9.
25. 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.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19404159.
26. CHIU, S.Y. 1988. "CHANGES IN EXCITABLE MEMBRANE PROPERTIES IN SCHWANN CELLS OF

- ADULT RABBIT SCIATIC NERVES FOLLOWING NERVE TRANSECTION." *Journal Of Physiology* 396: 173–88.
27. 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): 3001–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307513>.
28. Chung, Hyo Jin, Wook-Hun Chung, Jae-Hoon Lee, Dai-Jung Chung, Wo-Jong Yang, A-Jin Lee, Chi-Bong Choi, et al. 2015. "Expression of Neurotrophic Factors in Injured Spinal Cord after Transplantation of Human-Umbilical Cord Blood Stem Cells in Rats." *Journal of Veterinary Science* 17 (1): 97–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26435538>.
29. Côté, Marie-Pascale, Arthi a Amin, Veronica J Tom, and John D Houle. 2011. "Peripheral Nerve Grafts Support Regeneration after Spinal Cord Injury." *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8 (2): 294–303. doi:10.1007/s13311-011-0024-6.
30. Côté, Marie-pascale, D Ph, Amgad Hanna, Michel A Lemay, Karen Ollivier-, Lauren Santi, Kassi Miller, Rebecca Monaghan, and John D Houlé. 2011. "Peripheral Nerve Grafts after Cervical Spinal Cord Injury in Adult Cats." *Experimental Neurology* 225 (1): 173–82. doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.011.Peripheral.
31. 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): 9334–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717367>.
32. Dalamagkas, Kyriakos, Magdalini Tsintou, Amelia Seifalian, and Alexander M Seifalian. 2018. "Translational Regenerative Therapies for Chronic Spinal Cord Injury." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): 1–17. doi:10.3390/ijms19061776.

33. de Castro, Fernando. 2003. "Chemotropic Molecules: Guides for Axonal Pathfinding and Cell Migration during CNS Development." *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 18 (8): 130–36. doi:10.1152/nips.01414.2002.
34. Denny, John B. 2006. "Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43." *Current Neuropharmacology* 4 (4): 293–304. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2475799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Dent, Erik W., Fangjun Tang, and Katherine Kalil. 2003. "Axon Guidance by Growth Cones and Branches: Common Cytoskeletal and Signaling Mechanisms." *The Neuroscientist* 9 (5): 343–53. doi:10.1177/1073858403252683.
36. DePaul, Marc A., Ching Yi Lin, Jerry Silver, and Yu Shang Lee. 2015. "Peripheral Nerve Transplantation Combined with Acidic Fibroblast Growth Factor and Chondroitinase Induces Regeneration and Improves Urinary Function in Complete Spinal Cord Transected Adult Mice." *PLoS ONE* 10 (10): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0139335.
37. Ding P, Yang Z, Wang W, Wang J, Xue L. 2014. "Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells Enhances Infiltration and Survival of CNP and Schwann Cells to Promote Axonal Sprouting Following Complete Transection of Spinal Cord in Adult Rats." *Am J Transl Res.* 6 (3): 227–35.
38. 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). Informa Scandinavian: 315–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>.
39. Dyck, Scott M., and Soheila Karimi-Abdolrezaee. 2015. "Chondroitin Sulfate Proteoglycans:

- Key Modulators in the Developing and Pathologic Central Nervous System.” *Experimental Neurology* 269 (2014). Elsevier B.V.: 169–87. doi:10.1016/j.expneurol.2015.04.006.
40. Evaniew, N, E P Belley-Cote, N Fallah, V Noonan, C S Rivers, and M F Dvorak. 2015. “Methylprednisolone for the Treatment of Patients with Acute Spinal Cord Injuries: A Systematic Review and Meta-Analysis 1.” *J Neurotrauma* 481 (1557–9042 (Electronic)): 468–81. doi:10.1089/neu.2015.4192.
41. Evans, Gregory R D. 2001. “Peripheral Nerve Injury : A Review and Approach to Tissue Engineered Constructs.” *The Anatomical Record* 404 (January): 396–404. doi:10.1002/ar.1120.
42. Fang, Xie, and Zheng Binhai. 2008. “White Matter Inhibitors in CNS Axon Regeneration Failure Fang.” *October* 141 (4): 520–29. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
43. Fehlings, M G, H Nakashima, N Nagoshi, D S L Chow, R G Grossman, and B Kopjar. 2015. “Rationale, Design and Critical End Points for the Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study (RISCIS): A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Parallel Multi-Center Trial.” *Spinal Cord*, no. April. Nature Publishing Group: 1–8. doi:10.1038/sc.2015.95.
44. Fehlings, M G, J R Wilson, and N Cho. 2014. “Methylprednisolone for the Treatment of Acute Spinal Cord Injury: Counterpoint.” *Neurosurgery* 61 (Suppl 1): 36–42. doi:10.1227/NEU.0000000000000412.
45. Feng, Shi-qing, Xiao-hong Kong, Yang Liu, De-xiang Ban, Guang-zhi Ning, Jia-tong Chen, Shi-fu Guo, and Pei Wang. 2009. “Regeneration of Spinal Cord with Cell and Gene Therapy.” *Orthopaedic Surgery* 1 (2): 153–63. doi:10.1111/j.1757-7861.2009.00018.x.
46. Feng, Shi-Qing, Xin-Fu Zhou, Robert a Rush, and Ian a Ferguson. 2008. “Graft of Pre-Injured Sural Nerve Promotes Regeneration of Corticospinal Tract and Functional Recovery in Rats with Chronic Spinal Cord Injury.” *Brain Research* 1209 (May): 40–48. doi:10.1016/j.brainres.2008.02.075.

47. Filbin, Marie T. 2003. "Myelin-Associated Inhibitors of Axonal Regeneration in the Adult Mammalian CNS." *Nature Reviews. Neuroscience* 4 (9): 703–13. doi:10.1038/nrn1195.
48. Fujita, Yuki, and Toshihide Yamashita. 2014. "Axon Growth Inhibition by RhoA/ROCK in the Central Nervous System." *Frontiers in Neuroscience* 8 (OCT): 1–12. doi:10.3389/fnins.2014.00338.
49. Furlan, Julio C, Brodie M Sakakibara, William C Miller, and Andrei V Krassioukov. 2013. "Global Incidence and Prevalence of Traumatic Spinal Cord Injury." *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 40 (4): 456–64. doi:10.1017/S0317167100014530.
50. 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): 17788–99. doi:10.1523/JNEUROSCI.4308-11.2011.
51. Giger, Roman J, Edmund R Hollis, and Mark H Tuszynski. 2010. "Guidance Molecules in Axon Regeneration." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (7): a001867. doi:10.1101/cshperspect.a001867.
52. 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.
53. 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): 205–17.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845866>.

54. 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): 502–22. doi:10.1006/exnr.1997.6693.
55. 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): 61–70. doi:10.3233/RNN-1994-7201.
56. Günther, Manuel Ingo, Norbert Weidner, Rainer Müller, and Armin Blesch. 2015. "Cell-Seeded Alginate Hydrogel Scaffolds Promote Directed Linear Axonal Regeneration in the Injured Rat Spinal Cord." *Acta Biomaterialia* 27: 140–50. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.001.
57. Harris, David T. 2008. "Cord Blood Stem Cells: A Review of Potential Neurological Applications." *Stem Cell Reviews* 4 (4): 269–74. doi:10.1007/s12015-008-9039-8.
58. Harvey, Alan R, Sarah J Lovett, Bernadette T Majda, Jun H Yoon, Lachlan P G Wheeler, and Stuart I Hodgetts. 2015. "Neurotrophic Factors for Spinal Cord Repair: Which, Where, How and When to Apply, and for What Period of Time?" *Brain Research* 1619. Elsevier: 36–71. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.049.
59. Hatami, Maryam, Nargess Zare Mehrjardi, Sahar Kiani, Katayoun Hemmesi, Hossein Azizi, Abdolhossein Shahverdi, and Hossein Baharvand. 2009. "Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Transplants in Collagen Scaffolds Promote Recovery in Injured Rat Spinal Cord." *Cytotherapy* 11 (5). Elsevier: 618–30. doi:10.1080/14653240903005802.
60. 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): 2222–38. doi:10.1089/scd.2011.0596.

61. Hill, Caitlin E, Danika M Brodak, and Mary Bartlett Bunge. 2012. "Dissociated Predegenerated Peripheral Nerve Transplants for Spinal Cord Injury Repair: A Comprehensive Assessment of Their Effects on Regeneration and Functional Recovery Compared to Schwann Cell Transplants." *Journal of Neurotrauma* 29 (12): 2226–43. doi:10.1089/neu.2012.2377.
62. Hofstetter, C P, E J Schwarz, D Hess, J Widenfalk, A El Manira, Darwin J Prockop, and L Olson. 2002. "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). The National Academy of Sciences: 2199–2204. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
63. Höke, A., T. Gordon, D. W. Zochodne, and O. A.R. Sulaiman. 2002. "A Decline in Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor Expression Is Associated with Impaired Regeneration after Long-Term Schwann Cell Denervation." *Experimental Neurology* 173 (1): 77–85. doi:10.1006/exnr.2001.7826.
64. 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): 7405–15. doi:10.1523/JNEUROSCI.1166-06.2006.
65. Huang, Eric J AND, and Louis F Reichardt. 2001. "Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function*." *Annu Rev Neurosci.* 24: 677–736. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
66. Huot, Jacques. 2004. "Ephrin Signaling in Axon Guidance." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 28 (5): 813–18.

doi:10.1016/j.pnpbp.2004.05.025.

67. Jain, Nitin B., Gregory D. Ayers, Emily N. Peterson, Mitchel B. Harris, Leslie Morse, Kevin C O'Connor, and Eric Garshick. 2015. "Traumatic Spinal Cord Injury in the United States, 1993-2012." *Jama* 313 (22): 2236–43. doi:10.1001/jama.2015.6250.
68. 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): 5710–20. doi:10.1523/JNEUROSCI.4459-10.2011.Chondroitinase.
69. Johnson, Philip J., Alexander Tataru, Alicia Shiu, and Shelly E. Sakiyama-Elbert. 2010. "Controlled Release of Neurotrophin-3 and Platelet-Derived Growth Factor from Fibrin Scaffolds Containing Neural Progenitor Cells Enhances Survival and Differentiation into Neurons in a Subacute Model of SCI." *Cell Transplantation* 19 (1): 89–101. doi:10.3727/096368909X477273.
70. Jorgensen, Christian. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Immunosuppressive Properties: Is It Specific to Bone Marrow-Derived Cells?" *Stem Cell Research & Therapy* 1 (2): 15. doi:10.1186/scrt15.
71. Kabu, Shushi, Yue Gao, Brian K. Kwon, and Vinod Labhasetwar. 2015. "Drug Delivery, Cell-Based Therapies, and Tissue Engineering Approaches for Spinal Cord Injury." *Journal of Controlled Release* 219. Elsevier B.V.: 141–54. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.060.
72. Karimi-Abdolrezaee, Soheila, Eftekhar Eftekharpour, Jian Wang, Cindi M Morshead, and Michael G Fehlings. 2006. "Delayed Transplantation of Adult Neural Precursor Cells Promotes Remyelination and Functional Neurological Recovery after Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (13): 3377–89. doi:10.1523/JNEUROSCI.4184-05.2006.
73. Karimi-Abdolrezaee, Soheila, Desiree Schut, Jian Wang, and Michael G Fehlings. 2012.

- “Chondroitinase and Growth Factors Enhance Activation and Oligodendrocyte Differentiation of Endogenous Neural Precursor Cells after Spinal Cord Injury.” *PloS One* 7 (5): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0037589.
74. Kerr, Candace L, Brian S Letzen, Christine M Hill, Gracee Agrawal, Nitish V Thakor, Jared L Sternecker, John D Gearhart, and Angelo H All. 2010. “Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Oligodendrocyte Progenitors for Application in a Rat Contusion Model of Spinal Cord Injury.” *The International Journal of Neuroscience* 120 (4): 305–13. doi:10.3109/00207450903585290.
75. Kevenaar, Josta T, and Casper C Hoogenraad. 2015. “The Axonal Cytoskeleton: From Organization to Function.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (August): 44. doi:10.3389/fnmol.2015.00044.
76. King, V. R., J. B. Phillips, H. Hunt-Grubbe, R. Brown, and J. V. Priestley. 2006. “Characterization of Non-Neuronal Elements within Fibronectin Mats Implanted into the Damaged Adult Rat Spinal Cord.” *Biomaterials* 27 (3): 485–96. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.033.
77. Koda, Masao, Seiji Okada, Toshinori Nakayama, Shuhei Koshizuka, Takahito Kamada, Yutaka Nishio, Yukio Someya, et al. 2005. “Hematopoietic Stem Cell and Marrow Stromal Cell for Spinal Cord Injury in Mice.” *Neuroreport* 16 (16): 1763–67. doi:10.1097/01.wnr.0000183329.05994.d7.
78. KOSHIZUKA, SHUHEI, AKIHIKO OKAWA SEIJI OKADA, , AKIHIKO OKAWA, , MASAO KODA, , MITSUHIRO MURASAWA, , MASAYUKI HASHIMOTO, SHUHEI KOSHIZUKA, , SEIJI OKADA, KODA MASAO, MASAYUKI HASHIMOTO MITSUHIRO MURASAWA, TAKAHITO KAMADA, and AND MASASHI YAMAZAKI KATSUNORI YOSHINAGA, , MASAZUMI MURAKAMI, , HIDESHIGE MORIYA,. 2004. “Transplanted Hematopoietic Stem Cells from Bone Marrow Differentiate into Neural Lineage Cells and Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice.” *Of Neuropathology &* 63 (1): 64–72.

http://journals.lww.com/jneuropath/Abstract/2004/01000/Transplanted_Hematopoietic_Stem_Cells_from_Bone.7.aspx%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748562.

79. Kovalchuk, Yury, Knut Holthoff, and Arthur Konnerth. 2004. "Neurotrophin Action on a Rapid Timescale." *Current Opinion in Neurobiology* 14 (5): 558–63. doi:10.1016/j.conb.2004.08.014.
80. Kubo, Takekazu, Katsuhiko Hata, Atsushi Yamaguchi, and Toshihide Yamashita. 2007. "Rho-ROCK Inhibitors as Emerging Strategies to Promote Nerve Regeneration." *Current Pharmaceutical Design* 13 (24): 2493–99. doi:10.2174/138161207781368657.
81. Kubo, Takekazu, and Toshihide Yamashita. 2007. "Rho-ROCK Inhibitors for the Treatment of CNS Injury." *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2 (3): 173–79. doi:10.2174/157488907782411738.
82. Kuo, H.-S., M.-J. Tsai, M.-C. Huang, C.-W. Chiu, C.-Y. Tsai, M.-J. Lee, W.-C. Huang, Y.-L. Lin, W.-C. Kuo, and H. Cheng. 2011. "Acid Fibroblast Growth Factor and Peripheral Nerve Grafts Regulate Th2 Cytokine Expression, Macrophage Activation, Polyamine Synthesis, and Neurotrophin Expression in Transected Rat Spinal Cords." *Journal of Neuroscience* 31 (11): 4137–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.2592-10.2011.
83. Lee, Yu-Shang, Ian Hsiao, and Vernon W Lin. 2002. "Peripheral Nerve Grafts and AFGF Restore Partial Hindlimb Function in Adult Paraplegic Rats." *Journal of Neurotrauma* 19 (10): 1203–16. doi:10.1089/08977150260338001.
84. Leterrier, Christophe, and B??n??dicte Dargent. 2014. "No Pasaran! Role of the Axon Initial Segment in the Regulation of Protein Transport and the Maintenance of Axonal Identity." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 27. Elsevier Ltd: 44–51. doi:10.1016/j.semcd.2013.11.001.
85. Li, Changyu, Xiangtong Zhang, Ronglong Cao, Bohai Yu, Hongsheng Liang, Min Zhou, Dayong Li, Yuehua Wang, and Enzhong Liu. 2012. "Allografts of the Acellular Sciatic Nerve

- and Brain-Derived Neurotrophic Factor Repair Spinal Cord Injury in Adult Rats.” *PloS One* 7 (8): e42813. doi:10.1371/journal.pone.0042813.
86. Li, Qiu ming, Yi ming Fu, Zhi yan Shan, Jing ling Shen, Xi mei Zhang, Lei Lei, and Lian hong Jin. 2009. “MSCs Guide Neurite Directional Extension and Promote Oligodendrogenesis in NSCs.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384 (3). Elsevier Inc.: 372–77. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.147.
87. 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): 49–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17285186>.
88. Liu, Betty P, William B J Cafferty, Stephane O Budel, and Stephen M Strittmatter. 2006. “Extracellular Regulators of Axonal Growth in the Adult Central Nervous System.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361 (1473): 1593–1610. doi:10.1098/rstb.2006.1891.
89. López-Vales, Rubèn, Joaquim Forés, Xavier Navarro, and Enrique Verdú. 2007. “Chronic Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells Promotes Partial Recovery after Complete Spinal Cord Transection in the Rat.” *Glia* 55 (3): 303–11. doi:10.1002/glia.20457.
90. 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): 344–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649491>.
91. Lu, Paul, Armin Blesch, Lori Graham, Yaozhi Wang, Ramsey Samara, Karla Banos, Verena Haringer, et al. 2012. “Motor Axonal Regeneration After Partial and Complete Spinal Cord Transection.” *Journal of Neuroscience* 32 (24): 8208–18. doi:10.1523/JNEUROSCI.0308-12.2012.Motor.
92. Lu, Paul, Leonard L. Jones, and Mark H. Tuszynski. 2007. “Axon Regeneration through Scars and into Sites of Chronic Spinal Cord Injury.” *Experimental Neurology* 203 (1): 8–21.

doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.030.

93. Luo, Jie, Hong-tian Zhang, Xiao-dan Jiang, Shan Xue, and Yi-quan Ke. 2009. "Combination of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation with Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Transection." *Acta Neurochirurgica* 151 (11): 1483–92. doi:10.1007/s00701-009-0402-6.
94. Mackay-sim, Alan. 2005. "Olfactory Ensheathing Cells and Spinal Cord Repair." *Glia* 54 (1): 8–14.
95. Maltman, Daniel J., Steven A. Hardy, and Stefan A. Przyborski. 2011. "Role of Mesenchymal Stem Cells in Neurogenesis and Nervous System Repair." *Neurochemistry International* 59 (3). Elsevier Ltd: 347–56. doi:10.1016/j.neuint.2011.06.008.
96. Maness, Patricia F, and Melitta Schachner. 2007. "Neural Recognition Molecules of the Immunoglobulin Superfamily: Signaling Transducers of Axon Guidance and Neuronal Migration." *Nature Neuroscience* 10 (1): 19–26. doi:10.1038/nn1827.
97. Martin E. Schwab and Stephen M. Strittmatter. 2014. "Nogo Limits Neural Plasticity and Recovery from Injury." *Current Opinion in Neurobiology* 1 (3): 233–45. doi:10.1016/j.dcn.2011.01.002.The.
98. Masuda, Tomoyuki, and Takashi Shiga. 2005. "Chemorepulsion and Cell Adhesion Molecules in Patterning Initial Trajectories of Sensory Axons." *Neuroscience Research* 51 (4): 337–47. doi:10.1016/j.neures.2005.01.007.
99. McCall Julianne, Weidner Norbert and Blesch Armin. 2013. "NEUROTROPHIC FACTORS IN COMBINATORIAL APPROACHES FOR SPINAL CORD REGENERATION." *Cell and Tissue Research* 349 (1): 27–37. doi:10.1007/s00441-012-1388-6.NEUROTROPHIC.
100. McCormick, Aleesha M., and Nic D. Leipzig. 2012. "Neural Regenerative Strategies Incorporating Biomolecular Axon Guidance Signals." *Annals of Biomedical Engineering* 40

- (3): 578–97. doi:10.1007/s10439-011-0505-0.
101. Mehlen, Patrick, Céline Delloye-Bourgeois, and Alain Chédotal. 2011. “Novel Roles for Slits and Netrins: Axon Guidance Cues as Anticancer Targets?” *Nature Reviews. Cancer* 11 (3). Nature Publishing Group: 188–97. doi:10.1038/nrc3005.
102. Michalski, B., J. R. Bain, and M. Fahnstock. 2008. “Long-Term Changes in Neurotrophic Factor Expression in Distal Nerve Stump Following Denervation and Reinnervation with Motor or Sensory Nerve.” *Journal of Neurochemistry* 105 (4): 1244–52. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05224.x.
103. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755779>.
104. Misaki Aizawa-Kohama, Toshiki Endo, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Akira Sumiyoshi, Dai Matsuse, Yasumasa Kuroda, Takahiro Morita, Jorge J. Riera, Ryuta Kawashima, Teiji Tominaga, and Mari Dezaw. 2013. “Transplantation of Bone Marrow Stromal Cell-Derived Neural Precursor Cells Ameliorates Deficits in a Rat Model of Complete Spinal Cord Transection.” *Cell Transplantation* 22 (17): 1613–25.
105. Mohan, Renu, and Annie John. 2015. “Microtubule-Associated Proteins as Direct Crosslinkers of Actin Filaments and Microtubules.” *IUBMB Life* 67 (6): 395–403. doi:10.1002/iub.1384.
106. Moore, Simon W, Marc Tessier-lavigne, and Timothy E Kennedy. 2007. “CHAPTER 2 Netrins and Their Receptors.” In .
107. Mosevitsky, Mark I. 2005. “Nerve Ending ‘Signal’ Proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1.” In , 245–325. doi:10.1016/S0074-7696(05)45007-X.

108. Nagoshi, Narihito, Hiroaki Nakashima, and Michael G. Fehlings. 2015. "Riluzole as a Neuroprotective Drug for Spinal Cord Injury: From Bench to Bedside." *Molecules* 20 (5): 7775–77789. doi:10.3390/molecules20057775.
109. 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. doi:10.1155/2011/939023.
110. Nakajima, Hideaki, Kenzo Uchida, Alexander Rodriguez Guerrero, Shuji Watanabe, Daisuke Sugita, Naoto Takeura, Ai Yoshida, et al. 2012. "Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes an Alternative Pathway of Macrophage Activation and Functional Recovery after Spinal Cord Injury." *Journal of Neurotrauma* 29 (8): 1614–25. doi:10.1089/neu.2011.2109.
111. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713279>.
112. Nutt, Samuel E, Eun-Ah Chang, Steven T Suhr, Laura O Schlosser, Sarah E Mondello, Chet T Moritz, Jose B Cibelli, and Philip J Horner. 2013. "Caudalized Human iPSC-Derived Neural Progenitor Cells Produce Neurons and Glia but Fail to Restore Function in an Early Chronic Spinal Cord Injury Model." *Experimental Neurology* 248. Elsevier Inc.: 491–503. doi:10.1016/j.expneurol.2013.07.010.
113. O'Malley, Aisling M., Daniel K. Shanley, Albert T. Kelly, and Denis S. Barry. 2014. "Towards an Understanding of Semaphorin Signalling in the Spinal Cord." *Gene* 553 (2). Elsevier B.V.: 69–74. doi:10.1016/j.gene.2014.10.005.
114. Ohta, Masayoshi, Yoshihisa Suzuki, Toru Noda, Yoko Ejiri, Mari Dezawa, Kazuya

- Kataoka, Hirotoomi 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): 266–78.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144853>.
115. Ohtake, Yosuke, and Shuxin Li. 2015. "Molecular Mechanisms of Scar-Sourced Axon Growth Inhibitors." *Brain Research*. Elsevier, 1–14.
doi:10.1016/j.brainres.2014.08.064.
116. Okuda, Akinori, Noriko Horii-Hayashi, Takayo Sasagawa, Takamasa Shimizu, Hideki Shigematsu, Eiichiro Iwata, Yasuhiko Morimoto, et al. 2016. "Bone Marrow Stromal Cell Sheets May Promote Axonal Regeneration and Functional Recovery with Suppression of Glial Scar Formation after Spinal Cord Transection Injury in Rats." *Journal of Neurosurgery: Spine*, 1–8. doi:10.3171/2016.8.SPINE16250.
117. Ollivier-Lanvin, K., I. Fischer, V. Tom, J. D. Houle, and M. A. Lemay. 2015. "Either Brain-Derived Neurotrophic Factor or Neurotrophin-3 Only Neurotrophin-Producing Grafts Promote Locomotor Recovery in Untrained Spinalized Cats." *Neurorehabilitation and Neural Repair* 29 (1): 90–100. doi:10.1177/1545968314532834.
118. 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): 825–35.
doi:/S0100-879X2005000600003.
119. 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.
doi:10.1089/neu.2006.23.453.
120. Oyinbo, Charles Aidemise. 2011. "Secondary Injury Mechanisms in Traumatic Spinal Cord Injury: A Nugget of This Multiply Cascade." *Acta Neurobiologiae Experimentalis*

- 71 (2): 281–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731081>.
121. Pierdoná Guzen Fausto, Joacil Germano Soares, Leandro Moura de Freitas, John Fontenele Araújo José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti, Francisco Gilberto Oliveira, and Expedito Silva do Nascimento Jr and Miriam Stela Maris de Oliveira Costa Jeferson de Souza Cavalcante, Judney Cley Cavalcante. 2012. “Sciatic Nerve Grafting and Inoculation of FGF-2 Promotes Improvement of Motor Behavior and Fiber Regrowth in Rats with Spinal Cord Transection.” *Restorative Neurology and Neuroscience* 30 (2012): 265–75. doi:10.3233/RNN-2012-110184.
122. 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): 415–36. doi:10.1016/j.nbd.2003.11.015.
123. Qiu, Xue Cheng, Hui Jin, Rong Yi Zhang, Ying Ding, Xiang Zeng, Bi Qin Lai, Eng Ang Ling, Jin Lang Wu, and Yuan Shan Zeng. 2015. “Donor Mesenchymal Stem Cell-Derived Neural-like Cells Transdifferentiate into Myelin-Forming Cells and Promote Axon Regeneration in Rat Spinal Cord Transection.” *Stem Cell Research and Therapy* 6 (1). Stem Cell Research & Therapy: 1–17. doi:10.1186/s13287-015-0100-7.
124. 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): 3803–15.
125. Ramos, Renato Carlos do Vale, and Nuno Alegrete. 2015. “The Role of Pharmacotherapy in Modifying the Neurological Status of Patients with Spinal and Spinal Cord Injuries.” *Revista Brasileira de Ortopedia* 50 (6). Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia: 617–24. doi:10.1016/j.rboe.2015.09.001.
126. Raspa, Andrea, Raffaele Pugliese, Mahboubeh Maleki, and Fabrizio Gelain. 2015.

- “Recent Therapeutic Approaches for Spinal Cord Injury.” *Biotechnology and Bioengineering* 113 (2): 253–59. doi:10.1002/bit.25689.
127. 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.
128. Ribeiro-Resende, Victor T., Brigitte Koenig, Susanne Nichterwitz, Sven Oberhoffner, and Burkhard Schlosshauer. 2009. “Strategies for Inducing the Formation of Bands of Büngner in Peripheral Nerve Regeneration.” *Biomaterials* 30 (29). Elsevier Ltd: 5251–59. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.007.
129. Rodriguez, Alberto, El Snc, Long-term Potentiation, and Long-term Depression. 2004. “Plasticidad de La Médula Espinal Regeneración Luego de La Lesión Medular.” *Boletin Del Departamento de Docencia e Investigación IREP* 8 (1): 43–50.
130. Rossignol, Serge, and Alain Frigon. 2011. “Recovery of Locomotion After Spinal Cord Injury: Some Facts and Mechanisms.” *Annual Review of Neuroscience* 34 (1): 413–40. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113746.
131. Sakiyama-Elbert, S., P. J. Johnson, S. I. Hodgetts, G. W. Plant, and A. R. Harvey. 2012. *Scaffolds to Promote Spinal Cord Regeneration. Handbook of Clinical Neurology*. 1st ed. Vol. 109. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-52137-8.00036-X.
132. Salewski, Ryan P, Josef Buttigieg, Robert A Mitchell, Derek van der Kooy, Andras Nagy, and Michael G Fehlings. 2013. “The Generation of Definitive Neural Stem Cells from PiggyBac Transposon-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Enhanced by Induction of the NOTCH Signaling Pathway.” *Stem Cells and Development* 22 (3): 383–96. doi:10.1089/scd.2012.0218.
133. Schmidt, Eric F., and Stephen M. Strittmatter. 2007. “The CRMP Family of Proteins and Their Role in Sema3A Signaling.” In *Semaphorins: Receptor and Intracellular Signaling*

- Mechanisms*, 1–11. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-70956-7_1.
134. 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): 297–302. doi:10.1016/S0166-2236(03)00126-7.
135. Sharp, D. J., and J. L. Ross. 2012. "Microtubule-Severing Enzymes at the Cutting Edge." *Journal of Cell Science* 125 (11): 2561–69. doi:10.1242/jcs.101139.
136. Sharp, Jason, Jennifer Frame, Monica Siegenthaler, Gabriel Nistor, and Hans S. Keirstead. 2010. "Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Improve Recovery after Cervical Spinal Cord Injury." *Stem Cells* 28 (1): 152–63. doi:10.1002/stem.245.
137. Shichinohe, Hideo, Satoshi Kuroda, Sachiko Tsuji, Satoshi Yamaguchi, Shunsuke Yano, Jang Bo Lee, Hiroyuki Kobayashi, Seiji Kikuchi, Kazutoshi Hida, and Yoshinobu Iwasaki. 2008. "Bone Marrow Stromal Cells Promote Neurite Extension in Organotypic Spinal Cord Slice: Significance for Cell Transplantation Therapy." *Neurorehabilitation and Neural Repair* 22 (5): 447–57. doi:10.1177/1545968308315596.
138. Shinozaki, Munehisa, Akio Iwanami, Kanehiro Fujiyoshi, Syoichi Tashiro, Kazuya Kitamura, Shinsuke Shibata, Hiroshi Fujita, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano. 2016. "Combined Treatment with Chondroitinase ABC and Treadmill Rehabilitation for Chronic Severe Spinal Cord Injury in Adult Rats." *Neuroscience Research* 113. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society: 37–47. doi:10.1016/j.neures.2016.07.005.
139. Siddiqui, Ahad M., Mohamad Khazaei, and Michael G. Fehlings. 2015. *Translating Mechanisms of Neuroprotection, Regeneration, and Repair to Treatment of Spinal Cord Injury. Progress in Brain Research*. 1st ed. Vol. 218. Elsevier B.V. doi:10.1016/bs.pbr.2014.12.007.
140. Siironen, J, Y Collan, and M Røyttä. 1994. "Axonal Reinnervation Does Not

- Influence Schwann Cell Proliferation after Rat Sciatic Nerve Transection." *Brain Research* 654 (2): 303–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7987679>.
141. Silver, J, and J H Miller. 2004. "Regeneration beyond the Glial Scar." *Nature Reviews Neuroscience* 5 (2): 146–56. doi:10.1038/nrn1326.
142. Singh, Anoushka, Lindsay Tetreault, Suhkvinder Kalsi-Ryan, Aria Nouri, and Michael G. Fehlings. 2014. "Global Prevalence and Incidence of Traumatic Spinal Cord Injury." *Clinical Epidemiology* 6: 309–31. doi:10.2147/CLEP.S68889.
143. 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): 225–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635537>.
144. Smith George M, and Onifer Stephen M. 2009. "Construction of Pathways to Promote Axon Growth within the Adult Central Nervous System." *Brain Research Bulletin* 6 (0): 247–53. doi:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.
145. Stewart, Andrew Nathaniel, Jessica Jane Matyas, Ryan Matthew Welchko, Alison Delanie Goldsmith, Sarah Elizabeth Zeiler, Ute Hochgeschwender, Ming Lu, Zhenhong Nan, Julien Rossignol, and Gary Leo Dunbar. 2017. "SDF-1 Overexpression by Mesenchymal Stem Cells Enhances GAP-43-Positive Axonal Growth Following Spinal Cord Injury." *Restorative Neurology and Neuroscience* 35 (4): 395–411. doi:10.3233/RNN-160678.
146. Stirling, David P, KAVEH M. KOCHESFAHANI, and JOHN D. STEEVES AND WOLFRAM TETZLAFF. 2005. "Minocycline as a Neuroprotective Agent." *The Neuroscientist* 11 (4): 308–22. doi:10.1177/1073858405275175.
147. Storer, P. 2003. "Bli-Tubulin and GAP 43 MRNA Expression in Chronically Injured Neurons of the Red Nucleus after a Second Spinal Cord Injury." *Experimental Neurology* 183 (2): 537–47. doi:10.1016/S0014-4886(03)00181-X.

148. Sun, Tao, and Quan-hong Ma. 2011. "Repairing Neural Injuries Using Human Umbilical Cord Blood." *Molecular Neurobiology* 4 (164): 938–45. doi:10.1126/scisignal.2001449.Engineering.
149. Taylor, Sara J., Ephron S. Rosenzweig, John W. McDonald, and Shelly E. Sakiyama-Elbert. 2006. "Delivery of Neurotrophin-3 from Fibrin Enhances Neuronal Fiber Sprouting after Spinal Cord Injury." *Journal of Controlled Release* 113 (3): 226–35. doi:10.1016/j.jconrel.2006.05.005.
150. Thiede-Stan, N. K., and M. E. Schwab. 2015. "Attractive and Repulsive Factors Act through Multi-Subunit Receptor Complexes to Regulate Nerve Fiber Growth." *Journal of Cell Science* 4 (128): 1–12. doi:10.1242/jcs.165555.
151. Tobias, Christopher A, Steve S W Han, Jed S Shumsky, Duckhyun Kim, Maureen Tumolo, Nikhil O Dhoot, Margaret A Wheatley, Itzhak Fischer, Alan Tessler, and Marion Murray. 2005. "Alginate Encapsulated BDNF-Producing Fibroblast Grafts Permit Recovery of Function after Spinal Cord Injury in the Absence of Immune Suppression." *Journal of Neurotrauma* 22 (1): 138–56. doi:10.1089/neu.2005.22.138.
152. Tom, Veronica J., and John D. Houle. 2015. *Peripheral Nerve Graft-Mediated Axonal Regeneration. Neural Regeneration*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801732-6.00019-7.
153. Tom, Veronica J., Harra R. Sandrow-Feinberg, Kassi Miller, Cheryl Domitrovich, Julien Bouyer, Victoria Zhukareva, Michelle C. Klaw, Michel A. Lemay, and John D. Houlé. 2013. "Exogenous BDNF Enhances the Integration of Chronically Injured Axons That Regenerate through a Peripheral Nerve Grafted into a Chondroitinase-Treated Spinal Cord Injury Site." *Experimental Neurology*. doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.011.
154. Tom, Veronica J, Harra R Sandrow-Feinberg, Kassi Miller, Lauren Santi, Theresa Connors, Michel a Lemay, and John D Houlé. 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): 14881–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.3641-09.2009.
155. Tom, Veronica J, Harra R Sandrow-feinberg, Kassi Miller, Lauren Santi, Michel A Lemay, and John D Houlé. 2010. “Combining Peripheral Nerve Grafts and Chondroitinase Promotes Functional Axonal Regeneration in the Chronically Injured Spinal Cord.” *Journal of Neuroscience* 29 (47): 14881–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.3641-09.2009. Combining.
156. Torres-Espín, Abel, Elena Redondo-Castro, Joaquim Hernández, and Xavier Navarro. 2014. “Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells and Olfactory Ensheathing Cells Transplantation after Spinal Cord Injury--a Morphological and Functional Comparison in Rats.” *The European Journal of Neuroscience* 39 (10): 1704–17. doi:10.1111/ejn.12542.
157. Tsai, Eve C, Paul D Dalton, Molly S Shoichet, and Charles H Tator. 2006. “Matrix Inclusion within Synthetic Hydrogel Guidance Channels Improves Specific Supraspinal and Local Axonal Regeneration after Complete Spinal Cord Transection.” *Biomaterials* 27 (3): 519–33. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.025.
158. Tsintou, Magdalini, Kyriakos Dalamagkas, and Alexander Marcus Seifalian. 2015. “Advances in Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury: A Biomaterials Approach.” *Neural Regeneration Research* 10 (5): 726–42. doi:10.4103/1673-5374.156966.
159. Urdzíkóvá, Lucia, Jiří Růžička, Michael LaBagnara, Kristýna Kárová, Šárka Kubinová, Klára Jiráková, Raj Murali, Eva Syková, Meena Jhanwar-Uniyal, and Pavla Jendelová. 2014. “Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammatory Cytokines after Spinal Cord Injury in Rat.” *International Journal of Molecular Sciences* 15 (7): 11275–93. doi:10.3390/ijms150711275.
160. Vaquero, J, and M Zurita. 2009. “Bone Marrow Stromal Cells for Spinal Cord Repair: A Challenge for Contemporary Neurobiology.” *Histology and Histopathology* 24 (1):

- 107–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012250>.
161. 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): 341–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163325>.
162. 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): 129–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423458>.
163. Venkata Ramesh Dasari, Ph.D., Daniel G. Spomar, M.D., Christopher S. Gondi, Ph.D., and Dzung H. Dinh Christopher A. Sloffer, M.D., Meena Gujrati, M.D., Jasti S Rao, Ph.D., and M.D. 2008. "Axonal Remyelination by Cord Blood Stem Cells after Spinal Cord Injury" 24 (2): 391–410.
164. Wang, D., R. M. Ichiyama, R. Zhao, M. R. Andrews, and J. W. Fawcett. 2011. "Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury." *Journal of Neuroscience* 31 (25): 9332–44. doi:10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011.
165. Wang Difei, Ichiyama Ronaldo M, Zhao Rongrong, Andrews Melissa R, and Fawcett James W. 2011. "Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury." *Journal of Neuroscience* 22 (31): 9332–34. doi:10.1523/JNEUROSCIENCE0983-112011.
166. Wang, Difei, Ronaldo M Ichiyama, Rongrong Zhao, Melissa R Andrews, and James W Fawcett. 2011. "Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (25): 9332–44. doi:10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011.

167. Wang, Ling-Jie, Rui-Ping Zhang, and Jian-Ding Li. 2014. "Transplantation of Neurotrophin-3-Expressing Bone Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury." *Acta Neurochirurgica* 156 (7): 1409–18. doi:10.1007/s00701-014-2089-6.
168. 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): 155–63. doi:10.1098/rstb.2009.0149.
169. 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): 364–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931522>.
170. 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): 343–51.
171. 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): 1–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9154524>.
172. Xu Xiao-Ming; and, and Onifer Stephen M. 2009. "Transplantation-Mediated Strategies to Promote Axonal Regeneration Following Spinal Cord Injury." *Respiratory Physiol Neurobiol* 6 (2): 247–53. doi:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.
173. Yasuda, Akimasa, Osahiko Tsuji, Shinsuke Shibata, Satoshi Nori, Morito Takano, Yoshiomi Kobayashi, Yuichiro Takahashi, et al. 2011. "Significance of Remyelination by Neural Stem/Progenitor Cells Transplanted into the Injured Spinal Cord." *Stem Cells* 29 (12): 1983–94. doi:10.1002/stem.767.

174. Yiu, Glenn, and Zhigang He. 2006. "Glial Inhibition of CNS Axon Regeneration." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (8): 617–27. doi:10.1038/nrn1956.
175. Ypsilanti, Athena R, Yvrick Zagar, and Alain Chédotal. 2010. "Moving Away from the Midline: New Developments for Slit and Robo." *Development (Cambridge, England)* 137 (12): 1939–52. doi:10.1242/dev.044511.
176. Zeng, Xiang, Yuan Huan Ma, Yuan Feng Chen, Xue Cheng Qiu, Jin Lang Wu, Eng Ang Ling, and Yuan Shan Zeng. 2016. "Autocrine Fibronectin from Differentiating Mesenchymal Stem Cells Induces the Neurite Elongation in Vitro and Promotes Nerve Fiber Regeneration in Transected Spinal Cord Injury." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 104 (8): 1902–11. doi:10.1002/jbm.a.35720.
177. Zhang, Hongyu, Fenzan Wu, Xiaoxia Kong, Jie Yang, Huijun Chen, Liancheng Deng, Yi Cheng, et al. 2014. "Nerve Growth Factor Improves Functional Recovery by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Apoptosis in Rats with Spinal Cord Injury." *Journal of Translational Medicine* 12 (1): 130. doi:10.1186/1479-5876-12-130.
178. Zhang, Jinlong, Xiaohui Lu, Guijuan Feng, Zhifeng Gu, Yuyu Sun, Guofeng Bao, Guanhua Xu, et al. 2016. "Chitosan Scaffolds Induce Human Dental Pulp Stem Cells to Neural Differentiation: Potential Roles for Spinal Cord Injury Therapy." *Cell and Tissue Research* 12 (May). Cell and Tissue Research: 1–14. doi:10.1007/s00441-016-2402-1.
179. Zhang, Y., G. Campbell, P.N. Anderson, R. Martini, M. Schachner, and A.R. Lieberman. 1995. "Molecular Basis of Interactions between Regenerating Adult Rat Thalamic Axons and Schwann Cells in Peripheral Nerve Grafts I. Neural Cell Adhesion Molecules." *Journal of Comparative Neurology* 361 (2): 193–209. doi:10.1002/cne.903610202.
180. Zhao, Rong-Rong, and James W. Fawcett. 2013. "Combination Treatment with Chondroitinase ABC in Spinal Cord Injury—breaking the Barrier." *Neuroscience Bulletin* 29

(4): 477–83. doi:10.1007/s12264-013-1359-2.

181. Zhao, Rong Rong, Melissa R. Andrews, Difei Wang, Philippa Warren, Miriam Gullo, Lisa Schnell, Martin E. Schwab, and James W. Fawcett. 2013. "Combination Treatment with Anti-Nogo-A and Chondroitinase ABC Is More Effective than Single Treatments at Enhancing Functional Recovery after Spinal Cord Injury." *European Journal of Neuroscience* 38 (6): 2946–61. doi:10.1111/ejn.12276.
182. Ziemińska, Ewelina, Sebastian Kügler, Melitta Schachner, Iwona Wewiór, Julita Czarkowska-Bauch, and Małgorzata Skup. 2014. "Overexpression of BDNF Increases Excitability of the Lumbar Spinal Network and Leads to Robust Early Locomotor Recovery in Completely Spinalized Rats." *PLoS ONE* 9 (2). doi:10.1371/journal.pone.0088833.
183. 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): 103–9.
184. Zurita, Mercedes, and Jesús Vaquero. 2004. "Functional Recovery in Chronic Paraplegia after Bone Marrow Stromal Cells Transplantation." *NeuroReport* 15 (7): 1105–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262542>.
185. 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): 845–53.

Research Article

The Morphofunctional Effect of the Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Predegenerated Peripheral Nerve in Chronic Paraplegic Rat Model via Spinal Cord Transection

Vinnitsa Buzoianu-Anguiano,¹ Sandra Orozco-Suárez,¹
Elisa García-Vences,^{2,3} Sara Caballero-Chacón,⁴ Gabriel Guizar-Sahagún,¹
Luis Chavez-Sanchez,⁵ and Israel Grijalva¹

¹Medical Research Unit for Neurological Diseases, High Specialty Medical Unit Specialty Hospital, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (Mexican Social Security Institute), Avenida Cuauhtémoc 330, Doctores, Cuauhtémoc, 06720 México, DF, Mexico

²Scientific Unit, Faculty of Medicine, UNAM-INMEGEN (National Autonomous University of Mexico-National Institute of Genomic Medicine), Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 México, DF, Mexico

³Faculty of Health Sciences, Anáhuac México Norte, Avenida Universidad Anáhuac 46, Lomas Anáhuac, 52786 Huixquilucan, MEX, Mexico

⁴Department of Physiology and Pharmacy, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UNAM (National Autonomous University of Mexico), Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México, DF, Mexico

⁵Medical Research Unit for Immunology, High Specialty Medical Unit Pediatric Hospital, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (Mexican Social Security Institute), Avenida Cuauhtémoc 330, Doctores, Cuauhtémoc, 06720 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Israel Grijalva; igrijalva@yahoo.com

Received 30 January 2015; Revised 27 May 2015; Accepted 7 June 2015

Academic Editor: John Gensel

Copyright © 2015 Vinnitsa Buzoianu-Anguiano et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Functional recovery following spinal cord injury (SCI) is limited by poor axonal and cellular regeneration as well as the failure to replace damaged myelin. Employed separately, both the transplantation of the predegenerated peripheral nerve (PPN) and the transplantation of bone marrow stromal cells (BMSCs) have been shown to promote the regrowth and remyelination of the damaged central axons in SCI models of hemisection, transection, and contusion injury. With the aim to test the effects of the combined transplantation of PPN and BMSC on regrowth, remyelination, and locomotor function in an adult rat model of spinal cord (SC) transection, 39 Fischer 344 rats underwent SC transection at T9 level. Four weeks later they were randomly assigned to traumatic spinal cord injury (TSCI) without treatment, TSCI + Fibrin Glue (FG), TSCI + FG + PPN, and TSCI + FG + PPN + BMSCs. Eight weeks after, transplantation was carried out on immunofluorescence and electron microscope studies. The results showed greater axonal regrowth and remyelination in experimental groups TSCI + FG + PPN and TSCI + FG + PPN + BMSCs analyzed with GAP-43, neuritin, and myelin basic protein. It is concluded that the combined treatment of PPN and BMSCs is a favorable strategy for axonal regrowth and remyelination in a chronic SC transection model.

1. Introduction

Traumatic spinal cord injury (TSCI) causes permanent disability characterized by paralysis and loss of sensitivity as well as multiple metabolic and systemic alterations associated with the dysfunction of the autonomic nervous system [1].

Until now, there is no effective treatment for both acute and chronic SCI, despite several strategies that have been carried out to promote regeneration and improve function. Within these strategies, the use of tissue transplantation has been proposed. Due to its organized structure, the use of peripheral nerve acts as a physical guide via which axons

are encouraged to grow [2]. They are also distally connected and act as a neuroprotector for the preserved spinal cord [2–6]. Furthermore, due to the action of the Schwann cells and macrophages stemming from the PPN, the regeneration and axonal remyelination are supported, since they are capable of secreting growth factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin-3 (NT-3), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) which promote neuronal survival [7–13].

Another strategy employed is the use of adult bone marrow stromal cells (BMSCs) since they have the capacity for self-renewal and differentiation. It has been demonstrated that the use of BMSCs in TSCI assists in modulating the central nervous system (CNS) environment to promote its repair and secreting anti-inflammatory and antiapoptotic molecules and growth factors, which promote axonal growth, immunomodulation, angiogenesis, remyelination, and protection from cell death caused by apoptosis [14]. They have been shown to have the capacity to differentiate into different neural lineages both *in vitro* and *in vivo*, including neurons, astrocytes, oligodendrocytes, Schwann cells, and microglia [15, 16]. Furthermore, they promote axonal regrowth, remyelination, and the improvement of locomotor function, since they are capable of secreting growth factors such as BDNF, NT-3, VEGF, and bFGF [17–22].

As well as those previously mentioned, there are multiple strategies that have been observed to promote axonal regrowth and the reworking of the central nervous system (CNS) in mammals that have suffered a TSCI. However, none of these alone has been able to reestablish total functionality of the injured spinal cord (SC). As such, it is feasible to believe that the use of two of these in conjunction would produce greater functionality.

The objective of this study was to evaluate the morphological and functional effect of transplanting BMSCs and PPN into chronic paraplegic rat model that has undergone complete spinal cord transection. Our hypothesis was that the combination of PPN and BMSCs would give better results compared to those obtained from untreated rats or rats treated with individual transplants.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design. This study was authorized by the Research and Ethics Committee of the Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); use, handling, and care of animals were carried out following the Official Mexican Standard (Norma Oficial Mexicana) NOM-062-ZOO-1999, which is supported on international standards. A total of 84 Fischer 344 rats were used, aged between 8–10 weeks and weighing between 200 and 220 g. For the TSCI and transplant procedures, 39 females were used having been divided into four random groups (immunofluorescence and histology: Control group: 7 animals; fibrin glue group: 8 animals; PPN group: 12 animals; PPN + BMSCs: 12 animals; electron microscopy: 3 animals per group), 25 males were used as sciatic nerve donors, and 20 males were used to obtain BMSCs.

2.2. Surgical Procedures and Transplant Preparation

2.2.1. Spinal Cord Injury. In order to produce the spinal injury, the rats were anaesthetized by the intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). A laminectomy was carried out at T9 before a sagittal section was made to the dural sac on the dorsal side. A complete transection of the exposed spinal cord was carried out immediately using microsurgery scissors; finally, the surgical wound was stitched using layered closure.

2.2.2. Preparing the Peripheral Nerve for Transplantation. Twenty-one days before the transplant, the peripheral nerve donor rats were anaesthetized before undergoing a complete transverse section of the sciatic nerve in the upper part of the thigh; the caudal stump of the sectioned nerve was fixed to the surrounding muscle with a 5-0 nylon suture. On the day of the transplant, the rat was anaesthetized to extract a segment of sciatic nerve distal to the cut of approximately 2 cm in length. The nerve fragment was placed in chilled isotonic saline solution until the time of transplantation.

2.2.3. Preparing the Cells for Transplantation. The BMSCs were obtained from rats euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. The bone marrow was obtained from both femurs and tibias using a 200 μ L micropipette and deposited in a 15 mL conical tube with culture medium (Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) GIBCO). Following this, the sample was centrifuged at 1500 rpm for 7 minutes. The cells were then separated using a Ficoll (SIGMA) (3 mL) gradient centrifuged at 2000 rpm at 24°C for 30 minutes. The total number of nucleated cells obtained was quantified and 9×10^6 cells were seeded into a 75 cm² culture flask (in 5 mL of DMEM with 20% fetal bovine serum (FBS), from GIBCO), 1 mL of L-Glutamine (GIBCO), 5 mL of HEPES (SIGMA), and 1 mL of Penicillin-Streptomycin (GIBCO); they were then placed in a water-jacketed incubator at 37°C with 5% CO₂ until the cells formed a fibroblast monolayer. Finally, the BMSCs were reseeded onto the fibroblast layer and maintained for two weeks until transplantation time.

2.2.4. Phenotypic Classification of BMSCs. Flow cytometry was used to classify the mature BMSCs. The cells were centrifuged at 1500 rpm for five minutes and they were incubated with primary antibodies (Cd117 Millipore; Cd13 Santa Cruz Biotechnology Inc; Cd34 Santa Cruz Biotechnology Inc, all at a dilution of 1:100) in darkness for 20 minutes at 4°C. They were washed twice with FACS Buffer before being centrifuged again at 1500 rpm for five minutes. The cells marked with Cd117 were incubated in darkness for two hours with the secondary antibody (Alexa 488 or 586, Molecular Probes Invitrogen 1:200); they were then fixed in 4% paraformaldehyde for 1 hour before finally being quantified and analyzed with flow cytometry using the CellQuest Pro (BD Biosciences) program. Cell phenotype proportion is shown in Figure 1. 80.45% of the cells were positive for Cd13 (marker for subpopulation of mesenchymal stem cells); 11.49% were positive for Cd117 (marker for subpopulation of mesenchymal stem cells); and 10.69% of the

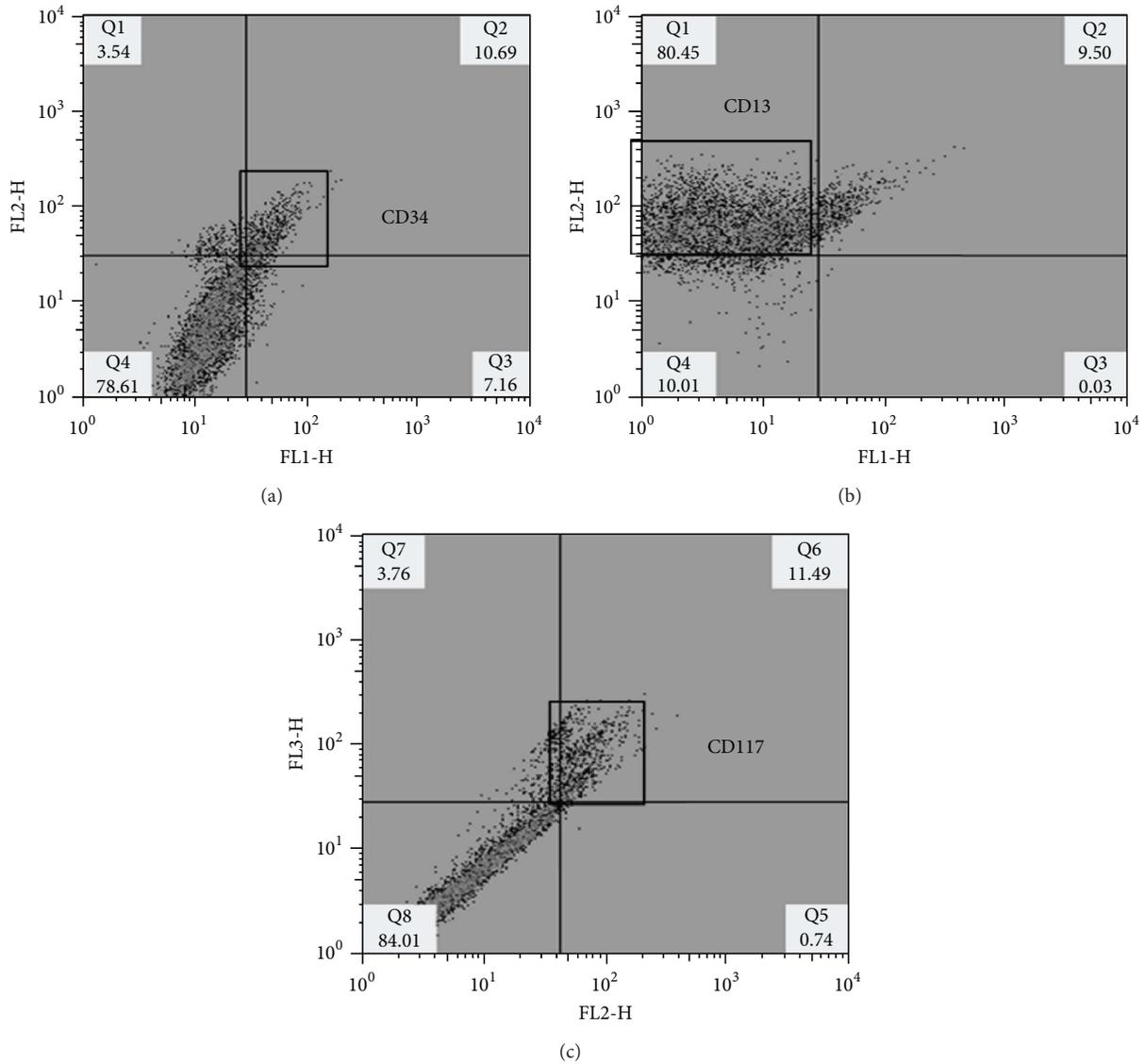


FIGURE 1: Bone marrow stromal cells (BMSCs) flow cytometry with Cd13 and Cd117. (a) Population of Cd34-positive cells (10.69%). (b) Population of Cd13-positive BMSCs (80.45%). (c) Population of Cd117-positive BMSCs (11.49%).

cellular population was positive for Cd34 (specific control marker for hematopoietic stem cells). As such, the majority of cells transplanted were adult mesenchymal stem cells.

2.2.5. Transplant. Four weeks after the spinal cord transection, the rats were assigned to one of four experimental groups. In Group 1 (Control, $n = 7$), the surgical wound was reopened enough to expose the dural sac. In Group 2 (positive Control $n = 8$), the dural sac was reopened and the scar was carefully removed from the spinal cord and the end of the medullary stumps, leaving a cavity of approximately 6 mm of amputated length; the cavity was filled with fibrin glue (BAXTER). In Group 3 ($n = 12$), the same procedure was carried out as described for group 2, except, in this case, 3 or 4 segments of the sciatic peripheral nerve, each of approximately 6 mm in length, were transplanted lengthways

into the medullary cavity; the implants were fixed with fibrin glue (BAXTER). In Group 4 ($n = 12$), in addition to the procedures detailed for group 3, BMSCs were transplanted via four injections, two in the proximal medullary stump and two in the distal medullary stump, in the center of each hemicord; each injection contained 3×10^4 cells in $5 \mu\text{L}$ of Hank's solution (SIGMA).

2.3. Evaluations

2.3.1. Motor Function Evaluation. Hindlimb locomotion was evaluated using the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale [23]. The scale of the BBB evaluates the movements of the hindlimb of the animals; the scale oscillates between 0–21 points, where 0 is no movement and 21 is a normal movement of the hindlimbs. The evaluator

was unaware of the treatment assigned to each animal. The animals were evaluated 24 hours after the transplant and every two weeks during the following 8 weeks.

2.3.2. Processing of Samples for Immunofluorescence. Eight weeks after transplantation, the animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p) before being perfused by intracardiac injection with 4% paraformaldehyde. A 2 cm long segment was obtained from the spinal cord with the injury zone in the center. The samples were placed in a 30% sucrose solution in PBS for 24 hours; 12 μ m thick sagittal frozen serial sections were then cut on a LEICA CM1510S cryostat. Following this, the sections were incubated for 48 hours at 4°C with the primary antibodies (Protein basic myelin (PBM) D18; Neuritin FL-142, and Gap-43 H-100, Santa Cruz Biotechnology Inc.). The sections were later washed with PBS and incubated for 2 hours with the secondary antibody (Alexa 488 Anti-Rabbit or Anti-Mouse, Molecular Probes Invitrogen); they were washed with PBS and stained using propidium iodide (red nuclei) for 1 minute. Finally, they were covered with Vectashield (Vector Labs) in order to be analyzed with a fluorescence microscope (Carl Zeiss). For each specimen, 6 photos were taken from the epicenter (transplant area) and the zones both proximal and distal to it. With the Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics) program, the intensity of green channel pixels corresponding to the Alexa 488 per area was quantified. A histogram, with previously calibrated intensity and spatial scale, was obtained from the intensity values contained within the image's bitmap to establish the intensity values such as the integrated intensity of each image. The optical density was determined in relation to the control group and expressed in pixels/mm².

2.3.3. Histology. The Kluver-Barrera staining method was performed on two specimens of each group; the sections were hydrated before being put into 95% alcohol; they were then placed in a Luxol Fast Blue solution overnight at 37°C. Following this, the excess colorant was removed using 95% alcohol and they were rinsed with distilled water; they were then washed with lithium carbonate and again rinsed with 70% alcohol and with distilled water. The sections were immediately placed in a purple Cresol solution for 6 minutes before being returned to the 70% alcohol and dehydrated with absolute alcohol. They were left to dry and fixed using Entellan synthetic resin (Merck). Finally, the samples were observed using a NIKON (Eclipse E600) microscope and the morphological changes were observed.

2.3.4. Electron Microscope. The specimens were fixed with a Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in a Sorensen solution) during 4 hours at 4°C. Following this, they were postfixed in 1% osmium tetroxide for 45 minutes at room temperature. The excess osmium tetroxide was removed by twice washing with distilled water for two minutes each time. They were dehydrated in alcohols of increasing concentration (50%, 70%, 95%, and 100%) to reach propylene oxide. Following dehydration, the tissue was included in Aldarite synthetic

resin and was left to polymerize for 24 hours at 60 or 70°C. Once the blocks were carried out, semifine cuts were made to locate the zone to be evaluated before fine cuts were made that would be fixed to copper grids and stained with uranyl acetate and lead. The sections were analyzed with a Zeiss 906 transmission electron microscope and, for each group, 10 images were taken from the transition zone only between the PPN transplant and both the proximal and distal surrounding spinal cords in which only morphological changes were observed.

2.3.5. Statistical Analysis. The Graph Prism 5.0 statistics program was used for descriptive analysis; measures of central tendency and statistical dispersion were used alongside tables and graphs. For statistical inference, a nonparametric ANOVA analysis test was used with Kruskal-Wallis ranges to determine the differences between groups, followed by a Mann-Whitney *U* test to identify the groups between which there was a difference. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Motor Function Results. The hind extremity evaluation using the BBB rating scale showed severe motor function deterioration in the initial evaluation following the different experimental procedures. Scores improved marginally as time passed, especially for the PPN and BMSCs groups which reached an average rating close to 4 in contrast to the Control group which maintained a rating close to 1 (Figure 2).

3.2. Expression of GAP-43, Neuritin, and PBM: Microscopic Observations. In the qualitative evaluation of the histology images, a greater quantity of GAP-43 positive axons (Figure 3) and Neuritin was found in the transplant group compared to the Control group, in the zones both rostral and caudal to the injury (Figure 4). Furthermore, the PPN + BMSCs group axons were thicker than those observed in the PPN group (Figure 3). Finally, the presence of growth cones marked with Neuritin was only present in the PPN and PPN + BMSCs groups (Figure 4). A greater number of PBM-positive axons were also observed in the PPN and PPN + BMSCs groups in the zones rostral and caudal to the transplant (Figure 5).

3.3. Expression of GAP-43, Neuritin, and PBM: Quantification of Fluorescence Intensity. The GAP-43 fluorescence intensity was significantly greater in the groups that received a treatment (PPN + BMSCs, FG, and PPN) versus the Control group ($p < 0.05$) in both the rostral and caudal zones (Figures 6(a) and 6(b)); additionally, in the caudal zone (Figure 6(b)), the fluorescence intensity was significantly greater in the PPN + BMSCs and PPN groups versus FG ($p < 0.05$). The Neuritin fluorescence intensity (Figures 6(c) and 6(d)) and PBM (Figures 6(e) and 6(f)) in both the rostral and caudal zones was significantly greater in the PPN + BMSCs and PPN groups versus the FG and control groups ($p < 0.05$).

3.4. Electron Microscopy of Myelination. In the PPN and PPN + BMSCs groups, it was observed that the axon myelin

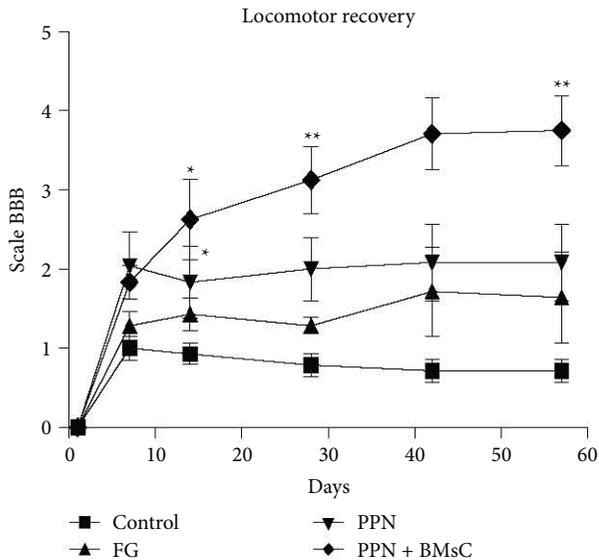


FIGURE 2: Analysis of locomotor function based on the BBB rating scale. y -axis corresponds to days of evaluation, where day 0 was the beginning of the evaluation within 24 hours after the transplant. The differences between the PPN and PPN + BMSCs groups can be observed when compared to the Control group (*) (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$); furthermore, upon comparing the treatment groups, only the PPN + BMSCs group presented a significant difference from day 30 onwards compared to FG (**) (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U Test, $p < 0.05$ resp.), with no difference observed between the transplant groups. The graph represents the average \pm standard error.

found had a well-defined and better-preserved structure; furthermore, there were a greater number of myelinated axons in contrast to Control and FG groups (Figure 7). Finally, in the PPN + BMSCs group, there were several thin axons rounded by a thin sheath of myelin and beside to a Schwann cell, which we consider the new axons (Figure 7). In both treatment groups, it was observed that the myelinated axons were ensheathed by the Schwann cells (Figure 7); on the other hand, in the PPN + BMSCs group, the BMSCs were found along with the axons and the Schwann cells (Figure 8).

3.5. Tissue Integration. From the samples analyzed with Luxol Fast Blue, it was observed that in the groups receiving PPN and PPN + BMSCs transplant, the surrounding spinal cord structure was adequately preserved and there was good acceptance between the transplanted PPN and the preserved SC (Figure 9).

4. Discussion

Functional recovery of the spinal cord following a traumatic injury with complete paralysis and secondary loss of sphincter control has been achieved using diverse therapeutic strategies in animal models. Nevertheless, therapeutic human trials carried out to date have had limited success. It is with that objective, therefore, that proposals for new alternatives using

both single and combined treatment alternatives continue to be made.

It would appear that better results are achieved using combined treatments compared to single treatments. Using an acute model of complete transection, Guzen et al. [24] demonstrated that axonal regrowth and improved locomotor function took place following PPN transplantation; they also demonstrated that axonal regeneration and locomotor improvement increased when the PPN was combined with FGF-2, making it more effective than the use of PPN alone [24]. Using an acute model of complete transection, Koda et al. [25] also demonstrated that axonal regrowth and improved locomotor function occurred following the transplantation of BMSCs; however, the combination of BMSCs + BDNF showed greater effectiveness since it promoted a greater number of regenerated axons and increased locomotor function [25].

In this study, the therapy proposed to encourage axonal regrowth, remyelination, and functional recovery was the combined use of PPN and BMSC; considering that separately, each one of them has been shown to have a beneficial effect following the TSCI as previously mentioned.

The evaluation of axonal regrowth using the GAP-43 protein, known to be related to axonic fiber growth following a TSCI [26], showed a greater number of protein-positive fibers in the group transplanted with PPN than in Control group. Coinciding with Yuan et al. [27] in an axotomy model, GAP-43 positive fibers were found following the PPN transplant [27]. Following the PPN transplantation in an acute model of complete transection, Guzen et al. [24] also observed a greater quantity of GAP-43 positive fibers [24]. Furthermore, this study also observed that the PPN + BMSCs group had a greater number of GAP-43 positive fibers compared to the PPN group and they were also thicker than those of the PPN group. To date, no publications on the complete transection model are known to associate the use of BMSCs and the expression of GAP-43. However, Čížková et al. [28] observed the expression of GAP-43 following the transplantation of BMSCs in a compression model [28]. Finding GAP-43 positive fibers in another study using a contusion model, Kamada et al. [29] demonstrated that axonal regrowth was promoted following the transplantation of BMSCs [29]. The expression of GAP-43 might be mainly due to the PPN since it expresses different substances to support its regeneration such as trophic factors, adhesion molecules, and extracellular matrix molecules; [30] these factors provide a stimulating environment to facilitate the growth of CNS axons and support locomotor function [30]. However, since this expression is greater in the combined group, this could also be due to the contribution of the BMSCs given that the use of BMSCs in TSCI helps modulate the CNS environment to promote self-repair, secreting trophic substances that promote axonal growth [14].

As well as observing the presence of GAP-43, this study only found Neuritin immunoreactivity in the transplant groups PPN and PPN + BMSCs, indicative of the presence of growth cones; however, there was no significant difference between the transplant groups. Neuritin is the protein implicated in neuronal plasticity, relating to neurite

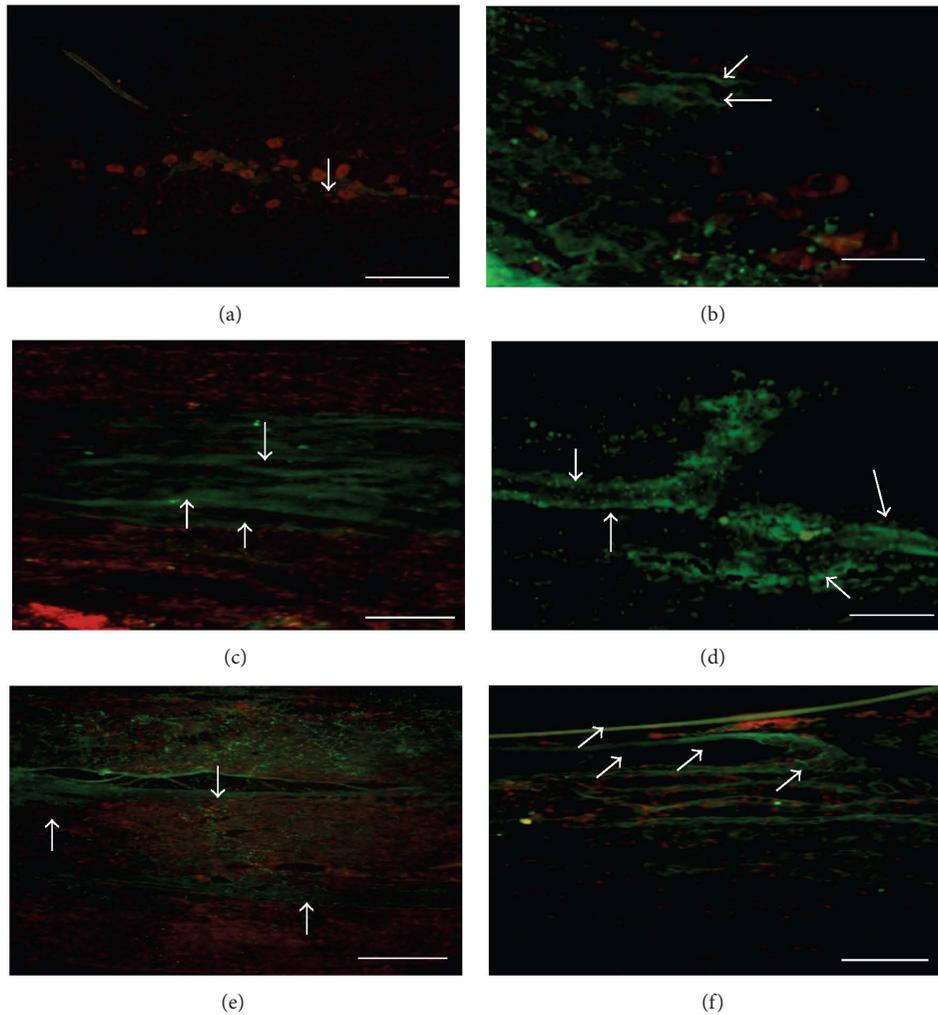


FIGURE 3: Photomicrography of the expression of GAP-43 in spinal cord. (a) Control group. (b) Fibrin glue group (FG). (c) PPN group, rostral zone of the SC. (d) PPN + BMSCs group, rostral zone of the SC. (e) PPN group, caudal zone of the SC. (f) PPN + BMSCs group, caudal zone of the SC. A greater quantity of GAP-43 positive fibers can be observed in panels (c) to (f) (white arrows, Alexa 488, green color), compared to panels (a) and (b). Furthermore, and easily visible, the positive fibers which were found in the PPN + BMSCs group ((e) and (f)) are thicker than those ones which were in the PPN group ((c) and (d)). All the tissue was contrasted with propidium iodide (nuclei red color). Calibration bar 20 μm .

growth [31]. There are no publications on complete section models in respect to this marker; however, Sarah Busch and colleagues have associated the presence of growth cones with the regrowth of sensory axons in a spinal cord compression model [32].

Myelination is essential to maintaining optimum function of the CNS since it promotes the conduction of nerve impulses and provides metabolic and trophic support; [33] so, when a TSCI occurs, the destruction of myelin affects motor and sensory function in the aforementioned manner. Structural affection in different TSCI models can be identified by evaluating the level of myelination. PBM has been used to evaluate the level of myelination in different experimental models. In this study, a greater expression of PBM was observed in the transplant groups, especially in the distal segment of the spinal cord and mainly in the PPN + BMSCs group. Furthermore, in the electron microscope study, it was

demonstrated that the PPN + BMSCs group had a greater quantity of myelinated axons which were more robust and which had ramifications. There are no studies known to evaluate the effect of PPN and BMSCs transplant on PBM in a chronic complete transection model. However, in an acute complete transection model, Chen et al. [34] demonstrated that they obtained a greater number of myelinated axons after transplanting BMSCs and the myelin had a uniform and more dense structure [34]. This property can be explained by the capability of the BMSCs to differentiate into myelinating cells. This is in line with the studies carried out by Akiyama et al. [35] who used a model of radiation injury, in which the myelinating cells were destroyed after transplantation of BMSCs, demonstrating that they promoted the myelination of bare axons which improved the nerve impulse [35].

Additionally, cells with a morphology that was different from that of the nervous tissue were observed near the

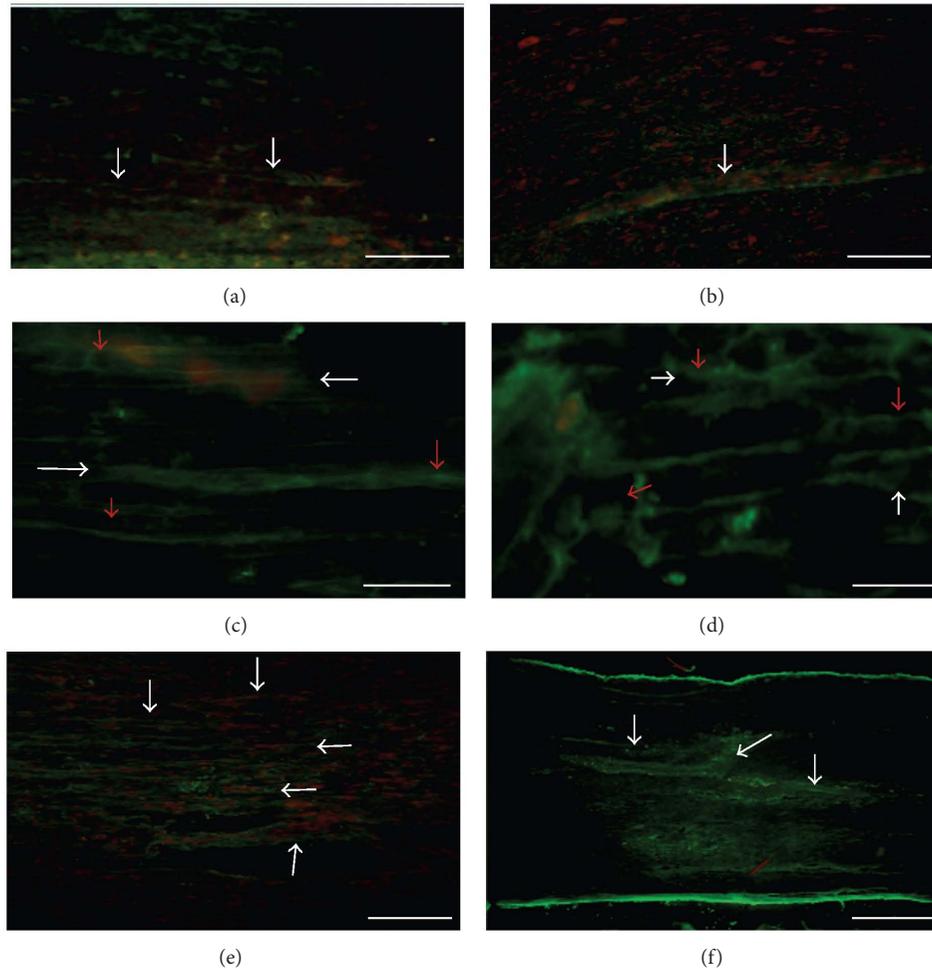


FIGURE 4: Photomicrography of the expression of Neuritin in spinal cord. (a) Control group. (b) Fibrin glue group (FG). (c) PPN group, rostral zone of the SC. (d) PPN + BMSCs group, rostral zone of the SC. (e) PPN group, caudal zone of the SC. (f) PPN + BMSCs group, caudal zone of the SC. A greater quantity of Neuritin positive fibers can be observed in panels (c) to (f) (white arrows, Alexa 488, green color), compared to panels (a) and (b). We can also observe that growth cones (red arrows) were only presented in the treated groups (panels (c) and (d)). All the tissue was contrasted with propidium iodide (nuclei red color). Calibration bar 20 μm .

myelinated axons; these cells could correspond to differentiated BMSCs, which can differentiate into myelinating cells as mentioned above [35], and, together with the Schwann cells resulting from the PPN, they help bring about a better myelination of regenerated axons as was demonstrated by Dam-Hieu et al. [36] in a model of hemicordotomy, in which the axons were myelinated by the actions of the Schwann cells following the transplantation of PPN [36].

Finally, and as a result of the beneficial mechanisms already mentioned in relation to both the PPN and the BMSCs, it was observed that, in the PPN and PPN + BMSCs transplant groups, the surrounding spinal cord structure was adequately preserved and that there was good acceptance with the PPN, which can be categorized as neuroprotection. This is in line with the study published by Guizar-sahagun et al. [3], in which they observed that the use of PPN acted like a shock absorber for substances produced by the secondary injury mechanisms, protecting the SC surrounding the injury zone, expressed as improved medullary tissue preservation

[3]. On the other hand, Feng et al. [30] showed that, following the use of PPN in a model of contusion, there was greater neuronal preservation, which is due to the fact that the PPN promotes a microenvironment in which the Schwann cells secrete growth factors such as BDNF, NGF, and NT3 which improve neuronal survival [30]. It has been seen that the neuroprotective capacity of the BMSCs comes from the secretion of different substances, which can promote immunomodulation, repair, remyelination, axonal regrowth, and improved function. Using a model of compression, Quertainmont et al. [14] demonstrated that, in transplanting BMSCs, their neuroprotective effects came from the secretion of molecules such as the ciliary neurotrophic factor (CNT-F), the monocyte chemoattracting protein-1 (MCP-1), and the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) which support the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells, promoting the clearance of myelin debris and protecting the neurons and glial cells from apoptosis. They also observed an increase in the secretion

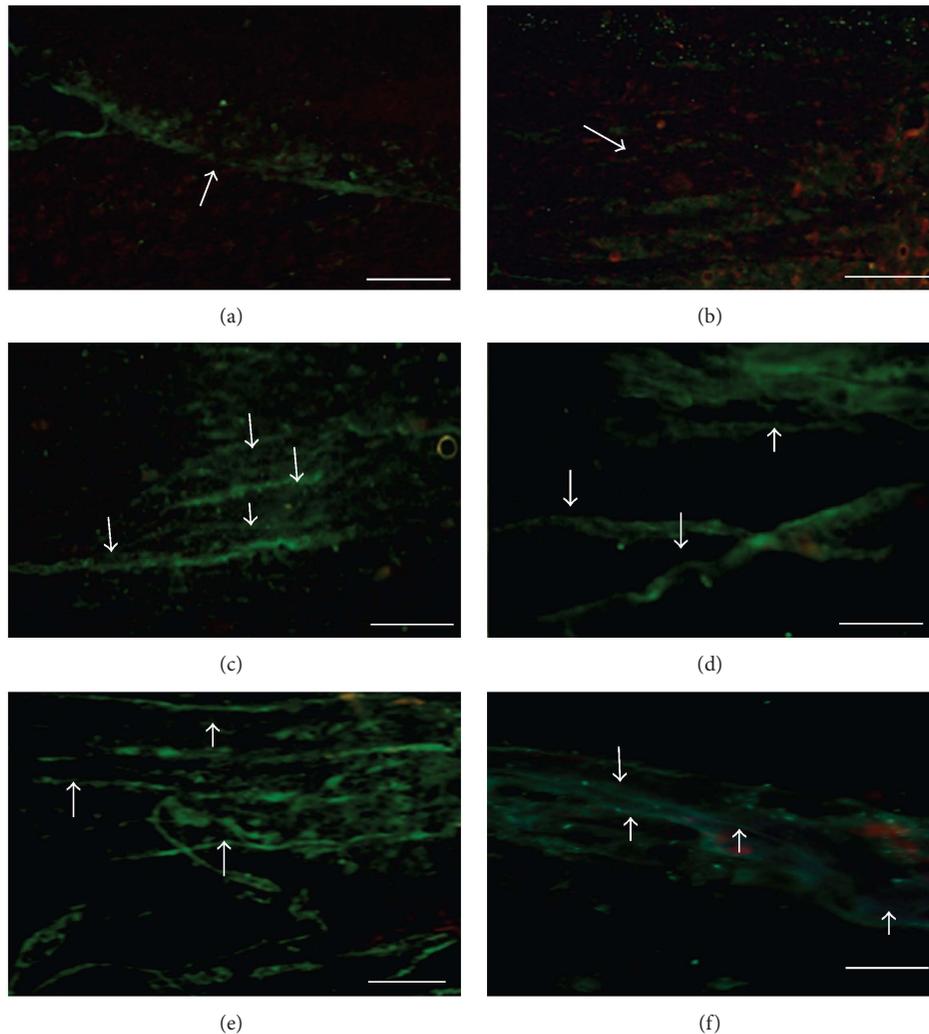


FIGURE 5: Photomicrography of the expression of Basic Protein Myelin in spinal cord. (a) Control group. (b) Fibrin glue group (FG). (c) PPN group, rostral zone of the SC. (d) PPN + BMSCs group, rostral zone of the SC. (e) PPN group, caudal zone of the SC. (f) PPN + BMSCs group, caudal zone of the SC. A greater quantity of PBM-positive fibers can be observed in panels (c) to (f) (white arrows, Alexa 488, green color) in contrast to panels (a) and (b). All the tissue was contrasted with propidium iodide (nuclei red color). Calibration bar 20 μm .

of anti-inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-10 as well as the secretion of growth factors such as BDNF and NGF, which help protect the neurons during toxic events, promote regrowth, and repair and reorganize the neuronal connections and which also stimulate neurogenesis and protect tissue, decreasing scar formation. Also observed were the antiangiogenic effects of the secretion of the vascular endothelial growth factor (VEGF) [14].

Despite the fact that there were significant locomotion differences between transplanted and nontransplanted animals, the improvement was modest. On the other hand, although there was a tendency in favor of combined transplantation (PPN + BMSCs), the difference versus PPN group was not significant. In both cases, it can be due to the short term functional follow-up, because it has been seen that improvement begins at the third month after implemented treatment. Poor functional improvement was observed in models of complete transection that received no additional

treatment, obtaining an average BBB rating scale score of 4 points [37]. Following transplantation of PPN in an acute model of complete transection, Guzen et al. [24] obtained an average score of 5 on the BBB rating scale eight weeks after treatment [24]. Following the transplantation of BMSCs in another acute injury study, Chen et al. [34] observed an average of 8 points on the same scale following eight weeks of treatment [34]. It is possible that there is additional functional improvement with long term follow-up as reported by Vaquero and Zurita in a severe contusion model in which the experimental animals achieved a 13 point score with BMSCs transplantation after a one-year follow-up [21].

5. Conclusions

The transplant of PPN + BMSCs in a chronic complete spinal cord transection model showed significantly great myelination in the preserved spinal cord rostral and caudal to the

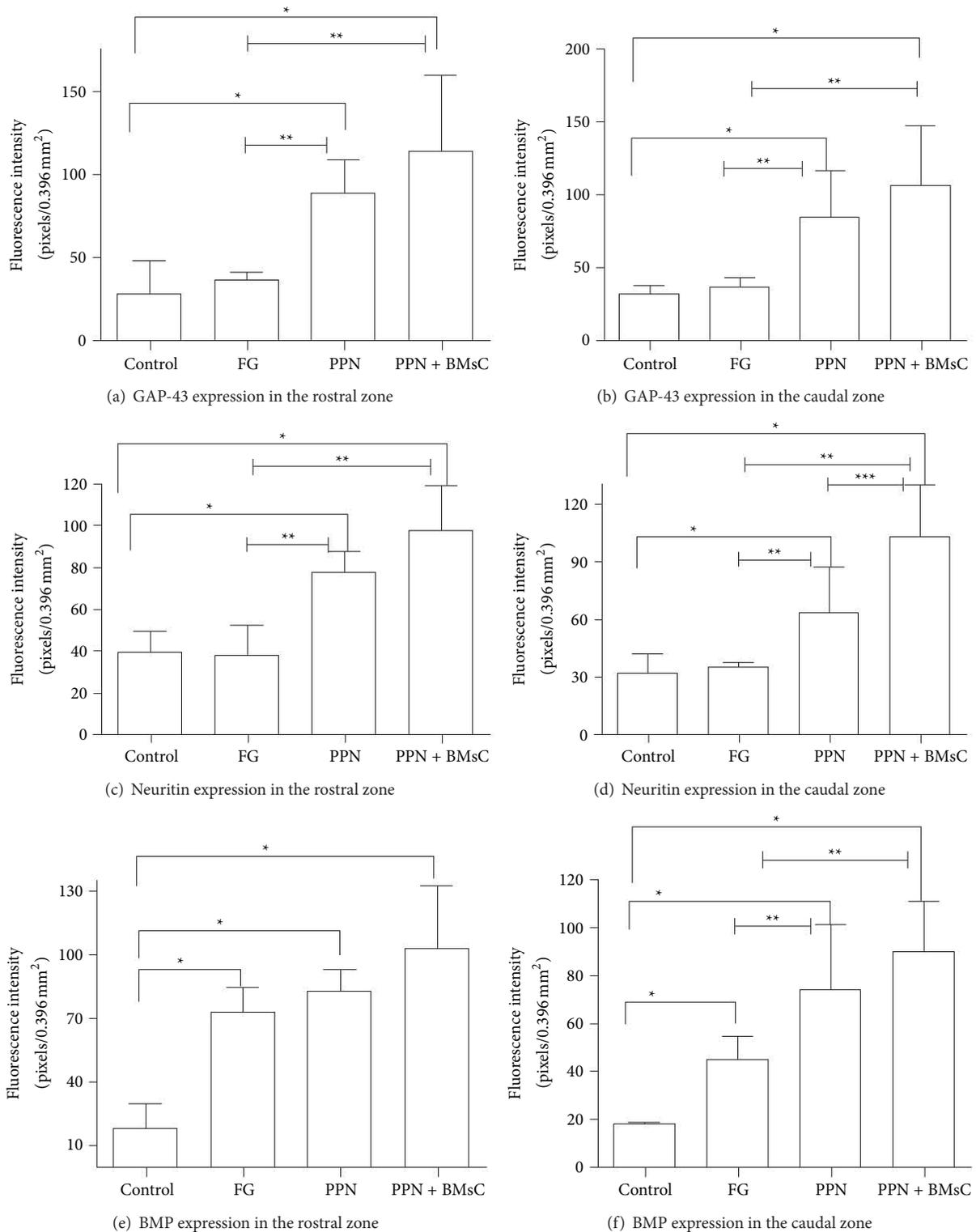


FIGURE 6: Fluorescence intensity analysis. Panels (a) and (b), expression of GAP-43: in both areas of the SC, a significant difference can be observed in the FG, PPN, and PPN + BMSCs groups compared to the Control group (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$) as well as a significant difference in the treatment groups compared to the FG group (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). Panels (c) and (d), expression of Neuritin: it can be observed that the treatment groups obtained a significant difference when they are compared to the Control and FG groups (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). Panels (e) and (f), expression of PBM in the SC: in both areas, a significant difference is observed between the treated groups and the Control and FG groups (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$); furthermore, in the distal zone, a significant difference can be observed between the PPN + BMSCs group compared with the PPN group (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). * is the difference with Kruskal-Wallis $p < 0.05$, and ** is the difference with U -MANN $p < 0.05$.

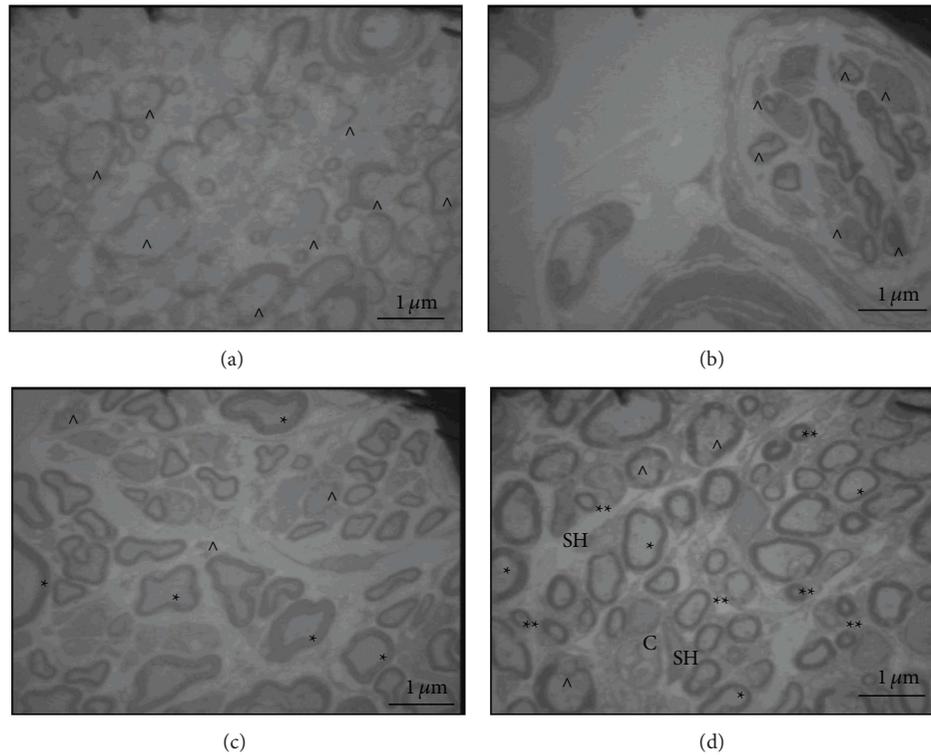


FIGURE 7: Electron photomicrography of distal stump to spinal cord. (a) Control; demyelinated axons and axons in process of demyelination (^) (1600x). (b) FG; damaged axons (^) (1600x). (c) PPN; myelinated axons (*), macrophage close to a damage axon (MA), and damaged axons (^) (1600x). (d) PPN + BMSCs myelinated axons (*), newly formed axons (**), some damaged axons (^), and Schwann cell (SH) beside its axon and BMSCs (C) beside a Schwann cell (SH) (1600x). The images were taken with a transmission electron microscope LEO 906 E. Calibration bar 1 μm .

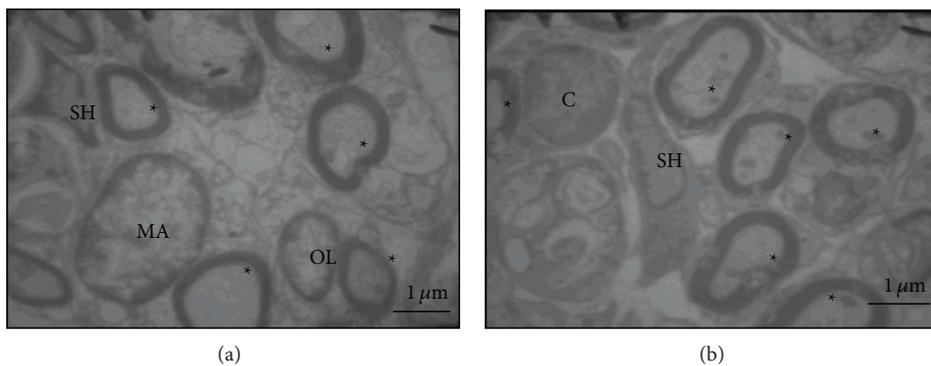


FIGURE 8: Electron photomicrography of distal stump to spinal cord. (a) PPN; Schwann cell (SH) interacts with a myelinated axon (*); an oligodendrocyte (OL) can also be observed beside an axon, and a macrophage (MA) is seen in the left corner (1600x); (b) BMSC interacts (C) with a Schwann cell (SH) beside a myelinated axon (*) (4646x). The images were taken with a transmission electron microscope LEO 906 E. Calibration bar 1 μm .

transplant area compared to PPN. However, although axonal regrowth and functionality were not significant, the PPN + BMSCs group showed high levels. The transplanted groups showed significantly greater axonal regrowth, myelination, and functionality than the Control groups. Additional studies are needed to evaluate the long term functional effect. The use of new combinations that potentially increase locomotor

function in the same injury model used in this study is also proposed.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

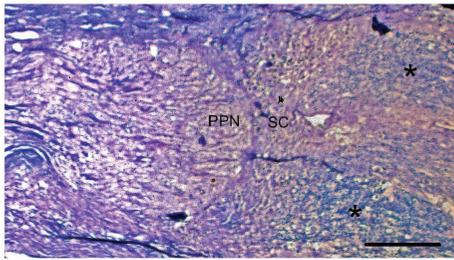


FIGURE 9: Spinal cord transplant interface. Photomicrography of a specimen from the PPN + BMSCs group in which excellent adhesion between the transplanted nerve (PPN) and the distal spinal cord (SC) stump can be observed. The spinal cord shows a good level of myelination (*). Kluver-Barrera staining. Calibration bar 500 μ m.

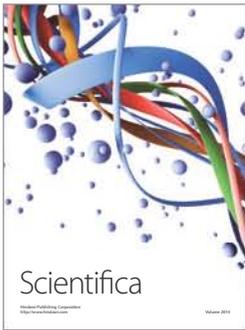
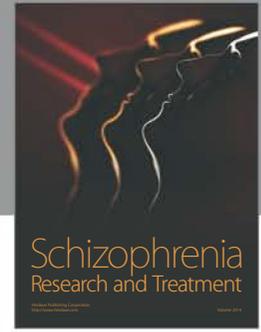
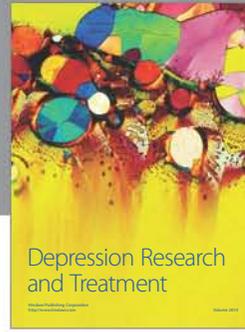
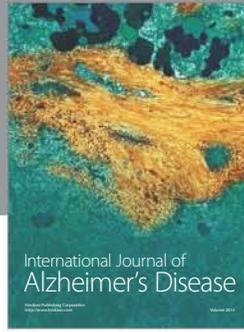
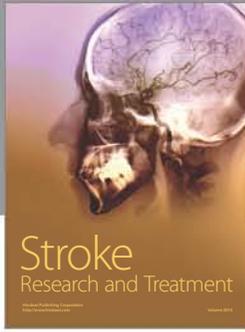
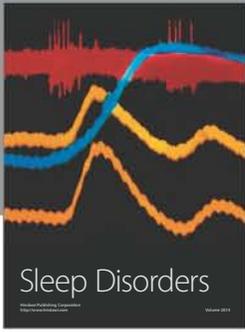
Acknowledgments

Special thanks are to Doctor Karina Chávez Rueda of the Centro Médico Nacional Siglo XXI Pediatric Hospital for carrying out the flow cytometry studies. To carry out the study, finance was received from the Health Research Promotion Fund of the Mexican Institute of Social Security FOFOI/FIS no. 2005-1/I/036. Vinnitsa Buzoianu-Anguiano received a grant from the National Council for Science and Technology (CONACYT) and from the Mexican Social Security Institute (IMSS).

References

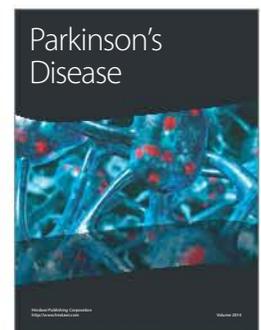
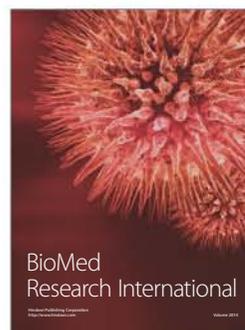
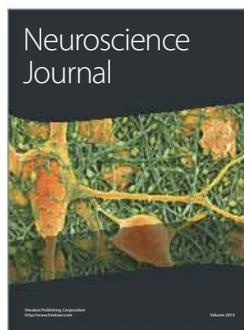
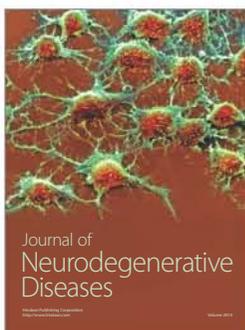
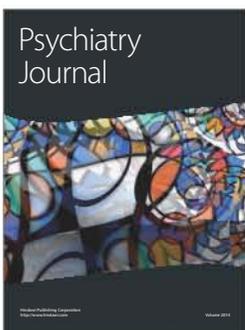
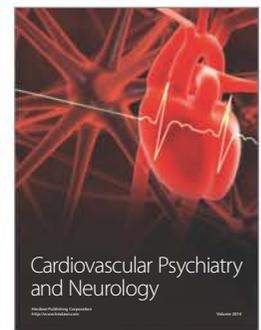
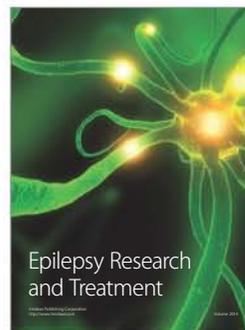
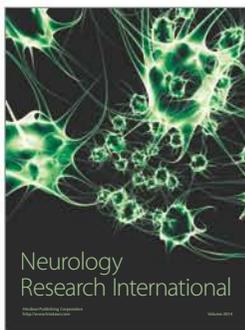
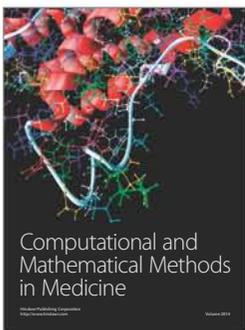
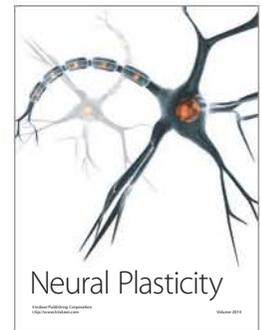
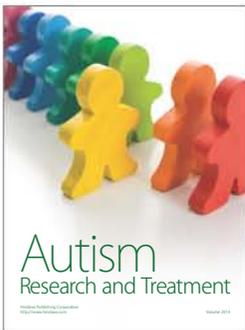
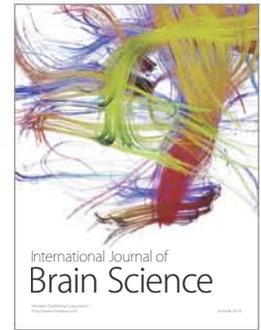
- [1] G. Guízar-Sahagún, G. Castañeda-Hernández, P. García-López, R. Franco-Bourland, I. Gualva, and I. Madrazo, "Pathophysiological mechanisms involved in systemic and metabolic alterations secondary to spinal cord injury," *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, vol. 41, pp. 237–240, 1998.
- [2] M.-P. Côté, A. A. Amin, V. J. Tom, and J. D. Houle, "Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury," *Neurotherapeutics*, vol. 8, no. 2, pp. 294–303, 2011.
- [3] G. Guízar-Sahagún, I. Grijalva, I. Madrazo et al., "Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 7, no. 2, pp. 61–70, 1994.
- [4] V. J. Tom, H. R. Sandrow-Feinberg, K. Miller et al., "Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord," *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 47, pp. 14881–14890, 2009.
- [5] J. D. Houle, V. J. Tom, D. Mayes, G. Wagoner, N. Phillips, and J. Silver, "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," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 28, pp. 7405–7415, 2006.
- [6] G. R. D. Evans, "Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs," *The Anatomical Record*, vol. 263, no. 4, pp. 396–404, 2001.
- [7] X. M. Xu, A. Chen, V. Guénard, N. Kleitman, and M. B. Bunge, "Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord," *Journal of Neurocytology*, vol. 26, no. 1, pp. 1–16, 1997.
- [8] J. Siironen, Y. Collan, and M. Røyttä, "Axonal reinnervation does not influence Schwann cell proliferation after rat sciatic nerve transection," *Brain Research*, vol. 654, no. 2, pp. 303–311, 1994.
- [9] S. Y. Chiu, "Changes in excitable membrane properties in Schwann cells of adult rabbit sciatic nerves following nerve transection," *The Journal of Physiology*, vol. 396, no. 1, pp. 173–188, 1988.
- [10] J. D. Guest, A. Rao, L. Olson, M. B. Bunge, and R. P. Bunge, "The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord," *Experimental Neurology*, vol. 148, no. 2, pp. 502–522, 1997.
- [11] D. Bouhy, B. Malgrange, S. Multon et al., "Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages," *The FASEB Journal*, vol. 20, no. 8, pp. 1239–1241, 2006.
- [12] M. Oudega, L. Moon, and R. de Almeida Leme, "Schwann cells for spinal cord repair," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 6, pp. 825–835, 2005.
- [13] M. Oudega and X.-M. Xu, "Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord," *Journal of Neurotrauma*, vol. 23, no. 3-4, pp. 453–467, 2006.
- [14] R. Quertainmont, D. Cantinieaux, O. Botman, S. Sid, J. Schoenen, and R. Franzen, "Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e39500, 2012.
- [15] M. Chopp, X. H. Zhang, Y. Li et al., "Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation," *NeuroReport*, vol. 11, no. 13, pp. 3001–3005, 2000.
- [16] D. Woodbury, E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black, "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 61, no. 4, pp. 364–370, 2000.
- [17] P. Lu, L. Jones, and M. Tuszynski, "BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury," *Experimental Neurology*, vol. 191, no. 2, pp. 344–360, 2005.
- [18] J.-R. Chen, G.-Y. Cheng, C.-C. Sheu, G.-F. Tseng, T.-J. Wang, and Y.-S. Huang, "Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke," *Journal of Anatomy*, vol. 213, no. 3, pp. 249–258, 2008.
- [19] V. B. Fernández Vallone, M. A. Romaniuk, H. Choi, V. Labovsky, J. Otaegui, and N. A. Chasseing, "Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved?" *Differentiation*, vol. 85, no. 1-2, pp. 1–10, 2013.
- [20] G. W. J. Hawryluk, A. Mothe, J. Wang, S. Wang, C. Tator, and M. G. Fehlings, "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*, vol. 21, no. 12, pp. 2222–2238, 2012.
- [21] J. Vaquero and M. Zurita, "Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology," *Histology and Histopathology*, vol. 24, no. 1, pp. 107–116, 2009.
- [22] J. Vaquero and M. Zurita, "Functional recovery after severe CNS trauma: current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells," *Progress in Neurobiology*, vol. 93, no. 3, pp. 341–349, 2011.

- [23] D. M. Basso, M. S. Beattie, and J. C. Bresnahan, "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats," *Journal of Neurotrauma*, vol. 12, no. 1, pp. 1–21, 1995.
- [24] F. P. Guzen, J. G. Soares, L. M. De Freitas et al., "Sciatic nerve grafting and inoculation of FGF-2 promotes improvement of motor behavior and fiber regrowth in rats with spinal cord transection," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 30, no. 3, pp. 265–275, 2012.
- [25] M. Koda, T. Kamada, M. Hashimoto et al., "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*, vol. 16, no. 12, pp. 2206–2214, 2007.
- [26] R. J. Jaken, S. Van Gorp, E. A. Joosten et al., "Neuropathy-induced spinal GAP-43 expression is not a main player in the onset of mechanical pain hypersensitivity," *Journal of Neurotrauma*, vol. 28, no. 12, pp. 2463–2473, 2011.
- [27] Q. Yuan, B. Hu, H. Su, K.-F. So, Z. Lin, and W. Wu, "GAP-43 expression correlates with spinal motoneuron regeneration following root avulsion," *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury*, vol. 4, no. 1, pp. e103–e108, 2009.
- [28] D. Čížková, J. Rosocha, I. Vanický, S. Jergová, and M. Čížek, "Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 26, no. 7-8, pp. 1167–1180, 2006.
- [29] T. Kamada, M. Koda, M. Dezawa et al., "Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived Schwann cells reduces cystic cavity and promotes functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord," *Neuropathology*, vol. 31, no. 1, pp. 48–58, 2011.
- [30] S.-Q. Feng, X.-F. Zhou, R. A. Rush, and I. A. Ferguson, "Graft of pre-injured sural nerve promotes regeneration of corticospinal tract and functional recovery in rats with chronic spinal cord injury," *Brain Research*, vol. 1209, pp. 40–48, 2008.
- [31] S. Di Giovanni, A. de Biase, A. Yakovlev et al., "In vivo and in vitro characterization of novel neuronal plasticity factors identified following spinal cord injury," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 3, pp. 2084–2091, 2005.
- [32] S. A. Busch, K. P. Horn, F. X. Cuascut et al., "Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 1, pp. 255–265, 2010.
- [33] R. G. Almeida and D. A. Lyons, "On the resemblance of synapse formation and CNS myelination," *Neuroscience*, vol. 276, pp. 98–108, 2014.
- [34] X. Chen, Y. Yang, J. Yao et al., "Bone marrow stromal cells-loaded chitosan conduits promote repair of complete transection injury in rat spinal cord," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 22, no. 10, pp. 2347–2356, 2011.
- [35] Y. Akiyama, C. Radtke, and J. D. Kocsis, "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 15, pp. 6623–6630, 2002.
- [36] P. Dam-Hieu, S. Liu, T. Choudhri, G. Said, and M. Tadié, "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*, vol. 68, no. 3, pp. 293–304, 2002.
- [37] Y. Yoshida, H. Kataoka, T. Kanchiku et al., "Transection method for shortening the rat spine and spinal cord," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 384–388, 2013.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



Neural Regeneration Research

EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPEUTIC APPROACHES IN RATS WITH CHRONIC COMPLETE SPINAL CORD INJURY

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPEUTIC APPROACHES IN RATS WITH CHRONIC COMPLETE SPINAL CORD INJURY
Article Type:	Original Research
Section/Category:	Spinal Cord Injury and Neural Regeneration Research
Keywords:	Axonal regeneration, bone marrow stromal cells transplant, predegeneration peripheral nerve transplant, BBB Modified score, kinematic analysis and functional recovery.
Corresponding Author:	Israel Grijalva, PhD., M.D. Hospital de Especialidades Centro Medico Nacional Siglo XXI México City, México City MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hospital de Especialidades Centro Medico Nacional Siglo XXI
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Vinnitsa Buzoianu-Anguiano, M.S.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Vinnitsa Buzoianu-Anguiano, M.S. Jared Rivera-Osorio Sandra Orozco-Suarez Angelica Vega-García Angelica Zepeda Elisa Garcia-Vences, PhD Stephanie Sanchez-Torres, M.S. Ismael Jimenez-Estrada, PhD. Gabriel Guizar-Sahagun, PhD, M.D. Jose Mondragon-Caso Francisca Fernandez-Valverde, PhD Israel Grijalva, PhD., M.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Regenerative capability of the central nervous system is limited after spinal cord injury (SCI) due to intrinsic and extrinsic factors that inhibit, among other, axonal regrowth, resulting in deficient locomotor recovery. It has been shown that strategies such as pre-degenerated peripheral nerve grafts (PPN), the use of bone marrow stromal cells (BMSCs) or exogenous molecules such as chondroitinase ABC (ChABC), promote axonal growth and remyelination resulting in an improvement of locomotor function. These treatments have been primarily proven in acute injury models. In chronic injuries, there are just a few studies related to combined treatments improving locomotor function. The aim of the present study was to evaluate the ability of several single and combined treatments to modify the course of chronic complete SCI in rats. A full cord transection was performed at T9 level. One month later, animals were divided into 5 groups: injury only (control group), and injury plus spinal re-transection to create

	<p>a gap to accommodate BMSCs, PPN, PPN+BMSCs, and PPN+BMSCs+ChABC. In comparison to control and single-treatment groups (PPN and BMSCs), combined treatment groups (PPN+BMSCs, and PPN+BMSCs+ChABC) showed a significant axonal growth as revealed by an increase in GAP-43 and MAP-1B expression in axonal fibers, which correlated with the improvement in locomotor function. In conclusion, combined therapies tested here improve locomotor function by enhance axonal regeneration after chronic TSCI. Further studies are warranted to refine this promising line of research for clinical purposes.</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Ernesto Doncel Perez, PhD Hospital Nacional de Paraplejicos ernestod@sescam.iccm.es Dr. Ernesto Doncel is a specialist in axonal regeneration with the use of stem cells.</p> <p>Jerry Silver, PhD Case Western Reserve University School of Medicine jxs10@case.edu Dr. Silver is an expert of axonal regeneration with transplants of peripheral nerve.</p> <p>Julian Taylor, PhD Hospital Nacional de Paraplejicos jscott@sescam.org Dr. Taylor is an expert in an improvement of locomotion after spinal cord injury</p>

1
2
3
4 **EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPEUTIC APPROACHES IN RATS WITH**
5 **CHRONIC COMPLETE SPINAL CORD INJURY**
6

7 **Abstract:**
8

9
10 Regenerative capability of the central nervous system is limited after spinal cord
11 injury (SCI) due to intrinsic and extrinsic factors that inhibit, among other, axonal
12 regrowth, resulting in deficient locomotor recovery. It has been shown that
13 strategies such as pre-degenerated peripheral nerve grafts (PPN), the use of bone
14 marrow stromal cells (BMSCs) or exogenous molecules such as chondroitinase
15 ABC (ChABC), promote axonal growth and remyelination resulting in an
16 improvement of locomotor function. These treatments have been primarily proven
17 in acute injury models. In chronic injuries, there are just a few studies related to
18 combined treatments improving locomotor function. The aim of the present study
19 was to evaluate the ability of several single and combined treatments to modify the
20 course of chronic complete SCI in rats. A full cord transection was performed at T9
21 level. One month later, animals were divided into 5 groups: injury only (control
22 group), and injury plus spinal re-transection to create a gap to accommodate
23 BMSCs, PPN, PPN+BMSCs, and PPN+BMSCs+ChABC. In comparison to control
24 and single-treatment groups (PPN and BMSCs), combined treatment groups
25 (PPN+BMSCs, and PPN+BMSCs+ChABC) showed a significant axonal growth as
26 revealed by an increase in GAP-43 and MAP-1B expression in axonal fibers, which
27 correlated with the improvement in locomotor function. In conclusion, combined
28 therapies tested here improve locomotor function by enhance axonal regeneration
29 after chronic TSCI. Further studies are warranted to refine this promising line of
30 research for clinical purposes.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Introduction.**
5
6

7 Traumatic Spinal Cord Injury (TSCI) results in partial or complete motor, sensitive
8 and autonomic alterations. Despite the advances in biomedical research regarding
9 acute spinal cord injury, there is no effective treatment thus far for axonal
10 regeneration, or for functional restoration.
11
12
13
14
15
16

17
18 After events such as cellular death, inflammation, and excitotoxicity, triggered by
19 primary and secondary injury, the mechanisms underlying regeneration are limited
20 and insufficient as a result of an inhibitory environment due to a biochemical barrier
21 formed by molecules like myelin-associated proteins (Myelin-associated
22 glycoprotein MAG, NOGO-A, myelin glycoprotein associated to oligodendrocytes
23 OMgp) (Fang and Zheng Binhai, 2008; Liu et al., 2006); or proteins constitutive to
24 the extracellular matrix like semaphorins, ephrins, tenascins and proteoglycans,
25 specifically chondroitin sulfates (Ohtake and Li, 2015; Silver and Miller, 2004;
26 Thiede-Stan and Schwab, 2015). In addition, a physical barrier is which forms a
27 fibroglial scar composed of microglia, oligodendrocytes, meningeal cells, and
28 reactive astrocytes, inhibit axonal growth (Anderson et al., 2016; Mothe et al.,
29 2017).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Some of the current strategies developed for promoting axonal regeneration
49 comprise the use of RHO inhibitory drugs like Y27362 or Fasudil that promotes
50 axonal regeneration and improves locomotor function. (Chan et al., 2005; Fu et al.,
51 2016); the administration of trophic factors such as FGF-2 and BDNF (brain
52 derived neurotrophic factor) which enhance neural survival and axonal
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 regeneration (Kang et al., 2012; Ollivier-Lanvin et al., 2015); or the administration
5
6 of chondroitinase ABC which degrades chondroitin sulfates and therefore facilitates
7
8 axonal growth (D. Wang et al., 2011; Zhao and Fawcett, 2013). Tissue such as
9
10 fresh peripheral nerve (PNG) or pre-degenerated peripheral nerve (PPN), have
11
12 been used as grafts to repair injuries in the peripheral nervous system and have
13
14 shown to promote axonal regeneration and functional recovery (M.-P. Côté et al.,
15
16 2011). Biomaterials such as chitosone and polyethylene glycol have also been
17
18 shown to act as inherent grafts while Schwann cells and olfactory ensheathing
19
20 cells have a protective effect on nervous tissue. Bone marrow stromal cells
21
22 (BMSCs), which in the past decades have shown therapeutic and neuroprotective
23
24 effects in regenerative medicine promoted axonal regrowth and functional recovery
25
26 (Ankeny et al., 2004). If used independently the benefit of the above mentioned
27
28 strategies seems insufficient in order to be applied in patients. Therefore, research
29
30 should focus on the additive effect of combined therapies, which by themselves
31
32 have proven to be of use (Chen et al., 2011; DePaul et al., 2017; García-Alías et
33
34 al., 2011; Houle et al., 2006; Luo et al., 2009; Tom et al., 2010). In fact, in previous
35
36 studies we have shown that the combination of PPN and BMSCs increases axonal
37
38 regrowth and remyelination, resulting in an improvement in locomotor function in
39
40 rats with chronic transection spinal cord (Buzoianu-anguiano et al., 2015). Thus, in
41
42 the current study, we hypothesize that the combination of ChABC with PPN and
43
44 BMSCs transplant has a synergic effect on axonal regrowth, remyelination and
45
46 functional recovery in a transection complete model.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Methods:**
5

6
7 **Experimental Design:**
8
9

10 The present work was authorized by the Investigation and Ethics local committee
11 of the Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional Siglo XXI IMSS.
12
13 Animals were treated according to the official Mexican norm NOM-062. A total of
14
15 114 344-Fisher rats with ages ranging from 8-10 weeks and a weight between 200-
16
17 220g were used. For TSCI procedures and transplant, 58 female rats were
18
19 employed and randomly divided into 5 groups. 28 male rats were used as sciatic
20
21 nerve donors and 28 male rats were used for BMSCs procurement.
22
23
24
25

26
27 **Surgical Procedures and transplant preparation**
28
29

30 **Spinal Cord Injury.** In order to cause the spinal cord injury, rats were anesthetized
31
32 with an intramuscular injection of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). A
33
34 laminectomy in T9 was performed, subsequently the dorsal portion of the dural sac
35
36 was sectioned and the spinal cord was completely transected with microsurgery
37
38 scissors. Finally, the skin wound was sutured and the animal was returned to its
39
40 home cage.
41
42
43
44

45 **Peripheral nerve injury for transplant.** 21 days before transplant, donor rats
46
47 were anesthetized and subjected to total transversal section of the sciatic nerve in
48
49 the cephalic portion of the thigh; the caudal stump of the sectioned nerve was
50
51 united with a 7-0 nylon suture. On transplant day, rats were anesthetized in order
52
53 to extract distal sciatic nerve segments around 2cm from the section. The nerve
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 fragment was placed in ice-cold isotonic saline solution until transplantation was
5
6 performed.
7
8

9 **Bone Marrow Stromal Cell extraction.** BMSCs were obtained from euthanized
10 (sodic pentobarbital overdose) donor rats. Bone marrow was obtained by washing
11 with growing medium (Dulbecco's Modified Eagle D-MEM® GIBCO) of both femurs
12 and tibia with a 3ml syringe; and was centrifuged for 7 minutes at 1300 rpm. The
13
14 BMSCs were separated by centrifugation at 2000rpm at 24°C for 45 min with Ficol
15 gradient (SIGMA) (3ml). Obtained cells were seeded in a culture flask of 75cm²
16 with 10ml of D-MEM, 20% bovine serum (FSB, GIBCO), 2ml L-glutamine (GIBCO),
17 2ml antibiotic-antimycotic (GIBCO), and 2ml of non-essential amino acids
18 (GIBCO). Cells were then placed in a Water-jacketed incubator at 37°C with 5%
19 CO₂, for (time) until cells formed a monolayer of fibroblasts. After time, another
20 layer of BMSC on top of the fibroblasts was seeded and cultures were kept for 4
21 weeks until they became mature.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Transplant.** 4 weeks after spinal cord transection, rats were assigned to one of
40 the five experimental groups. In Group 1 (control, n=14), the surgical wound was
41 reopened and the dural sac was exposed. In Group 2 (n=14), the dural sac was
42 reopened in order to carefully remove the scar leaving a 6mm hole approximately.
43
44 Next, 2 injections of 5µl each of DMEM medium (GIBCO) containing 3X10⁴ BMSCs
45 were performed parasagittally on each side of the spinal cord with a 2mm depth
46 either rostral and caudal to the edge of each stump. In Group 3 (n=14), the surgical
47 procedure was equally performed in the same manner but 3 to 5 longitudinal pre-
48 degenerated peripheral nerve segments, each with a 6mm length, were
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 transplanted in the resulting spinal cord hole.,. The implants were fixed with fibrin
5
6 glue (BAXTER). In Group 4 (n=14), treatments for groups 2 and 3 were combined;
7
8 whereas in group 5, two BMSCs injections were administered in the rostral and
9
10 caudal zone, adding 6 μ l of ChABC (2 units/ml Seikagaku 100332 of Cape Cod);
11
12 injecting a total volume of 11 μ l; the space was filled with 3-5 PPN fragments fixed
13
14 with fibrin glue.
15
16
17
18

19 **Evaluation of locomotor function.** Hindlimb locomotion was assessed by the
20
21 modified BBB score for complete transaction: 22 points in 4 levels were evaluated
22
23 focusing on rhythmicity, movement alternation with or without body weight and
24
25 plantar support (Antri et al., 2002). Animals were evaluated 24 hours after injury
26
27 and weekly for the following 13 weeks. Experimenters were blind to recorded
28
29 groups.
30
31
32

33 **Kinematic analysis of movement:** Kinematic registration of the gait was
34
35 performed after 3 months of treatment. First, hindlimbs were marked with a
36
37 nontoxic pulmonary marker (Sharpie®) on the iliac crest, hip, knee, ankle, and five
38
39 metatarsal phalangeal joints. Afterwards, each animal was introduced separately in
40
41 a passageway acrylic tunnel (60X5X5cm), the passageway was marked every
42
43 5cm, in which a video was recorded with a commercial digital video camera. Four
44
45 consecutive strides (the first stride was not considered in order to exclude de initial
46
47 phase of the gait) were analysed. With the help of computer software (Total Video
48
49 Converter), digital photographs were obtained from each recording frame
50
51 (30frames/second). The Cartesian coordinates of each joint were determined from
52
53 each photograph by using Image J (NIH) software (Version 1.30). The registered
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 coordinates were converted from pixels to centimeters based on the reference
5
6 marks (5cm) placed in the passageway.
7
8

9
10 The values in centimeters were introduced in a software platform designed by
11
12 CINESTAV- IPN, which associates joints defined by Cartesian coordinates,
13
14 drawing all the resulting lines of the movement executed by the animal's limbs
15
16 during gait and allows appreciating the movement sequence of the extremities
17
18 during walking.
19
20

21
22 **Sample processing for immunofluorescence.** 13 weeks after treatment, animals
23
24 were euthanized with sodic pentobarbital IP 40mg/kg and intracardially perfused
25
26 with 0.9% NaCl followed by 4% paraformaldehyde. A 2 cm segment of the spinal
27
28 cord, which included the injury treatment epicenter, was obtained. Tissues were
29
30 placed in PBS with 30% sucrose for 24 hours. Afterwards, 20 μ m thick serial
31
32 sagittal sections were obtained with a LEICA cryostat. Sections were washed in
33
34 PBS and were then blocked with normal bovine serum (Vector Lab) (1:200 in PBS)
35
36 for 30 minutes. Anti-microtubule-associated protein 1B (MAP1-B (C-20), goat
37
38 polyclonal IgG, Catalogue sc-8971 Santa Cruz Biotech.), anti-growth associated
39
40 protein 43 (GAP-43 (H-100) rabbit polyclonal IgG, Catalogue sc-1779) and anti-
41
42 glial fibrillary acidic protein (GFAP (H-50) rabbit polyclonal IgG, Catalogue sc-
43
44 65343) for 48 hours at 4°C. Samples were washed with PBS and incubated with
45
46 the secondary antibody (Alexa 488 Anti-rabbit or Anti-goat, Molecular Probes
47
48 Invitrogen, Catalogue, A 11008) for 2 hours; finally, they were washed once more
49
50 with PBS, contrasted with Hoechst (dilution of 5 μ l/5ml PBS; Molecular Probes, Life
51
52 Technologies) for 3 min, and covered with Vectashield (Vector Lab) and a cover
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 glass. Images were acquired on a Nikon Ti Eclipse inverted confocal microscope
5
6 equipped with an A1 imaging system, both controlled from the proprietary software
7
8 NIS Elements v.4.5.0. Imaging was performed using either a 20X (Dry, NA 0.8) or
9
10 60X (Oil immersion, NA 1.4) objective lens. Dyes were excited in a sequential
11
12 mode using the Built-in lasers lines 403 nm (Hoechst), 488 nm (Alexa 488), and
13
14 563 nm (Alexa 546). The corresponding fluorescence was read in the following
15
16 ranges: 425-475 nm (Hoechst 33342), 500 - 550 nm (Alexa fluor 488), and 570 -
17
18 620 nm (Alexa fluor 546), using the manufacturer-provided filter sets. The images
19
20 were acquired and analyzed using NIS elements V.4.50. From each section, 6
21
22 images were acquired comprising the epicenter, as well as rostral and caudal
23
24 zones to the transplant. With FIJI-Image J software the intensity of green channel
25
26 pixels corresponding to the Alexa 488 per area, was quantified. The calibration of
27
28 the intensity by area was obtained by a spatial scale, from the intensities values
29
30 contained with the Image's bitmap (image that gives the Software) to establish the
31
32 intensity basal values of each image, the density is the same as the intensity per
33
34 area which was determined in relation to the control groups and expressed as
35
36 pixels/mm², the counting area adjust to 1mm².
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Analysis of axonal regeneration through neurotracers:** 3 months after
49
50 transplant, one anterograde neurotracer in the brain and one in the spinal cord
51
52 were injected into 2 animals from each group. Animals underwent stereotactic
53
54 surgery under ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10mg/kg) anesthesia. A
55
56 longitudinal incision was performed in the brain to identify bregma, and the skull
57
58 was drilled following coordinates: (-1.2) anteroposterior, lateral right (-2mm) and
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 lateral left (+2mm) according to Bregma. The tracer was injected through a micro-
5 injector (Kd Scientific 310-plus), connecting a Hamilton syringe adapted with a
6 microdialysis tube. The tip of the syringe was placed on the surface brain and
7 introduced 2mm in the drilled canal. Two μl mini-ruby dextran
8 tetramethylrhodamine (Molecular Probes Life Technologies, Catalogue D3312),
9 were injected, with a speed of $0.5\mu\text{l}/\text{min}$ on each side, and the skin was sutured
10 before returning the animal to its home cage. Afterwards, a laminectomy was
11 performed at the level of thoracic 12 (T12) in order to inject mini emerald dextran
12 fluorescein trace (Molecular Probes Life Technologies, Catalogue). As laminectomy
13 was finished, a longitudinal cut in order to expose the spinal cord was made.
14 Animals were placed in the stereotactic once again, and the vertebral column was
15 secured. A microinjection was placed on the surface of the spinal cord near to the
16 central artery, the syringe was inserted 1mm deep and a total volume of $1\mu\text{l}$ of the
17 solution was delivered at a speed of $0.01\mu\text{l}/\text{minute}$. The skin was sutured and the
18 animal was returned to its home cage. After 3 weeks, animals were intracardially
19 perfused with 0.9% NaCl followed by 4% paraformaldehyde.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Twenty μm longitudinal floating sections were obtained in a cryostat. After
45 collection, sections were contrasted with Hoechst (dilution of $5\mu\text{l}/5\text{ml}$ de PBS;
46 Molecular Probes) and mounted with Vectashield. The tissue was analyzed with a
47 confocal microscope in order to identify the neurotracers, which made it possible to
48 observe the stained axons.
49
50
51
52
53
54
55
56

57 **Statistical Analysis.** Graph Pad Prism 6.0 was used for the descriptive analysis
58 considering measures of key trend and dispersion. Non-parametric ANOVA tests
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 with Kruskal Wallis were conducted for the inferential analysis so as to determine
5
6 the difference among groups. Post-hoc U Mann-Whitney tests were performed in
7
8 order to identify the differences between groups. Two-way ANOVA was applied to
9
10 analyze behavioral data with repeated measures and a Tukey post-hoc test was
11
12 performed in order to identify the differences between groups. A parametric
13
14 ANOVA was used for the kinematics; and the comparison between groups was
15
16 performed with Tukey. A significance level of $p < 0.05$ was set for all analyses.
17
18
19
20

21 **Results**

22 **Axonal Growth**

23
24
25 In order to evaluate axonal growth, GAP43 was analyzed. GAP-43 expression was
26
27 observed in the groups with one single treatment (BMSCs or PPN). In comparison
28
29 to the control group, where fibers were scarce and disorganized (Fig 1 B, G, L, C,
30
31 H, M) both treatment groups showed a larger quantity of immunoreactive fibers.
32
33 Combined treatment groups (PPN+BMSCs and PPN+BMSCs+ChABC) showed
34
35 significantly more immunoreactive fibers rostrally and caudally to the transplant
36
37 zone. Fibers for the latter groups were better organized and with a higher caliber
38
39 compared to those of single- treatment groups (Fig 1 D, I, N, E, J, O). Regarding
40
41 MAP-1B (Figure 2), the same tendency was observed: greater quantity of positive
42
43 immunoreactive fibers and a better organization in the combined-treatment groups
44
45 compared to the single-treatment groups (Fig 2 D, I, N, E, J, O). Furthermore, all
46
47 groups treated with BMSC, regardless of cells being used in a single or in a
48
49 combined treatment, showed the presence of immunoreactive cells positive for
50
51 GFAP and MAP-1B (Fig 3 A-D). These cells displayed a glial star-shape like
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 morphology with long ramifications (Fig 3 E). They were observed around the
5
6 BMSCs injection (rostral and caudal). In the groups that did not receive BMSCs
7
8 transplant none of these cells were to be seen.
9

10 11 **Quantification of fluorescence density for GAP-43 and MAP-1B**

12
13
14
15 Fluorescence density for GAP-43 is shown in figure 1 (P, Q, and R), in rostral,
16
17 epicentral and caudal zone. All single treatment groups and combined treatment
18
19 groups had a significant difference when compared to the control group. ($p < 0.001$).
20
21 When comparing GAP-43 expression between single treatment and combined
22
23 treatment groups, a significant increase was found ($p < 0.05$) in all analyzed zones.
24
25 Regarding MAP-1B expression (Figure 2 P, Q, and R), signal intensity was very
26
27 similar to the one described for GAP-43: the single treatments and combined
28
29 treatment groups had a significantly greater expression than the control group
30
31 ($p < 0.001$), and the in the combined treatment groups expression was significantly
32
33 higher than in single treatment groups ($p < 0.05$).
34
35
36
37
38
39
40

41 **Axonal regeneration**

42
43
44 The use of neurotracers in treated groups with PPN as a graft, showed fibers
45
46 marked with ruby red (Fluoro mini-ruby dextran, tetramethylrhodamine) belonging
47
48 to the motor area, and green emerald fibers (Fluoro emerald dextran fluorescein)
49
50 coming from the lumbar area, as well as rostral zone, PPN implant, and caudal
51
52 zone. Adding to this, positive fibers for both tracers are increased in combined
53
54 treatment groups (Fig 4).
55
56
57
58

59 **Locomotor function**

60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 The evaluation of locomotor function with the modified BBB scale (Antri et al.,
5
6 2002) demonstrated that from the third week, all treatment groups scored
7
8 significantly higher than the control group ($p < 0.0001$; Fig. 5 A). From the fifth week
9
10 and onwards, combined treatment groups showed a significantly higher score
11
12 when compared to the single treatment group ($p < 0.0001$). Remarkably, in the
13
14 eighth week, combined treatment groups showed frequent rhythmic movements in
15
16 both hindlimbs.
17
18
19
20
21

22 Moreover, the kinematic analysis of the march revealed an increase in the
23
24 amplitude of movements in the groups with PPN grafts and combined treatments
25
26 with a significant difference in comparison to control group and BMSCs ($p < 0.0001$)
27
28 (Fig 5 B). The increase in the amplitude of movements was shown in the hip and
29
30 knees, shown more marked and constant traces (Fig 6 A y B).
31
32
33
34

35 In conclusion, our work shows that simple-treatments like PPN and BMSCs
36
37 discretely enhance
38
39
40

41 **Discussion**

42
43

44 Aiming to promote neural regeneration after TSCI, the experimental strategies for
45
46 the acute phase have been cell and tissue transplants (i.e. embryonic stem cells,
47
48 mesenchymal cells, peripheral nerve), administration of exogenous substances like
49
50 ChABC, Anti-Nogo 66, growth factors, implants of biomaterials like chitosan,
51
52 polymers and drugs (Fasudil, C3), among others which promote axonal regrowth
53
54 and improve locomotor function (Kabu et al., 2015; McCall Julianne, 2013; Smith
55
56 George M, 2009). Even though there are few reports regarding treatments in the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 chronic phase, the same strategies have been employed (Lu et al., 2007; Tom and
5
6 Houle, 2015; Difei Wang et al., 2011). Despite the positive structural and
7
8 functional results obtained by single treatments, they seem to be limited, thus their
9
10 combination has been suggested in order to improve their already known positive
11
12 effects (Dalamagkas et al., 2018; Kabu et al., 2015; Tsintou et al., 2015). In the
13
14 present study, it was shown that by using combined treatments, axonal regrowth
15
16 and axonal regeneration, as well as locomotor function recovery increase in
17
18 comparison to single treatment.
19
20
21
22
23

24 **Effects on axonal regrowth and regeneration**

25
26
27 The present study shows an increase in GAP-43 and MAP-1B protein expression,
28
29 which when activated act as a guide for axonal growth (Denny, 2006; Mohan and
30
31 John, 2015; Mosevitsky, 2005; Storer, 2003). In an acute phase, PPN implant
32
33 promotes axonal regrowth; this was demonstrated by Tom et al., (2013) in a
34
35 hemisection model and by Pierdona et al., (2012) and Côte et al., (2011) in a acute
36
37 transection model, as well as by Buzoianu et al., (2015) in a chronic transection
38
39 model, where regenerated axons are able to cross the interphase in both sites of
40
41 the transplant (Buzoianu-Anguiano et al., 2015; M. Côté et al., 2011; Pierdoná
42
43 Guzen Fausto et al., 2012; Tom et al., 2013). Schwann cells and macrophages
44
45 present in the PPN promotes a permissive microenvironment for axonal growth,
46
47 secreting growth factors such as: GDNF, BDNF, NGF, NT-3, NT-4, GM-CS
48
49 (Bozkurt et al., 2009; Höke et al., 2002; Michalski et al., 2008). Besides forming
50
51 Bügner bands, they also form a support for axonal growth (Ribeiro-Resende et al.,
52
53 2009; Tom and Houle, 2015; Zhang et al., 1995, 1995).
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 It is widely known that BMSCs are capable of building a niche inside the host
5 tissue; in which growth factors like NT-3, BDNF, GDNF, NGF and molecules for
6 axonal guidance (netrin-4 and reticulon-4) are secreted, promoting a permeable
7 environment for axonal growth (Maltman et al., 2011; Shichinohe et al., 2008; Zeng
8 et al., 2016).

9
10
11
12
13
14
15
16
17 Li et al., (2009) proved that BMSCs promote the formation of extensions that serve
18 as structural support, which enhance axonal growth (Li et al., 2009). Okuda et al.,
19 (2016) and Stewart et al., (2017) described that BMSCs transplant benefits axonal
20 regrowth in the acute phase of transection spinal cord (Okuda et al., 2016; Stewart
21 et al., 2017). Moreover, Lu et al., (2007) had similar results regarding axonal
22 growth in a transection chronic model, as was also obtained in the present study,
23 where BMSCs were differentiated to GFAP+ glial cells like (BMSCs formed long
24 extensions that could possibly support and guide axons for their growth).

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37 Similarly to our results, Kuo et al., (2011), as well as Côte et al., (2011) showed
38 that by combining PPN + FGF α , PPN + ChABC, a favorable environment was
39 achieved, promoting more axonal growth than single treatment. Moreover, Tom et
40 al., (2013) and Buzoianu et al., (2015) results are similar as the ones mentioned
41 above combining PPN+ChABC or PPN+BDNF, and PPN+BMSC (Buzoianu-
42 Anguiano et al., 2015; M. Côté et al., 2011; Kuo et al., 2011)(Buzoianu-Anguiano et
43 al., 2015; M. Côté et al., 2011; Kuo et al., 2011). In addition, Buzoianu et al.,(2015)
44 showed that the combination of PPN+BMSCs preserved better the host tissue, and
45 a greater number of axons penetrating into the preserved spinal cord (Buzoianu-
46 Anguiano et al., 2015).

1
2
3
4 Furthermore, Chen et al.,(2011) and Luo et al., (2009) observed that the
5
6 combination of BMSCs+Chitosan and BMSCs+G-CSF had better regeneration
7
8 outcomes in the acute phase of transection model than single treatment (Chen et
9
10 al., 2011; Luo et al., 2009). We do not know about studies regarding the use of
11
12 BMSCs in transection chronic phases.
13
14

15
16
17 In other hand, García et al., (2011) proved that the combination of ChABC+NT3 in
18
19 an acute transection model increased axonal regrowth when compared with single
20
21 treatment groups (García-Alías et al., 2011). Wang et al., (2011) had similar
22
23 results for the chronic phase with an injection of ChABC accompanied by
24
25 rehabilitation (ChABC inhibits the formation of chondroitin sulfate, hence, leading
26
27 to axonal regrowth) (Difei Wang et al., 2011).
28
29

30
31
32 Most of the treatments (García-Alías et al., 2011)regarding this research branch
33
34 use two combined treatments. To our knowledge, only a study conducted by Paul
35
36 et al., (2015) combined three treatments (PPN+ChABC+FGF α) in an acute phase
37
38 transection model. As a result of it, a greater axonal growth was reported; even
39
40 greater than 2 or one treatment options (DePaul et al., 2015), as it was seen in the
41
42 present work.
43
44

45
46
47 The best model to evaluate axonal regeneration after TSCI is complete transection,
48
49 and neurotracers are an important tool to prove it. This was demonstrated by Houle
50
51 et al., (2006), and Tom et al., (2013) in acute phase of hemisection, using PPN as
52
53 bridge. Additionally, Tom et al., (2013) showed that PPN+ChABC treatment had
54
55 higher number of fibers crossing the transplantation zone (Houle et al., 2006; Tom
56
57 et al., 2013). Similarly, in the present study both ascending and descending fibers
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 break through the transplantation zone in the groups where a PPN graft was used,
5
6 reaching higher number of labeling axons in combined groups.
7
8

9
10 **Effects on locomotor function improvement.**

11
12 Finally, if axonal regeneration is increased in combined treatments, it is expected
13
14 to observe increasing functional recovery through locomotion tests. Even though,
15
16 standard BBB is a universally used scale, mainly for partial spinal cord injuries, it is
17
18 not enough to evaluate transection spinal cord injury model. The latter, given it is
19
20 not considered the probability of recovery of endogenous movements below the
21
22 lesion. In the present study a specific BBB modified for a transection model was
23
24 employed (Antri et al., 2002; Basso et al., 1995). Besides, the use of other
25
26 evaluation forms, as the kinematic analysis of movement is always desirable
27
28 (Rossignol and Frigon, 2011).
29
30
31
32

33
34
35 In the acute phase of hemisection models, Lee et al.,(2002), Houle et al., (2006),
36
37 and Li et al., (2012), showed that PPN treatment by itself promotes locomotor
38
39 function recovery, with an average score of 4-5 points in the standard BBB (Houle
40
41 et al., 2006; Lee et al., 2002; Li et al., 2012). Similarly, in the chronic phase,
42
43 Buzoianu et al., (2015) showed an increase of 6 points in the standard BBB using
44
45 PPN to (Buzoianu-Anguiano et al., 2015). In the present work, animals with PPN
46
47 treatment improved on average 4 points in modified BBB (equivalent to 6 points in
48
49 standard BBB), showing rhythmic and occasional movements.
50
51
52

53
54
55 On the other hand, in acute transection model, Kohama et al., (2013), Luo et al.,
56
57 (2009), and Chen et al., (2011) proved that single treatment with BMSCs promotes
58
59 locomotor recovery with an average of 5 points in the standard BBB score. (Chen
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 et al., 2011; Luo et al., 2009; Misaki Aizawa-Kohama et al., 2013). There are no
5
6 articles regarding chronic transection spinal cord injury model and BMSCs
7
8 transplantation. Anyway, in the present work, animals with BMSCs transplantation
9
10 reached an average of 3 points in the modified BBB (equivalent to 5 points on
11
12 standard BBB score) with occasional movements.
13
14

15
16
17 In this article, as well as in previous ones, the functional effect is potentiated by
18
19 combined treatments. Lee et al., (2002), Houle et al., (2006) showed that the
20
21 combination of PPN+FGF α and PPN+ChABC increased locomotor function
22
23 improvement by an average of 9 points of standard BBB score in the acute phase
24
25 of transection model (Houle et al., 2006; Lee et al., 2002). Buzoianu et al., (2015)
26
27 observed an improvement of 7 points of standard BBB score in a chronic
28
29 transection model (Buzoianu-Anguiano et al., 2015). In addition, Chen et al., (2011)
30
31 and Luo et al., (2009) found that a combination of BMSCs+Chitosan and BMSCs +
32
33 G-CSF respectively, resulted in an increase of 8 points on average in standard
34
35 BBB score (Chen et al., 2011; Luo et al., 2009).
36
37
38
39
40

41
42 Moreover, García-Álías et al., (2011), by combining ChABC+NT-3 in the acute
43
44 phase of a transection model achieved an improvement of 8 points on average
45
46 (García-Álías et al., 2011). Similar to this but in chronic transection model,
47
48 combinations of PPN+BMSCs or PPN+BMSCs+ChABC induced an improvement
49
50 of 6 points in the modified BBB score (which is equal to 9 points in the standard
51
52 BBB score) with rhythmical and frequent movements.
53
54
55
56

57
58 Furthermore, in the present study kinematics analysis of locomotion was used as
59
60 more accurate functional test, which analyzes the amplitude of angles of the hips,
61
62
63
64
65

1
2
3
4 knees or ankles; the velocity, time and stride length, and the amplitude of the
5
6 pendular movement of the stride. Compared to animals without injury, in this work,
7
8 we found 10% and 30% of stride amplitude recovery in single and combined
9
10 treatments respectively, including frequent and constant movement primarily in hip
11
12 and knees in last groups.
13
14

15
16 Functional recovery after TSCI according to Ginger et al.,(2010), is explained by:
17
18 1) long distance regeneration, 2) short distance regeneration, and 3) preserved
19
20 axonal growth (Giger et al., 2010). Therefore, it is strongly believed that PPN
21
22 serves as a bridge that promotes long-distance axonal regeneration, where axons
23
24 arrive at the interphase zone and BMSCs and activate axonal guidance molecules,
25
26 which help axons to grow within the spinal cord, connecting with preserved axons;
27
28 hence, generating functional connections and consequently improving locomotor
29
30 function.
31
32
33
34

35
36 In conclusion, our work shows that simple-treatments like PPN and BMSCs
37
38 discretely enhance axonal regrowth, axonal regeneration, and locomotor function,
39
40 while, by combining treatments (PPN+BMSCs and PPN+BMSCs+ChABC) a
41
42 significant enhancement of axonal growth, axonal regeneration, and a modest
43
44 recovery of locomotion was observed. Thus, combination treatments are strongly
45
46 suggested as an alternative therapy in pre-clinical trials.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **References.**
5
6

- 7 1. Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R.,
8 Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., Sofroniew, M. V., 2016. Astrocyte
9 scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 000,
10 1–20. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
11
12
13
14
15
16 2. Ankeny, D.P., McTigue, D.M., Jakeman, L.B., 2004. Bone marrow
17 transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after
18 contusive spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 190, 17–31.
19 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.045>
20
21
22
23
24
25
26 3. Antri, M., Orsal, D., Barthe, J., Pierre, Â., Curie, M., 2002. Locomotor
27 recovery in the chronic spinal rat : effects of long-term treatment with a 5-HT
28 2 agonist. *Eur. J. Neurosci.* 16, 467–476. [https://doi.org/10.1046/j.1460-](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x)
29
30
31
32
33
34
35
36 4. Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable
37 locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1–
38
39
40
41
42
43
44 5. Bozkurt, A., Deumens, R., Beckmann, C., Olde Damink, L., Schügner, F.,
45 Heschel, I., Sellhaus, B., Weis, J., Jahnen-Dechent, W., Brook, G.A., Pallua,
46 N., 2009. In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched
47 microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels.
48 *Biomaterials* 30, 169–179.
49 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.017>
50
51
52
53
54
55
56
57
58 6. Buzoianu-anguiano, V., Orozco-suárez, S., García-vences, E., Caballero-
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 chacón, S., Guizar-sahagún, G., Chavez-sanchez, L., Grijalva, I., 2015. The
5
6 Morphofunctional Effect of the Transplantation of Bone Marrow Stromal
7
8 Cells and Predegenerated Peripheral Nerve in Chronic Paraplegic Rat
9
10 Model via Spinal Cord Transection. *Neural Plast.* 2015, 12.
11
12 <https://doi.org/10.1155/2015/389520>
13
14

15
16 7. Chan, C.C.M., Khodarahmi, K., Liu, J., Sutherland, D., Oschipok, L.W.,
17
18 Steeves, J.D., Tetzlaff, W., 2005. Dose-dependent beneficial and
19
20 detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and
21
22 functional recovery after rat spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 196, 352–364.
23
24 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.011>
25
26

27
28 8. Chen, X., Yang, Y., Yao, J., Lin, W., Li, Y., Chen, Y., Gao, Y., Yang, Y., Gu,
29
30 X., Wang, X., 2011. Bone marrow stromal cells-loaded chitosan conduits
31
32 promote repair of complete transection injury in rat spinal cord. *J. Mater. Sci.*
33
34 *Mater. Med.* 22, 2347–2356. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4401-9>
35
36

37
38 9. Côté, M.-P., Amin, A.A., Tom, V.J., Houle, J.D., 2011. Peripheral nerve
39
40 grafts support regeneration after spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8,
41
42 294–303. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0024-6>
43
44

45
46 10. Côté, M., Ph, D., Hanna, A., Lemay, M.A., Ollivier-, K., Santi, L., Miller, K.,
47
48 Monaghan, R., Houlé, J.D., 2011. Peripheral nerve grafts after cervical
49
50 spinal cord injury in adult cats. *Exp. Neurol.* 225, 173–182.
51
52 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.06.011>.Peripheral
53
54

55
56 11. Dalamagkas, K., Tsintou, M., Seifalian, A., Seifalian, A.M., 2018.
57
58 Translational Regenerative Therapies for Chronic Spinal Cord Injury. *Int. J.*
59
60 *Mol. Sci.* 19, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19061776>
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 12.Denny, J.B., 2006. Molecular mechanisms, biological actions, and
5
6 neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr.*
7
8 *Neuropharmacol.* 4, 293–304.
9
- 10
11 13.DePaul, M.A., Lin, C.-Y., Silver, J., Lee, Y.-S., 2017. Combinatory repair
12
13 strategy to promote axon regeneration and functional recovery after chronic
14
15 spinal cord injury. *Sci. Rep.* 7, 9018. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09432-6)
16
17 09432-6
18
19
- 20
21 14.DePaul, M.A., Lin, C.Y., Silver, J., Lee, Y.S., 2015. Peripheral nerve
22
23 transplantation combined with acidic fibroblast growth factor and
24
25 chondroitinase induces regeneration and improves urinary function in
26
27 complete spinal cord transected adult mice. *PLoS One* 10, 1–16.
28
29 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139335>
30
31
- 32
33 15.Fang, X., Zheng Binhai, 2008. White matter inhibitors in CNS axon
34
35 regeneration failure Fang. *October* 141, 520–529.
36
37 <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.Use
38
39
- 40
41 16.Fu, P. cai, Tang, R. hua, Wan, Y., Xie, M. jie, Wang, W., Luo, X., Yu, Z.
42
43 yuan, 2016. ROCK inhibition with fasudil promotes early functional recovery
44
45 of spinal cord injury in rats by enhancing microglia phagocytosis. *J.*
46
47 *Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* 36, 31–36.
48
49 <https://doi.org/10.1007/s11596-016-1537-3>
50
51
- 52
53 17.García-Álías, G., Petrosyan, H. a, Schnell, L., Horner, P.J., Bowers, W.J.,
54
55 Mendell, L.M., Fawcett, J.W., Arvanian, V.L., 2011. Chondroitinase ABC
56
57 combined with neurotrophin NT-3 secretion and NR2D expression promotes
58
59 axonal plasticity and functional recovery in rats with lateral hemisection of
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 the spinal cord. *J. Neurosci.* 31, 17788–99.
5
6 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4308-11.2011>
7
8
9 18. Giger, R.J., Hollis, E.R., Tuszynski, M.H., 2010. Guidance molecules in
10 axon regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001867.
11
12 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001867>
13
14
15
16 19. Höke, A., Gordon, T., Zochodne, D.W., Sulaiman, O.A.R., 2002. A decline in
17 glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with
18 impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp.*
19 *Neurol.* 173, 77–85. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7826>
20
21
22
23
24
25
26 20. Houle, J.D., Tom, V.J., Mayes, D., Wagoner, G., Phillips, N., Silver, J., 2006.
27 Combining an autologous peripheral nervous system “bridge” and matrix
28 modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration
29 beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 26,
30 7405–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1166-06.2006>
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 21. Kabu, S., Gao, Y., Kwon, B.K., Labhasetwar, V., 2015. Drug delivery, cell-
42 based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *J.*
43 *Control. Release* 219, 141–154.
44
45
46 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.060>
47
48
49
50
51 22. Kang, C.E., Baumann, M.D., Tator, C.H., Shoichet, M.S., 2012. Localized
52 and sustained delivery of fibroblast growth factor-2 from a nanoparticle-
53 hydrogel composite for treatment of spinal cord injury. *Cells Tissues Organs*
54 197, 55–63. <https://doi.org/10.1159/000339589>
55
56
57
58
59
60 23. Kuo, H.-S., Tsai, M.-J., Huang, M.-C., Chiu, C.-W., Tsai, C.-Y., Lee, M.-J.,
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Huang, W.-C., Lin, Y.-L., Kuo, W.-C., Cheng, H., 2011. Acid Fibroblast
5 Growth Factor and Peripheral Nerve Grafts Regulate Th2 Cytokine
6 Expression, Macrophage Activation, Polyamine Synthesis, and Neurotrophin
7 Expression in Transected Rat Spinal Cords. *J. Neurosci.* 31, 4137–4147.
8
9 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2592-10.2011>
10

11
12
13
14
15
16 24. Lee, Y.-S., Hsiao, I., Lin, V.W., 2002. Peripheral nerve grafts and aFGF
17 restore partial hindlimb function in adult paraplegic rats. *J. Neurotrauma* 19,
18 1203–16. <https://doi.org/10.1089/08977150260338001>
19
20
21

22
23
24 25. Li, C., Zhang, X., Cao, R., Yu, B., Liang, H., Zhou, M., Li, D., Wang, Y., Liu,
25 E., 2012. Allografts of the acellular sciatic nerve and brain-derived
26 neurotrophic factor repair spinal cord injury in adult rats. *PLoS One* 7,
27 e42813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042813>
28
29
30

31
32
33 26. Li, Q. ming, Fu, Y. ming, Shan, Z. yan, Shen, J. ling, Zhang, X. mei, Lei, L.,
34 Jin, L. hong, 2009. MSCs guide neurite directional extension and promote
35 oligodendrogenesis in NSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 372–
36 377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.147>
37
38
39
40

41
42
43 27. Liu, B.P., Cafferty, W.B.J., Budel, S.O., Strittmatter, S.M., 2006.
44 Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous
45 system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1593–1610.
46
47
48
49
50
51 <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1891>
52

53
54 28. Lu, P., Jones, L.L., Tuszynski, M.H., 2007. Axon regeneration through scars
55 and into sites of chronic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 203, 8–21.
56
57
58
59 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.030>
60

61
62 29. Luo, J., Zhang, H., Jiang, X., Xue, S., Ke, Y., 2009. Combination of bone
63
64
65

1
2
3
4 marrow stromal cell transplantation with mobilization by granulocyte-colony
5
6 stimulating factor promotes functional recovery after spinal cord transection.
7
8 Acta Neurochir. (Wien). 151, 1483–1492. [https://doi.org/10.1007/s00701-](https://doi.org/10.1007/s00701-009-0402-6)
9
10 009-0402-6
11
12

13
14 30. Maltman, D.J., Hardy, S.A., Przyborski, S.A., 2011. Role of mesenchymal
15
16 stem cells in neurogenesis and nervous system repair. Neurochem. Int. 59,
17
18 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.06.008>
19
20

21 31. McCall Julianne, W.N. and B.A., 2013. Neurotrophic factors in combinatorial
22
23 approaches for spinal cord regeneration. Cell Tissue Res. 349, 27–37.
24
25 <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1388-6>. NEUROTROPHIC
26
27

28 32. Michalski, B., Bain, J.R., Fahnestock, M., 2008. Long-term changes in
29
30 neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation
31
32 and reinnervation with motor or sensory nerve. J. Neurochem. 105, 1244–
33
34 1252. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05224.x>
35
36
37

38 33. Misaki Aizawa-Kohama, Toshiki Endo, Masaaki Kitada, Shohei Wakao,
39
40 Akira Sumiyoshi, Dai Matsuse, Yasumasa Kuroda, Takahiro Morita, Jorge J.
41
42 Riera, Ryuta Kawashima, Teiji Tominaga, and M.D., 2013. Transplantation
43
44 of Bone Marrow Stromal Cell-Derived Neural Precursor Cells Ameliorates
45
46 Deficits in a Rat Model of Complete Spinal Cord Transection. Cell
47
48 Transplant. 22, 1613–1625.
49
50
51

52 34. Mohan, R., John, A., 2015. Microtubule-associated proteins as direct
53
54 crosslinkers of actin filaments and microtubules. IUBMB Life 67, 395–403.
55
56 <https://doi.org/10.1002/iub.1384>
57
58

59 35. Mosevitsky, M.I., 2005. Nerve Ending “Signal” Proteins GAP-43, MARCKS,
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 and BASP1. pp. 245–325. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)45007-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45007-X)

5
6
7 36. Mothe, A.J., Tassew, N.G., Shabanzadeh, A.P., Penheiro, R., Vigouroux,
8 R.J., Huang, L., Grinnell, C., Cui, Y.F., Fung, E., Monnier, P.P., Mueller,
9 B.K., Tator, C.H., 2017. RGMA inhibition with human monoclonal antibodies
10 promotes regeneration, plasticity and repair, and attenuates neuropathic
11 pain after spinal cord injury. *Sci. Rep.* 7, 1–18.
12 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10987-7>
13
14

15
16
17
18
19 37. Ohtake, Y., Li, S., 2015. Molecular mechanisms of scar-sourced axon
20 growth inhibitors. *Brain Res.* 1–14.
21 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.064>
22
23

24
25
26
27 38. Okuda, A., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Shimizu, T., Shigematsu, H.,
28 Iwata, E., Morimoto, Y., Masuda, K., Koizumi, M., Akahane, M., Nishi, M.,
29 Tanaka, Y., 2016. Bone marrow stromal cell sheets may promote axonal
30 regeneration and functional recovery with suppression of glial scar formation
31 after spinal cord transection injury in rats. *J. Neurosurg. Spine* 1–8.
32 <https://doi.org/10.3171/2016.8.SPINE16250>
33
34
35

36
37
38
39 39. Ollivier-Lanvin, K., Fischer, I., Tom, V., Houle, J.D., Lemay, M.A., 2015.
40 Either Brain-Derived Neurotrophic Factor or Neurotrophin-3 Only
41 Neurotrophin-Producing Grafts Promote Locomotor Recovery in Untrained
42 Spinalized Cats. *Neurorehabil. Neural Repair* 29, 90–100.
43 <https://doi.org/10.1177/1545968314532834>
44
45
46

47
48
49
50 40. Pierdoná Guzen Fausto, Joacil Germano Soares, L.M. de F., José Rodolfo
51 Lopes de Paiva Cavalcanti, Francisco Gilberto Oliveira, J.F.A., Jeferson de
52 Souza Cavalcante, Judney Cley Cavalcante, E.S. do N.J. and M.S.M. de
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 O.C., 2012. Sciatic nerve grafting and inoculation of FGF-2 promotes
5 improvement of motor behavior and fiber regrowth in rats with spinal cord
6 transection. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30, 265–275.
7
8
9
10 <https://doi.org/10.3233/RNN-2012-110184>

11
12
13
14 41. Ribeiro-Resende, V.T., Koenig, B., Nichterwitz, S., Oberhoffner, S.,
15 Schlosshauer, B., 2009. Strategies for inducing the formation of bands of
16 Büngner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 30, 5251–5259.
17
18
19
20
21 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.007>

22
23
24 42. Rossignol, S., Frigon, A., 2011. Recovery of Locomotion After Spinal Cord
25 Injury: Some Facts and Mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 413–440.
26
27
28
29
30 <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113746>

31
32
33 43. Shichinohe, H., Kuroda, S., Tsuji, S., Yamaguchi, S., Yano, S., Lee, J.B.,
34 Kobayashi, H., Kikuchi, S., Hida, K., Iwasaki, Y., 2008. Bone marrow
35 stromal cells promote neurite extension in organotypic spinal cord slice:
36 Significance for cell transplantation therapy. *Neurorehabil. Neural Repair* 22,
37
38
39
40
41
42 447–457. <https://doi.org/10.1177/1545968308315596>

43
44
45 44. Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev.*
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Neurosci. 5, 146–156. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>

66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

46. Stewart, A.N., Matyas, J.J., Welchko, R.M., Goldsmith, A.D., Zeiler, S.E.,
Hochgeschwender, U., Lu, M., Nan, Z., Rossignol, J., Dunbar, G.L., 2017.
SDF-1 overexpression by mesenchymal stem cells enhances GAP-43-

1
2
3
4 positive axonal growth following spinal cord injury. *Restor. Neurol. Neurosci.*
5
6 35, 395–411. <https://doi.org/10.3233/RNN-160678>
7
8

9 47. Storer, P., 2003. β II-tubulin and GAP 43 mRNA expression in chronically
10 injured neurons of the red nucleus after a second spinal cord injury. *Exp.*
11 *Neurol.* 183, 537–547. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00181-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00181-X)
12
13
14
15

16 48. Thiede-Stan, N.K., Schwab, M.E., 2015. Attractive and repulsive factors act
17 through multi-subunit receptor complexes to regulate nerve fiber growth. *J.*
18 *Cell Sci.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1242/jcs.165555>
19
20
21
22

23 49. Tom, V.J., Houle, J.D., 2015. Peripheral Nerve Graft-Mediated Axonal
24 Regeneration, Neural Regeneration. Elsevier Inc.
25
26
27
28 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801732-6.00019-7>
29
30

31 50. Tom, V.J., Sandrow-Feinberg, H.R., Miller, K., Domitrovich, C., Bouyer, J.,
32 Zhukareva, V., Klaw, M.C., Lemay, M.A., Houlé, J.D., 2013. Exogenous
33 BDNF enhances the integration of chronically injured axons that regenerate
34 through a peripheral nerve grafted into a chondroitinase-treated spinal cord
35 injury site. *Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.09.011>
36
37
38
39
40
41
42

43 51. Tom, V.J., Sandrow-feinberg, H.R., Miller, K., Santi, L., Lemay, M.A., Houlé,
44 J.D., 2010. Combining Peripheral Nerve Grafts and Chondroitinase
45 Promotes Functional Axonal Regeneration in the Chronically Injured Spinal
46 Cord. *J. Neurosci.* 29, 14881–14890.
47
48
49
50
51
52 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3641-09.2009>. Combining
53
54

55 52. Tsintou, M., Dalamagkas, K., Seifalian, A.M., 2015. Advances in
56 regenerative therapies for spinal cord injury: A biomaterials approach.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 53. Wang, D., Ichiyama, R.M., Zhao, R., Andrews, M.R., Fawcett, J.W., 2011.
5
6 Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of
7
8 Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 31,
9
10 9332–9344. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011>
11
12
13
14 54. Wang, D., Ichiyama, R.M., Zhao, R., Andrews, M.R., Fawcett, J.W., 2011.
15
16 Chondroitinase combined with rehabilitation promotes recovery of forelimb
17
18 function in rats with chronic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 31, 9332–44.
19
20 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011>
21
22
23
24 55. Zeng, X., Ma, Y.H., Chen, Y.F., Qiu, X.C., Wu, J.L., Ling, E.A., Zeng, Y.S.,
25
26 2016. Autocrine fibronectin from differentiating mesenchymal stem cells
27
28 induces the neurite elongation in vitro and promotes nerve fiber
29
30 regeneration in transected spinal cord injury. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*
31
32 104, 1902–1911. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35720>
33
34
35
36 56. Zhang, Y., Campbell, G., Anderson, P.N., Martini, R., Schachner, M.,
37
38 Lieberman, A.R., 1995. Molecular basis of interactions between
39
40 regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve
41
42 grafts I. Neural cell adhesion molecules. *J. Comp. Neurol.* 361, 193–209.
43
44 <https://doi.org/10.1002/cne.903610202>
45
46
47
48 57. Zhao, R.-R., Fawcett, J.W., 2013. Combination treatment with
49
50 chondroitinase ABC in spinal cord injury—breaking the barrier. *Neurosci.*
51
52 *Bull.* 29, 477–483. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1359-2>
53
54
55
56
57
58

59 **Figure 1. Expression and quantification of GAP-43 in the spinal cord after**
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **injury and treatment.** Photomicrography in panels A, B, C, D and E, rostral zone;
5
6 F, G, H, I and J, epicenter zone; K, L, M, N and O, caudal zone. Immunoreactive
7
8 fibers for GAP-43 in green (arrows). Nuclei dyed in blue, Hoechst. Calibration
9
10 Scale: A-E 100 $\mu\mu$; F-J 50 $\mu\mu$; K-O $\mu\mu$. In panels P (rostral zone), Q (epicenter zone)
11
12 and R (caudal zone) expression quantification of GAP-43. *******, $p < 0.0001$
13
14 (Difference of the groups between the control Kruskal Wallis). ******, $p < 0.05$
15
16 (Difference between treatment groups U-Mann Withney). All measurements are
17
18 reported with standard deviations.
19
20
21
22
23

24 **Figure 2. Expression and quantification of MAP-1B in in the spinal cord after**
25
26 **injury and treatment.** Photomicrography in panels A, B, C, D and E, rostral zone;
27
28 F, G, H, I and J, epicenter zone; K, L, M, N and O, caudal zone. Immunoreactive
29
30 fibers for MAP-1B in green (arrows). Nuclei dyed in blue, Hoechst. Calibration
31
32 Scale: A-E 100 $\mu\mu$; F-J 50 $\mu\mu$; K-O $\mu\mu$. In panels P (rostral zone), Q (epicenter zone)
33
34 and R (caudal zone) expression quantification of GAP-43. *******, $p < 0.0001$
35
36 (Difference of the groups between the control Kruskal Wallis). ******, $p < 0.05$
37
38 (Difference between treatment groups U-Mann Withney). All measurements are
39
40 reported with standard deviations.
41
42
43
44
45
46

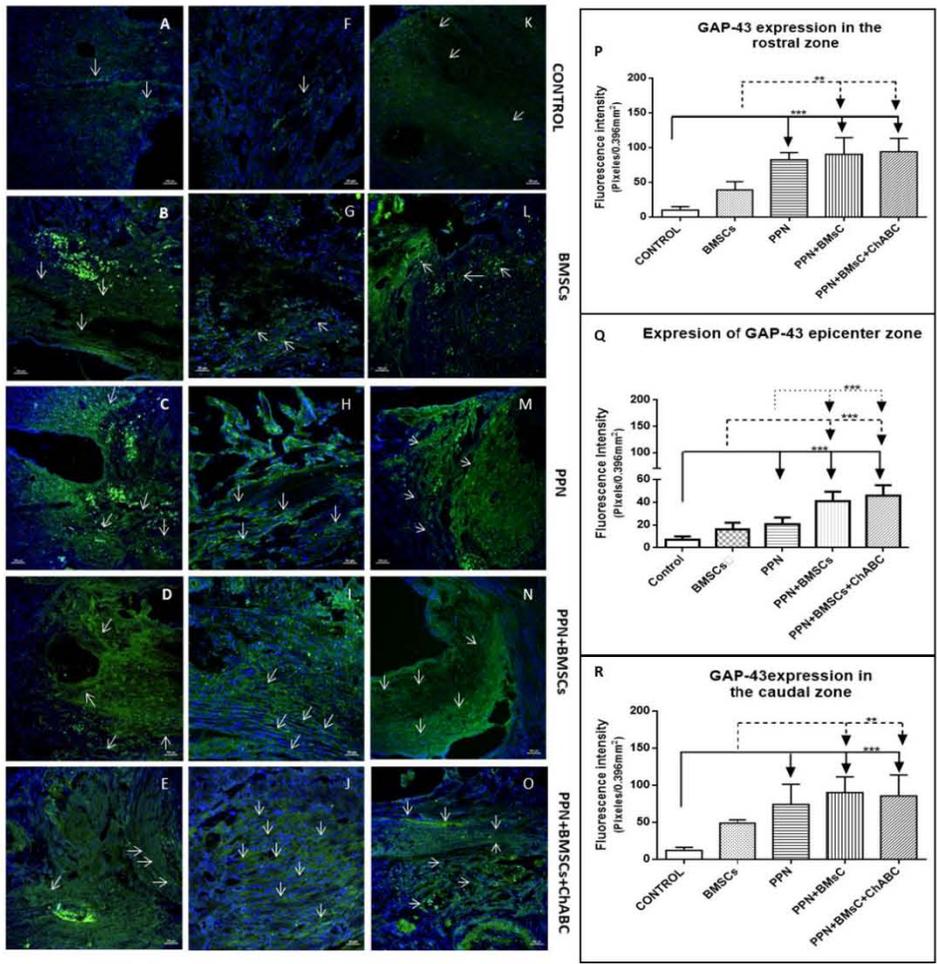
47 **Figure 3. Expression of GFAP and MAP-1B in BMSCs in the spinal cord.**
48
49 Panels A-B, immunoreactive cells for MAP-1B (green color). Panels C-D,
50
51 immunoreactive cells for GFAP+ (red color). Cells with star-like morphology are
52
53 observed. Panel E, immunoreactive cells for MAP-1B (green color), with long
54
55 extensions. Nuclei contrasted with Hoechst (blue color). Calibration scale: A-D
56
57 50 $\mu\mu$; E 20 $\mu\mu$.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Figure 4. Photomicrography of axonal regeneration.** In panels A, B, D P F,
5 positive fibers for the descending fibers are shown (red, mini-ruby dextran,
6 tetramethylrhodamine, arrows) and ascending fibers (green Emerald fluoro dextran
7 fluorescein, arrows), in rostral zones, transplant zone, and caudal of the spinal
8 cord. In panels, C, E and G positive fibers for both tracers are observed in the
9 transplant zone (arrows), besides the addition of some fibers marked with both
10 tracers (yellow-arrows). Nuclei dyed in blue with Hoechst. Calibration scale A, B, D
11 y F, 1000 μm ; C, E and G, 50 μm .

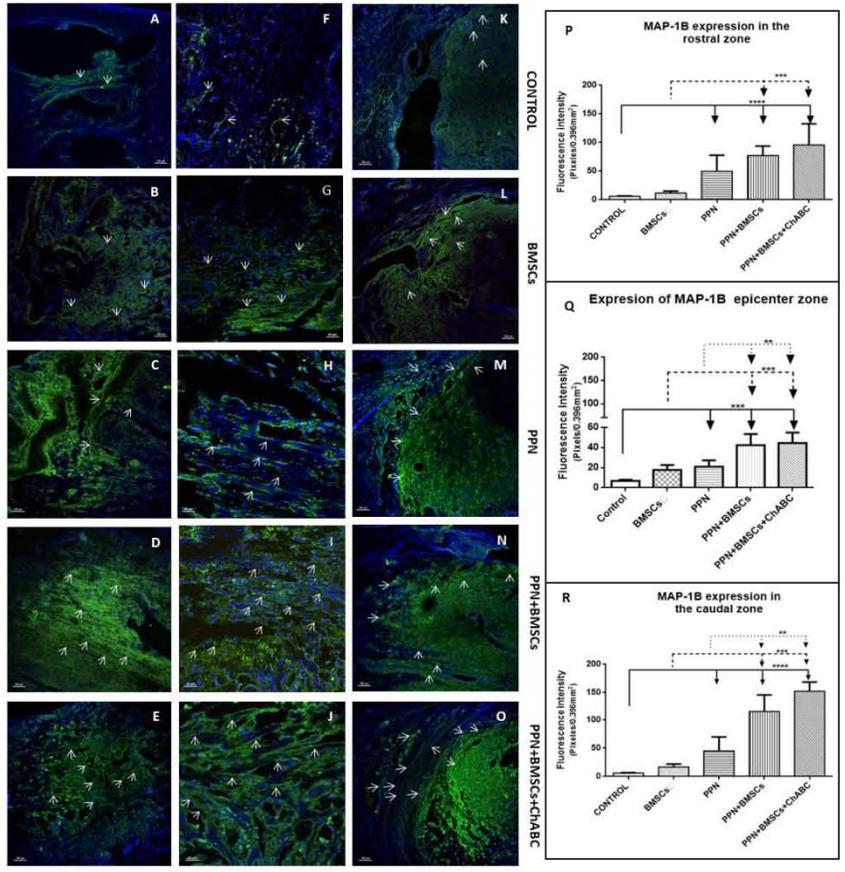
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24 **Figure 5. Locomotor function evolution.** Panel A shows the obtained scores
25 during 12 weeks after treatment with the modified BBB score in order to evaluate
26 locomotor function in animals with complete spinal cord section. ****, $p < 0.0001$
27 (Anova 2 ways of measurement repeated), *** $p < 0.001$ (Tukey). SHAM group data
28 does not include so as to facilitate the differentiation between groups. All animals
29 had 0 points twenty four hours after transplantation. Panel B, kinematic recording
30 of pendular movement. ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.05$.

31
32
33
34 **Figure 6. Gait kinematic recording.** Panel A hip; Panel B knee. In the images of
35 the Sham group, the movement of the hips and knees in wave forms, is observed.
36 In the control groups, there are no movements to be seen, this is shown through a
37 flat line. In the treated group with BMSCs there is a presence of inconstant waves
38 with a small amplitude. With PPN treatment, there is an increase in the formation of
39 waves in both joints. On the contrary, In the combined treatment (PPN+BMSCs
40 and PPN+BMSCs+ChABC) groups there is an increase in the amplitude of the
41 waves, which occur more frequently and constant in both joints.

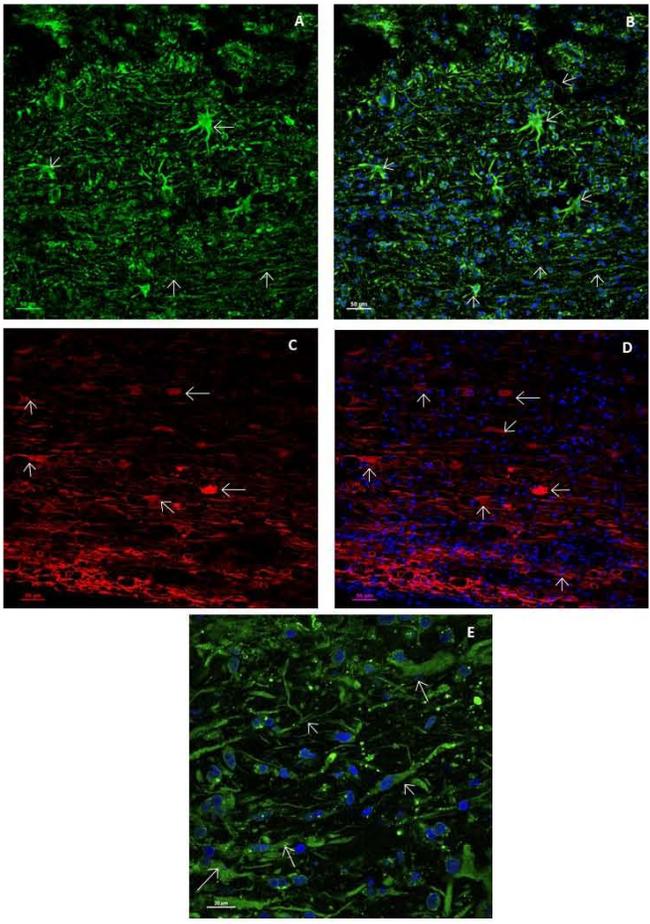
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



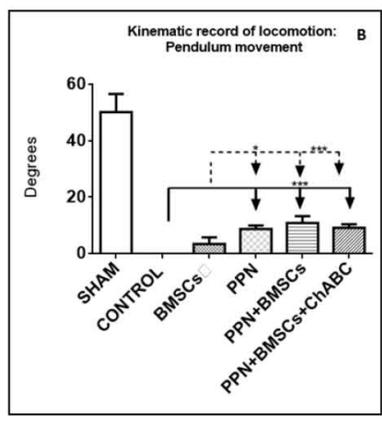
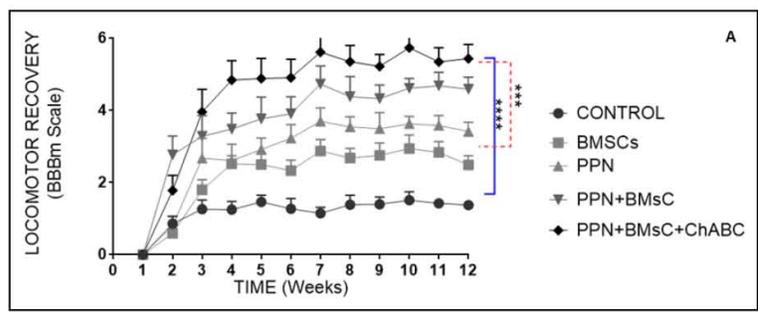
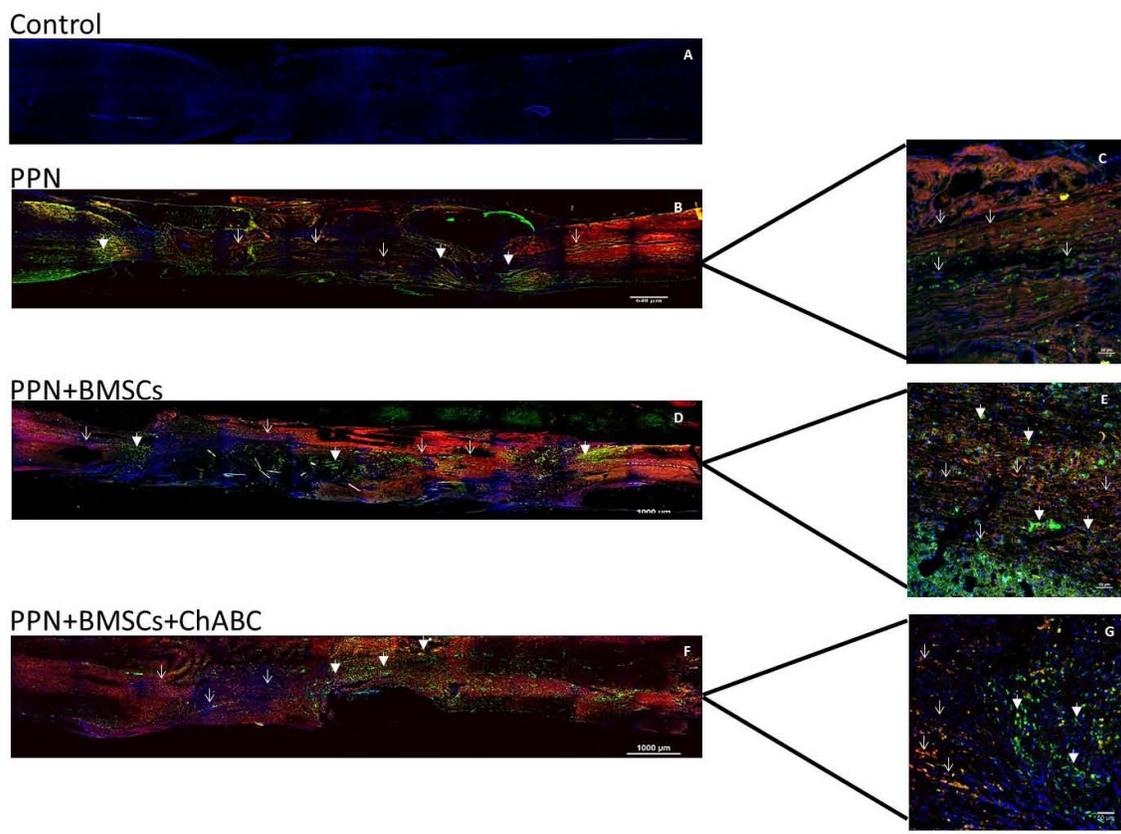
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



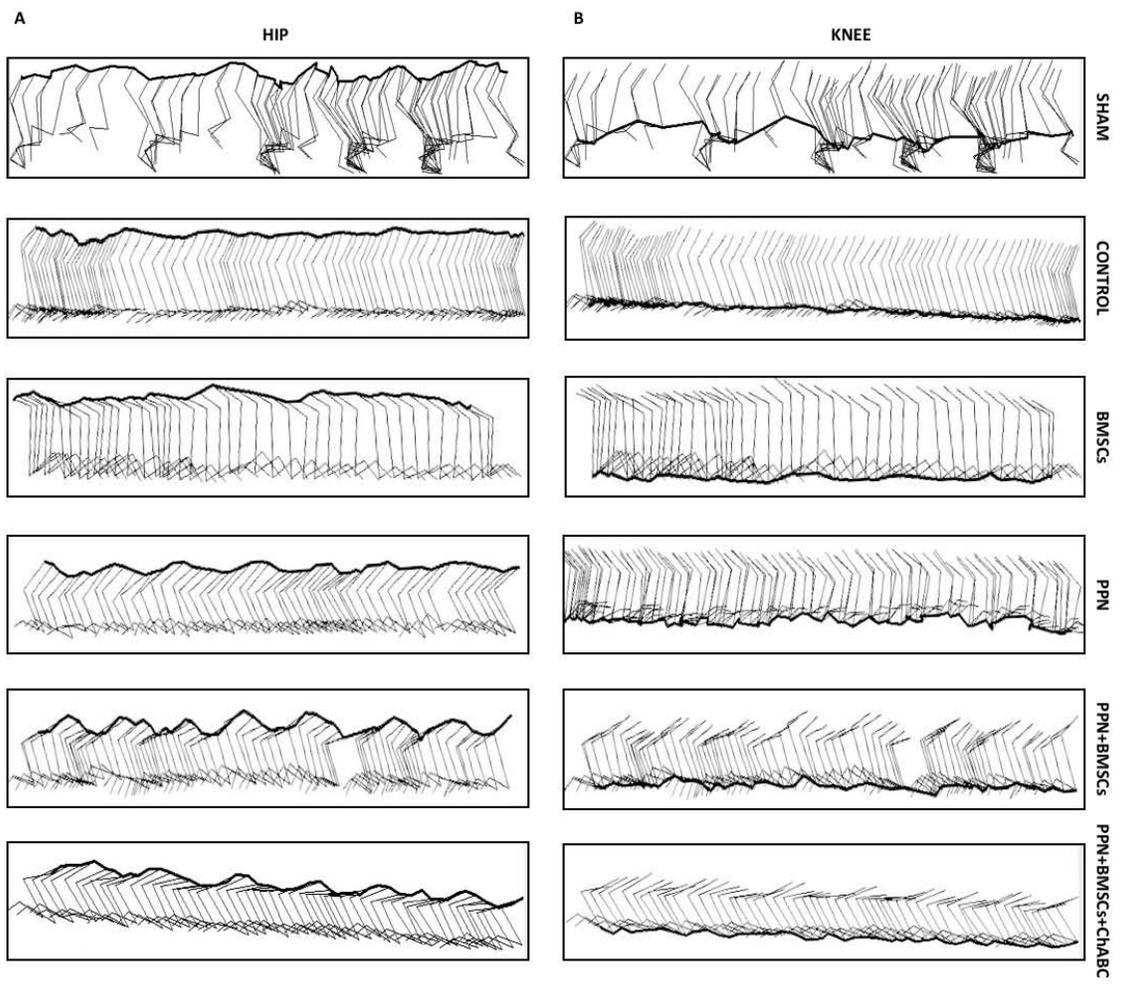
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Your image file "Figure 1.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.

Your image file "Figure 2.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.

Your image file "Figure 3.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.

Your image file "Figure 4.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.

Your image file "Figure 5.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.

Your image file "Figure 6.tif" cannot be opened and processed. Please see the common list of problems, and suggested resolutions below.

Reason: The image file is corrupt or invalid. Please check and resubmit.

Other Common Problems When Creating a PDF from an image file

You will need to convert your image file to another format or fix the current image, then re-submit it.