



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA
DESPUÉS DE UNA LTME EN RATAS ADULTAS
CON SECCIÓN COMPLETA Y CRÓNICA DE
MÉDULA ESPINAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSUÉ JARED RAFAEL RIVERA OSORIO

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. VINNITSA BUZOIANU ANGUIANO



Ciudad Universitaria, CD. MX., 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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Rivera
Osorio
Josué Jared Rafael
5517916498
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
414064526

2. Datos del tutor

M. en C.
Vinnitsa
Buzoianu
Anguiano

3. Datos del sinodal 1

Dr. en C. med.
José Efrén Israel
Grijalva
Otero

4. Datos del sinodal 2

Dra. en C. B.
Hermelinda
Salgado
Ceballos

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Ismael
Jiménez
Estrada

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la función locomotora después
de una LTME en ratas adultas con sección
completa y crónica de médula espinal
85 p.
2019

Para mi madre y mi padre

Agradecimientos

Quiero agradecer más que nada a mi madre, padre y hermanos, por haberme dado todo el apoyo que necesité en el trayecto de la carrera y por todos los momentos que hemos pasado juntos como familia. A todos mis amigos de la facultad, en especial a Fernanda y Adriana, por haberme dado su apoyo y haber estado conmigo en las buenas y en las malas, compartiendo toda clase de momentos divertidos y especiales juntos. A todos los chicos del laboratorio, especialmente a Maira, Zaira y Josué, por haber convivido todo este tiempo conmigo, llenándolo de momentos divertidos con risas, peleas y alitas. Y por último a mi tutora y amiga Vinnitsa, por todo lo que me enseñó, así como el apoyo y tiempo que me dedicó y por los momentos que pasamos juntos... ¡GRACIAS!

Índice general

	Página
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vi
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Anatomía de la médula espinal	3
2.2. Tractos y vías en la médula espinal	6
2.3. Como se genera el movimiento	8
2.4. El ciclo de la marcha y los centros generadores de patrones	11
2.5. Lesión traumática de médula espinal	15
2.6. Modelos experimentales de la lesión traumática de médula espinal	16
2.7. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal	17
2.8. Características de la marcha después de una lesión traumática de médula espinal	18
3. ANTECEDENTES	20
3.1. Recuperación funcional	20
3.2. Técnicas de análisis de la recuperación funcional	20
3.3. Tipos de tratamientos	25
3.3.1. Factores de crecimiento y enzimas exógenas	26
3.3.2. Trasplante de células	27
3.3.3. Injerto de tejidos	27
3.4. Tratamientos con enfoques combinados	28
3.4.1. Tratamientos combinados con el uso de nervio periférico	28
3.4.2. Tratamientos combinados con el uso de la condroitinasa ABC	29

3.4.3. Tratamientos combinados con el uso de células estromales de médula ósea	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. JUSTIFICACIÓN	31
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
7. HIPÓTESIS	32
8. OBJETIVOS	32
8.1. Objetivo general	32
8.2. Objetivos específicos	32
9. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
10.METODOLOGÍA	35
10.1.Población	35
10.2.Muestra	35
10.3.Consideraciones éticas	35
10.4.Lesión de médula espinal	35
10.5.Lesión del nervio periférico para trasplante	36
10.6.Obtención de células mesenquimales	36
10.7.Transplantes	37
10.8.Evaluación de la función motora	37
10.9.Cinemática de la marcha	38
10.10Análisis Estadístico	40
11.RESULTADOS	42
11.1.Evaluación funcional con la BBB estándar	42
11.2.Evaluación funcional con la BBBm	42
11.3.Cinemática de la marcha	44
11.4.Apertura de ángulos en el balanceo	45
11.5.Apertura de ángulos en el soporte	48
11.6.Movimiento pendular	50
11.7.Comparación de pruebas de evaluación	51

12.DISCUSIÓN	54
12.1.Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación de los tratamientos únicos	55
12.2.Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación de los tratamientos combinados	58
12.3.Mecanismo de regeneración propuesto	60
13.CONCLUSION	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Anexos	74
A. Escala de la BBB estándar	74
B. Escala de la BBB modificada	75

Índice de figuras

	Página
2.1. Esquema representativo de la organización lateral y transversal de la médula espinal	4
2.2. Esquema de los principales tipos de neuronas de la médula espinal y sus respectivas conexiones	5
2.3. Esquema del arreglo de las estructuras en la sustancia gris en un corte transversal de la médula espinal	5
2.4. Esquema que representa una sección transversal de la médula espinal .	7
2.5. Ilustración de las áreas 4 y 6 del neocortex, involucradas en la planeación y ejecución del movimiento	8
2.6. Esquema del arreglo de los circuitos en los ganglios basales	9
2.7. Esquema de dos de las vías descendentes ventromediales del humano .	10
2.8. Esquema que representa al tracto reticuloespinal medial y lateral . . .	11
2.9. Esquema que representa las vías laterales descendientes	12
2.10. Esquema donde se representan las estructuras de la médula espinal involucradas en la regulación del movimiento voluntario	13
2.11. Esquema representativo de las fases de la marcha bipedal	13
2.12. Esquema del movimiento de cadera, rodilla y tobillo	14
2.13. Esquema de un posible circuito generador de patrones	14
2.14. Tipos de lesiones de médula espinal	16
3.1. Esquema de las estrategias para poder obtener la reinervación axonal propuestas por Tsuzyski	21
3.2. Gráfica de evaluación de la BBB	22
3.3. Gráficas de evaluación de la BBB y de la BBBm	23
3.4. Esquema representativo de un protocolo para observar la mejoría en la locomoción	24
3.5. Resultados del uso de un análisis cinemático de la marcha	24

3.6. Registro electromiográfico	25
3.7. Técnica de registro de potenciales evocados	26
9.1. Diseño experimental	34
10.1. Representación del uso de ImageJ	39
10.2. Trazo del movimiento completo de la marcha	39
10.3. Visualización de la variación de la apertura de los ángulos de las arti- culaciones	40
10.4. Representación gráfica del eje fijo formado en la cresta iliaca y el tobillo	40
11.1. Evaluación de la función locomotora con la escala de la BBB estándar .	43
11.2. Evaluación de la función locomotora con la escala de la BBBm	44
11.3. Trazos de movimiento de deambulaci3n de la cadera	46
11.4. Trazos de movimiento de deambulaci3n de la rodilla	47
11.5. Trazos de movimiento de deambulaci3n del tobillo	48
11.6. Amplitud de los ángulos del balanceo de cadera, rodilla y tobillo	49
11.7. Amplitud de los ángulos en el soporte de cadera, rodilla y tobillo	51
11.8. Comparaci3n de la apertura de los ángulos del movimiento pendular .	52
11.9. Análisis de correlaci3n de las pruebas de evaluaci3n funcional y la ci- nemática de la marcha	53

Índice de tablas

	Página
2.1. Tractos Descendente de la ME	6
2.2. Tractos Ascendentes de la ME	7

1. RESUMEN

La recuperación de la función locomotora es uno de los objetivos principales en los tratamientos de lesión traumática de médula espinal (LTME). En la literatura se han reportado diversos tratamientos para promover la mejoría en la recuperación funcional, pero pocos muestran resultados consistentes y ninguno ha mostrado restablecer las funciones perdidas en su totalidad, sobre todo en la LTME por sección completa, donde las señales de las estructuras cerebrales han sido completamente interrumpidas y donde el daño y área de la lesión se han exacerbado, creando un ambiente no permisivo para la regeneración. Entre las estrategias utilizadas se ha reportado el uso de tratamientos únicos y combinados con nervio periférico, células estromales de médula ósea (CEMO), y la enzima condroitinasa ABC (ChABC), donde el uso de los tratamientos combinados ha mostrado promover la recuperación funcional en mayor grado que en los tratamientos únicos. No obstante, estas 3 estrategias no han sido empleadas en combinación después de una LTME en fase crónica. La evaluación de la recuperación funcional es un paso importante para determinar la eficacia terapéutica de los diversos protocolos regenerativos. Entre los métodos de evaluación motora más usados encontramos la evaluación conductual en campo abierto Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), desarrollada para modelos de lesión por contusión, la cual tiene su versión para modelos de sección completa, la escala BBB modificada (BBBm). Al mismo tiempo, existen diversos métodos como el análisis cinemático, la prueba del plano inclinado y pruebas electrofisiológicas, entre muchos otros.

El objetivo de este proyecto es evaluar la recuperación de la función locomotora en un modelo de LTME por sección completa en fase crónica, después de tratamientos únicos con CEMO o nervio periférico predegenerado (NPP), y de los tratamientos combinados con CEMO y NPP (tratamiento doble), o con la adición de la enzima ChABC al uso de CEMO y NPP (tratamiento triple). Se utilizaron 126 ratas hembras Fisher 344 con sección completa a nivel torácico 9 (T9); estos animales se dividieron en 5 grupos (Control= 14 animales con LTME; Grupo 1= 14 animales con NPP; Grupo 2= 14 animales con CEMO; Grupo 3= 14 animales con NPP+CEMO; Grupo 4=14 animales con NPP+CEMO+ChABC). Todos los animales fueron evaluados con la prueba funcional BBB y BBBm una vez por semana durante 3 meses; además, se realizó evaluación de la cinemática de la marcha para observar la amplitud de los

movimientos articulares y de toda la extremidad.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones conductuales en campo abierto (BBB y BBBm) mostraron que todos los grupos tratados presentaron una mejor recuperación funcional en comparación con el grupo control y que los animales con los tratamientos combinados mostraron el mejor desempeño en comparación de los animales con tratamientos únicos. A su vez el análisis de la cinemática de marcha permitió observar que todos los grupos con tratamiento presentaron una mejoría significativa en la amplitud de los ángulos de las articulaciones involucradas en la marcha, así como una mejoría en la amplitud del movimiento pendular a comparación del grupo control, y que los grupos con tratamientos combinados mostraron una mayor apertura a diferencia de lo observado en los grupos con tratamientos únicos, así como la presencia de movimientos amplios y frecuentes en los trazos de la marcha. Se concluyó que el uso combinado de NPP y CEMO después de 3 meses de tratamiento mostró el mejor efecto en el grado de recuperación funcional del tren posterior en comparación con los tratamientos únicos donde también se observó una recuperación, pero limitada.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Anatomía de la médula espinal

La médula espinal (ME) es la estructura caudal del sistema nervioso central (SNC), que se encuentra ubicada junto con las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) dentro del canal central o canal vertebral (inciso B de la figura 2.1) [1, 2, 3]. Se encuentra formada por una serie de segmentos cuyas funciones son la distribución de vías eferentes desde el encéfalo hacia los órganos efectores del cuerpo, y de las aferencias procedentes de las distintas áreas del cuerpo, con dirección al encéfalo (inciso A de la figura 2.1) [2, 3]. Entre las vías eferentes encontramos los nervios que están involucrados en el control de las vías motoras voluntarias, asociadas al movimiento del tronco y de las extremidades, así como las fibras responsables de la inervación del sistema visceral o autónomo [3, 4]. Entre las vías aferentes o sensoriales encontramos tractos ascendentes involucrados en el tacto, el dolor, la sensación de la temperatura y la posición espacial de las extremidades, mejor conocida como propiocepción [3, 4]. La ME comienza a nivel del orificio occipital mayor, o foramen magno, es la continuación del tallo cerebral y se extiende a lo largo de la columna vertebral [1]. En los humanos la ME consta de un total 31 segmentos medulares, los 8 primeros segmentos son cervicales, le siguen 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo (inciso A de la figura 2.1) [5]. En la rata, la ME está compuesta de 34 segmentos medulares: 8 cervicales (C1 - C8), 13 torácicos (T1 - T13), 6 lumbares (L1 - L6), 4 sacros (S1 - S4), y 3 coccígeos (Co1 - Co3) [2, 5]. En la ME se presentan dos ensanchamientos, en la rata el primero es el ensanchamiento cervical, que se ubica entre los segmentos C5 – T1, mientras que el segundo es el ensanchamiento lumbosacro, que se presenta entre los segmentos L2 – L6 [6]. Cuando las raíces anteriores y posteriores se juntan forman lo que se le denomina nervio espinal, existe un par de nervios espinales por cada segmento, ambos tanto con un carácter motor, así como sensitivo, cuya distribución periférica son los diversos niveles de segmentación como el cuello, el tronco y las extremidades. A la regionalización correspondiente a cada segmento se le denomina dermatoma y miotoma (inciso C de la figura 2.1) [2, 3, 5].

La ME se caracteriza por tener la sustancia blanca en la parte externa y la sustancia gris en la parte interna (inciso C de la figura 2.1) [3]. En la sustancia blanca se

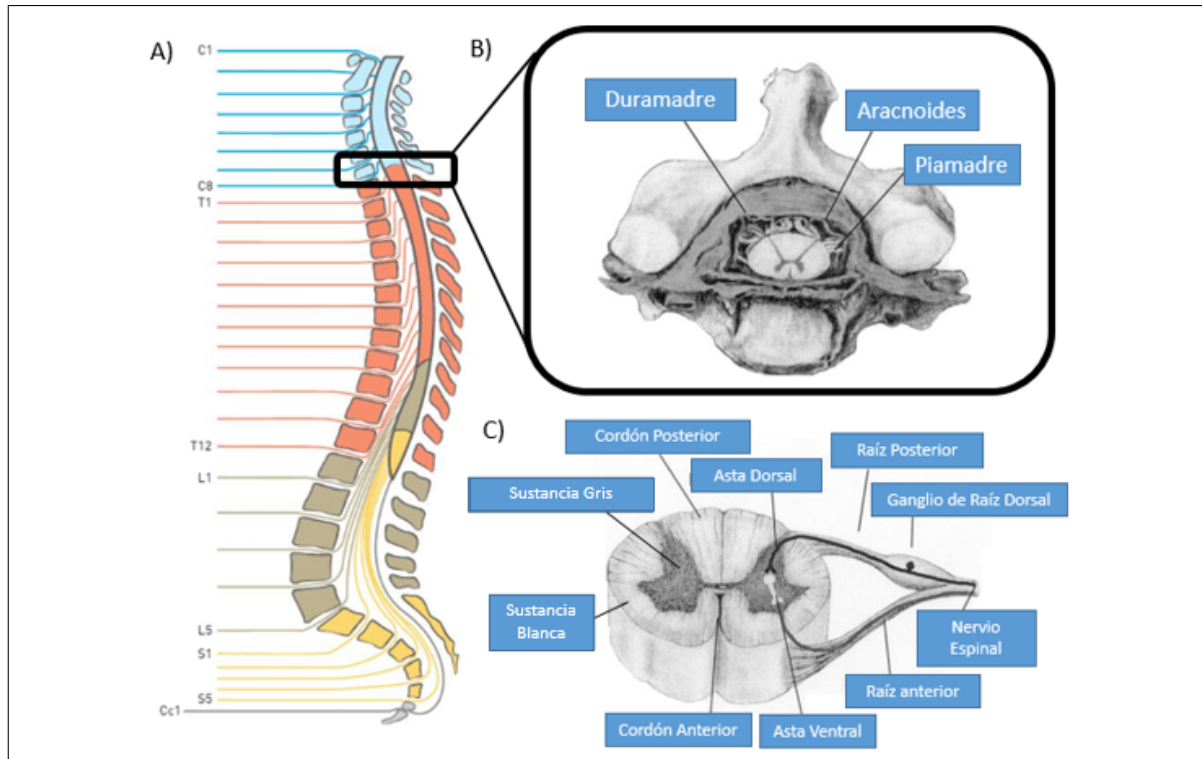


Figura 2.1: Esquema representativo de la organización lateral y transversal de la médula espinal (ME). En el **inciso A)** se representa el acomodo de los segmentos medulares con sus respectivas vertebras, se aprecian todos los segmentos cervicales (C1–C8, T1–T12, L1–L5, S1–S5 y un último elemento cocígeo Cc1), también se puede observar la estructura denominada cola de caballo, que comienza en el segmento lumbar 1 y donde solo recorrerán los nervios espinales el canal central de la columna vertebral. En el **inciso B)** se observa la ubicación de la ME dentro del canal central de la vértebra, así como su recubrimiento por las meninges. El **inciso C)** muestra la estructura transversal de la ME con sus estructuras anatómicas representativa. Modificado de Jacobson y García-Porrero [5, 6].

ubicar tractos y haces axónicos tanto ascendentes como descendentes, se encuentra dividida en cordones: un cordón posterior ubicado entre las astas posteriores o dorsales, formado por axones ascendentes muy mielinizados; un cordón lateral que se dispone a los lados entre las raíces anteriores y posteriores, en el trascurren tractos ascendentes y descendentes; y por un cordón anterior localizado entre las raíces nerviosas anteriores, ocupado exclusivamente por tractos descendentes (inciso C de la figura 2.1) [2, 3, 6].

La sustancia gris se ubica alrededor del conducto epéndimario y se encuentra rodeada por la sustancia blanca, tiene forma de H y está formada por una astas dorsales, ventrales y laterales [1, 3, 6]. En las astas dorsales encontramos a las neuronas receptoras, o de carácter sensitivo, las cuales envían información a los núcleos superiores y cuyos axones pasan a los cordones de la sustancia blanca (figura 2.2) [7]. En las astas ventrales encontramos los somas de las motoneuronas alfa y gamma, cuyos axones sa-

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

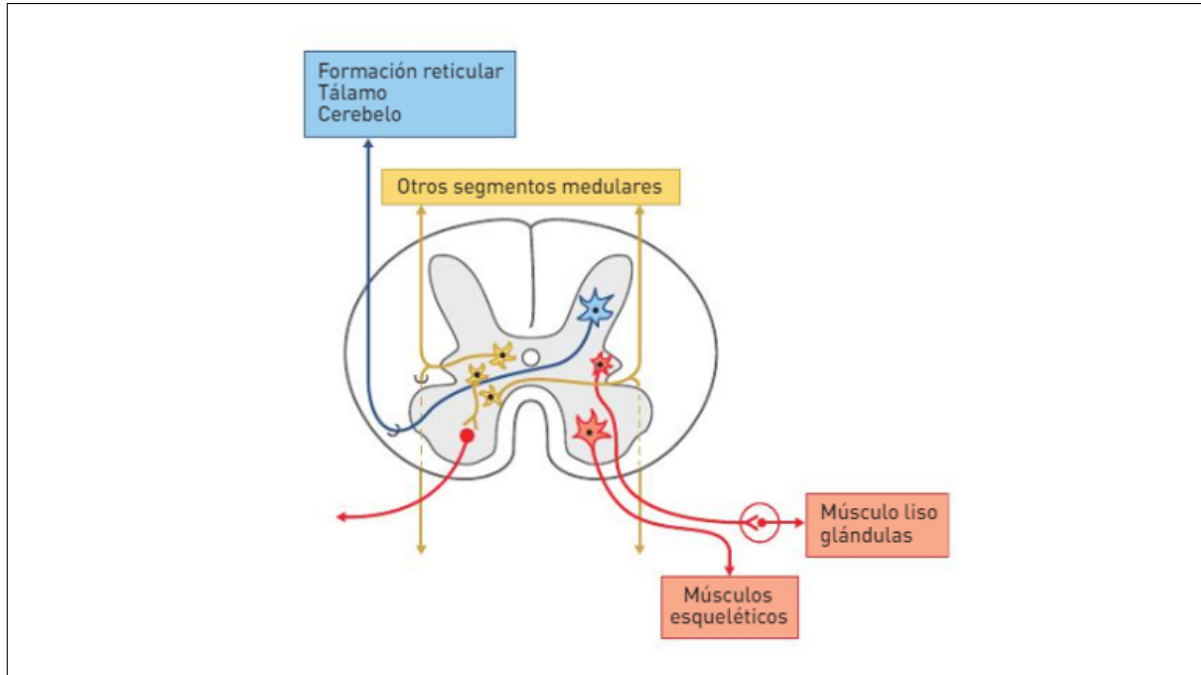


Figura 2.2: Esquema de los principales tipos de neuronas de la médula espinal y sus respectivas conexiones: Neuronas radicales o efectoras (rojo), neuronas receptoras (azul), e interneuronas (amarillo). Tomado de García-Porrero [6].

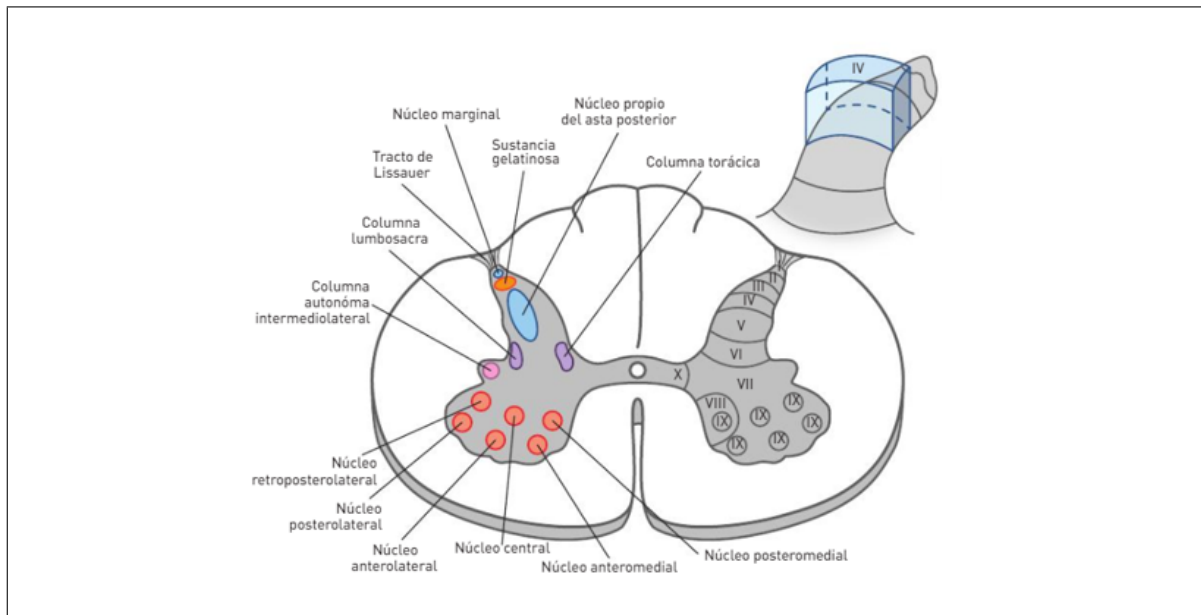


Figura 2.3: Esquema del arreglo de las estructuras de la sustancia gris en un corte transversal de la médula espinal. Del lado izquierdo se muestra el arreglo de los núcleos y del lado derecho el arreglo de las láminas de REDEX que tienen lugar dentro de las astas, así como una representación tridimensional de la disposición de una lámina del asta posterior. Tomado de García-Porrero [6].

len por las raíces anteriores de los nervios espinales para inervar efectores somáticos, y fibras intrafusales dentro de los husos musculares (figura 2.2) [7, 8]. También encontramos interneuronas que forman parte esencial en el control y regulación de los circuitos, como en los reflejos o los movimientos complejos, tales como la locomoción (figura 2.2) [7, 8]. La sustancia gris se divide en 10 láminas, propuestas por REDEX, que se regionalizan dependiendo de la citoarquitectura presente en ellas (figura 2.2) [1, 2, 3].

2.2. Tractos y vías en la médula espinal

La ubicación y anatomía de los tractos espinales en la ME se encuentran bien preservadas entre los mamíferos [9]. En las ratas y los humanos, la ME difiere en el tamaño y la localización de los diversos tractos (figura 2.4) [10]. Existen tractos ascendentes y descendentes cuya localización y función se presenta en las tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1: Tractos Descendente de la ME

Tractos Descendentes	Localización	Función	Referencias
Tracto corticoespinal	Lateral/ventral	Origen en corteza primaria y premotora, desciende por cordones lateral y ventral Movimientos finos y gruesos de musculatura distal y proximal de brazos y piernas.	[11, 7, 12]
Tracto rubroespinal	Origen en núcleo rojo y desciende por cordón lateral	Control motor de extremidades superiores y movimientos finos	[11, 7, 12].
Tracto reticuloespinal lateral/medial	Origen en fascículo reticular, desciende por cordón lateral y ventral	Control postural y preparación de movimientos; modulación de funciones sensoriales y atonómicas	[11, 7, 12]
Tracto vestibulo-espinal lateral/medial	Origen en núcleos vestibulares lateral y medial del cerebro medio, descienden por cordón lateral y ventral	Involucrados en reflejos de equilibrio	[1, 4]
Tracto tectoespinal	Origen en colículos superiores, proyecciones contralaterales a segmentos cervicales superiores	Involucrado en reflejos posturales de cabeza y cuello	[1, 4]

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

Tabla 2.2: Tractos Ascendentes de la ME

Tractos Ascendentes	Localización	Función	Referencias
Tracto Gracilis y Cuneato	Asciende hasta la médula oblonga a los núcleos cuneato y gracilis, a través de la comuna dorsa	Importantes en la discriminación de tacto, tacto fino, presión y propiocepción	[11, 12]
Tracto espinotalámico lateray/ventral	Asciende por el tracto ventral o por el tracto dorsal lateral de Lissauer con dirección al núcleo ventral posterior del tálamo	Importante en el tacto no discriminativo, presión temperatura y nocicepción	[2, 11]
Tracto espino cerebeloso	Asciende por los tractos dorsales, por el fascículo cuneato y por fascículos ventrales	Transmite información propioceptiva cutánea y de los órganos tendinosos de Golgi	[11, 13]
Tracto espinoolivario	Asciende hasta el núcleo olivar inferior, a través de la unión del funículo anterior y el lateral	Transmite información propioceptiva de los músculos y los dentones	[11, 13]
Tacto espinoreticular	Asciende por el funículo ventral-lateral, junto a fibras espinotalámicas hasta los núcleos de la formación reticular	Transmite información nociceptiva y respuesta neurovegetativa	[2, 13]

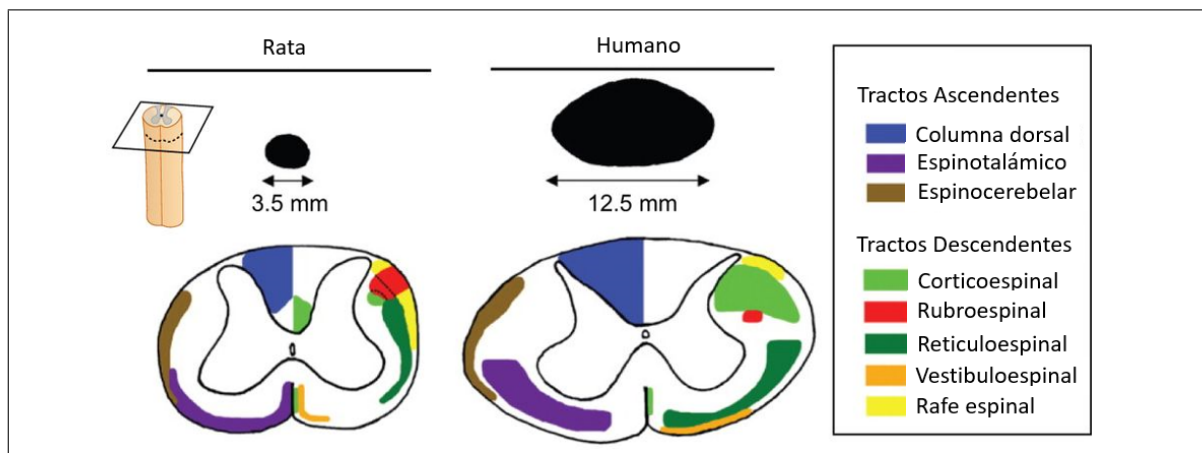


Figura 2.4: Esquema que representa una sección transversal de la médula espinal (ME) de una rata y un humano en la región cervical. Se puede observar la diferencias en el tamaño y la localización de los tractos tanto ascendentes como descendentes ubicados en la sustancia blanca de la ME. Modificado de Kjell [10].

2.3. Como se genera el movimiento

En el cerebro el movimiento se genera desde la corteza motora (CM), que es una región circunscrita en el lóbulo frontal, es la responsable del movimiento voluntario, en el humano se divide en tres regiones: región motora primaria, ubicada en el área 4, la que contiene neuronas piramidales cuyos axones descienden hacia la ME; la región premotora y motora suplementaria se ubican en el área 6, son regiones que codifican los patrones motores complejos y seleccionan planes motores apropiados para ejecutar el movimiento (figura 2.5) [4, 14, 15]. Gran parte de la neocorteza se ve involucrada en la planeación del movimiento se ven involucradas entradas somatosensoriales, propioceptivas y visuales de la corteza parietal posterior para decidir que acciones son las que se deben tomar [4, 14, 15]. En la CM se encuentran las neuronas motoras superiores cuyos axones descienden y se proyectarán hacia diferentes zonas, como los ganglios basales (GB), el cerebelo, y el tallo cerebral, otras terminan directamente sobre las neuronas motoras efectoras [4, 14, 15].

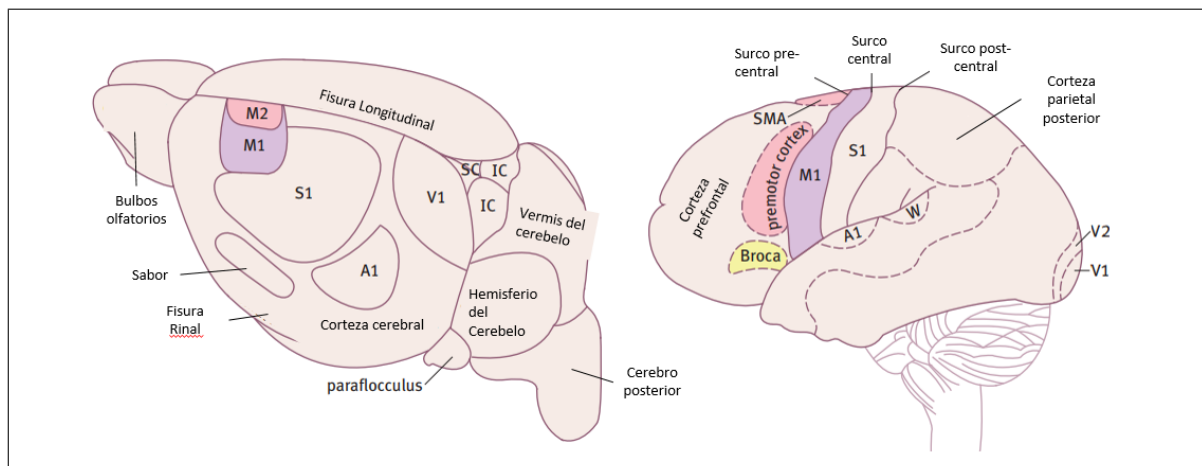


Figura 2.5: Ilustración de las áreas 4 y 6 del neocórtex, involucradas en la planeación y ejecución del movimiento. El área 4 también es conocida como corteza motora primaria (M1), donde se encuentran las neuronas corticomédulares; el área 6 está conformada por el área premotora (PMA) y el área motora suplementaria (MA), estas regiones reciben aferencias de otras áreas del neocórtex para planear la ejecución del movimiento [4]

El cerebelo y los GB son estructuras que regulan la actividad motora a través de la integración y selección del movimiento [7]. Los GB están formados por el núcleo caudado, el putamen y el globos pálidos, junto con el núcleo subtalámico y la sustancia negra regulan la activación de las neuronas superiores a través de un circuito para la selección y potenciación del movimiento (figura 2.6) [4, 7, 15]. El cerebelo es la otra estructura involucrada en la regulación del movimiento, recibe proyecciones de la CM y premotora, de la corteza somato sensorial primaria y secundaria, de regiones

visuales, y también recibe proyecciones del octavo nervio craneal y de los núcleos vestibulares, así como algunas neuronas de la ME con axones propioceptivos. El cerebro parece llevar a cabo una función de regulación y monitoreo del comportamiento motor durante la ejecución de un movimiento [4, 7].

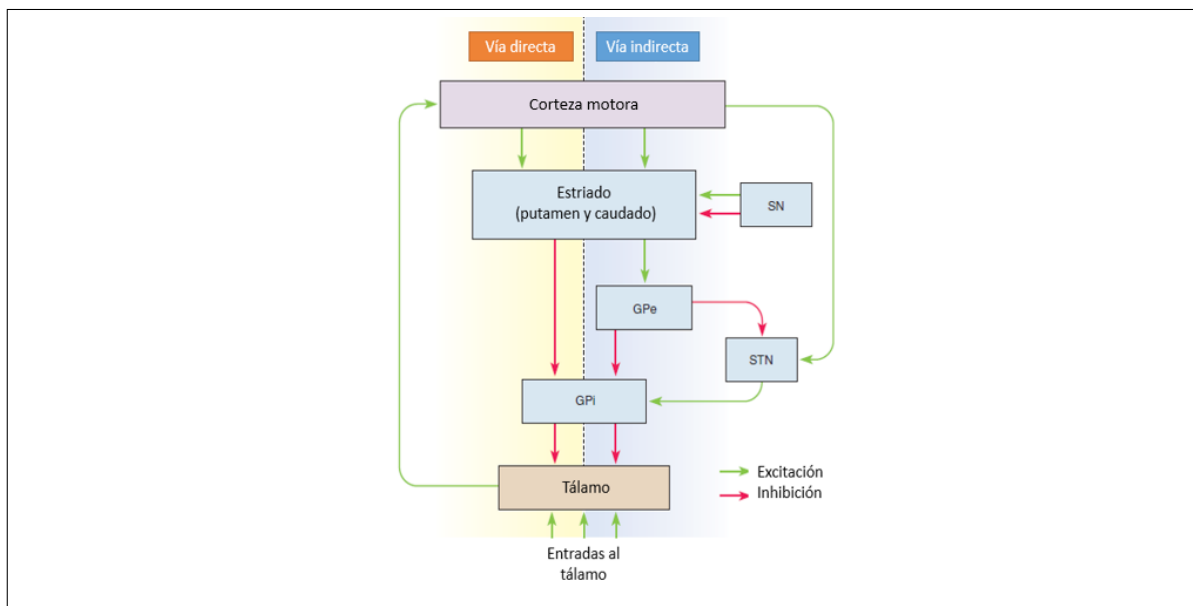


Figura 2.6: Esquema del arreglo de los circuitos en los ganglios basales (GB). Existen dos vías, una directa y una indirecta, ambas regulan la actividad motora voluntaria. La vía directa ayuda a potenciar el movimiento deseado, la activación cortical de la corteza motora (CM) llega al putamen, que terminara por inhibir a las neuronas del Globus palidus interno (GPi), las que a su vez inhiben el núcleo ventral lateral, ubicado en el tálamo, que pasara a un estado activo y potenciará la actividad de la corteza motora, esta vía funciona como un loop. Esta potenciación permitirá el inicio del movimiento. La vía indirecta pasa de la corteza al putamen, y del puamen al Glubus palitus externo (GPe), que inhibirá neuronas del GPi y de los núcleos subtalamicos, que ambos terminan inhibiendo al núcleo ventral lateral, lo que a su vez potencia la señal cortical de la CM. Modificado de Bear [4].

En el tronco del encéfalo (o brainsteam) encontramos los núcleos motores, formados por la formación reticular, los núcleos vestibulares, colículo superior, núcleo rojo y el locus coeruleus. Estos núcleos reciben eferencias de los ganglios basales y proyectan directamente sobre la ME formando lo que se conoce como las vías extrapiramidales, o vía indirecta [16]. Por otro lado, encontramos la vía piramidal, o vía directa, formada por un tracto de axones procedentes de neuronas motoras primarias de la corteza, que descienden y decusan en las pirámides [16]. Todos los tractos descienden a través de las vías descendentes mencionadas en la sección anterior, que a grandes rasgos podemos clasificar en dos sistemas descendentes: vías dorsolaterales o vías ventromediales [4, 7, 14].

Las vías ventromediales están involucradas en el control de la postura y la locomoción a través de la regulación de los músculos axiales y proximales de las extremida-

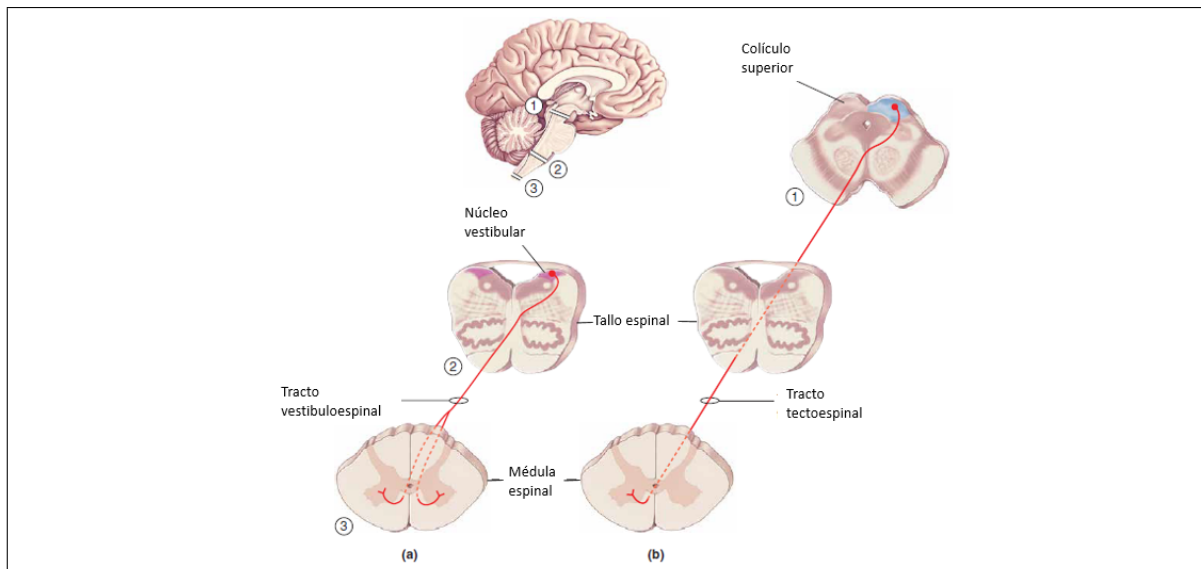


Figura 2.7: Esquema de dos de las vías descendentes ventromediales del humano: del lado izquierdo observamos el tracto vestibuloespinal (a) originado en el núcleo vestibular, un componente de la vía que desciende bilateralmente a circuitos espinales cervicales que controlan el cuello y la cabeza, el otro componente proyecta ipsilateralmente hasta los segmentos lumbares donde participa en el correcto control de la postura; de lado derecho observamos el tracto tectoespinal (b) que se origina en el Colículo superior izquierdo del cerebro medio, posteriormente desciende y decusa proyectando hacia la línea media a regiones cervicales, donde controla músculos del tronco superior. Modificado de Bear [4].

des; se compone principalmente de tres vías: Los fascículos vestibuloespinales medial y lateral originados en el núcleo vestibular, los fascículos reticuloespinal medial y lateral, originados en la formación reticular pontina y rostral medular, y el fascículo tectoespinal que se origina en el colículo superior (figura 2.7 y figura 2.8) [16, 7]. Las vías dorsolaterales están involucradas en el control del movimiento voluntario y de la musculatura distal, entre estas vías encontramos el tracto corticoespinal formado por los axones descendentes de la corteza, el cual se divide en el tracto corticoespinal ventral y lateral, y el tracto rubroespinal originado en el núcleo rojo (figura 2.9) [4, 7].

Las neuronas motoras inferiores son las que inervan la musculatura esquelética, se ubican en las astas ventrales, donde se encuentran a las neuronas motoras alfa y gamma, cuyos somas neuronales conforman a los núcleos motores, estos núcleos a su vez forman columnas longitudinales que se extienden entre uno y cuatro segmentos medulares denominados pools neuromotores (inciso A de la figura 2.10) [7]. Estos núcleos motores siguen una regla proximal-distal, donde los núcleos motores que inervan los músculos más proximales están en una ubicación más medial de la ME, mientras que los músculos más distales tienen una ubicación más lateral [8]. Una

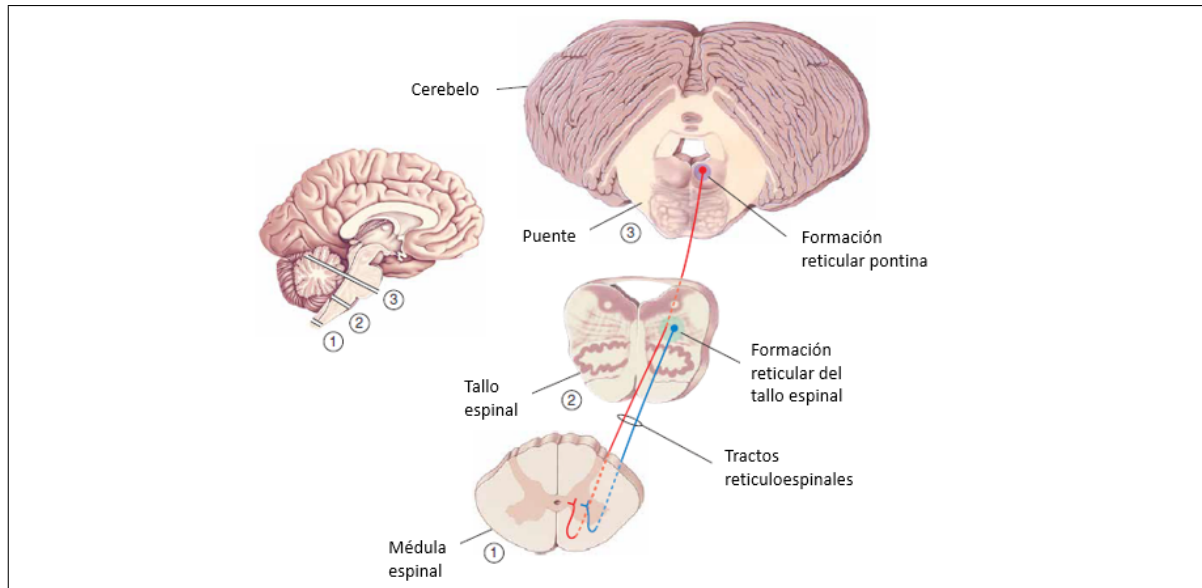


Figura 2.8: Esquema que representa al tracto reticuloespinal medial y lateral, que se originan en la formación reticular del puente y del tallo espinal respectivamente, la porción medial envía proyecciones ipsilateralmente a todos los niveles de la médula, participa en los movimientos de extensión muscular, mientras que la porción lateral envía proyecciones bilateralmente a todos los niveles de la médula y participa en la regulación de reflejos. Modificado de Bear [4, 11].

motoneurona alfa junto con su musculatura inervada, forman una unidad motora, la contracción muscular resulta de la acción individual y colectiva de estas unidades (inciso C de la figura 2.10) [4]. Las motoneuronas alfa son inervadas tanto por células de los ganglios de raíz dorsal que traen información sensorial del huso muscular; como por neuronas motoras superiores en la CM, e interneuronas de los denominados circuitos locales para proveer coordinación entre los distintos segmentos medulares (inciso B de la figura 2.10) [4, 7]. Las motoneuronas alfa liberan acetilcolina (ACh) de las terminales axónicas produciendo un potencial postsináptico excitatorio en las fibras extrafusales, fibras que producen la contracción del músculo [4, 7].

2.4. El ciclo de la marcha y los centros generadores de patrones

La locomoción ha sido descrita como la serie de movimientos alternados y rítmicos de las extremidades que determinan el desplazamiento del cuerpo por delante del centro de gravedad [17, 18]. En la locomoción de todos los animales terrestres con extremidades, cada extremidad se mueve repetidamente a través de un ciclo, el ciclo de la marcha [19]. Cada extremidad se mueve a través del ciclo una vez por zancada,

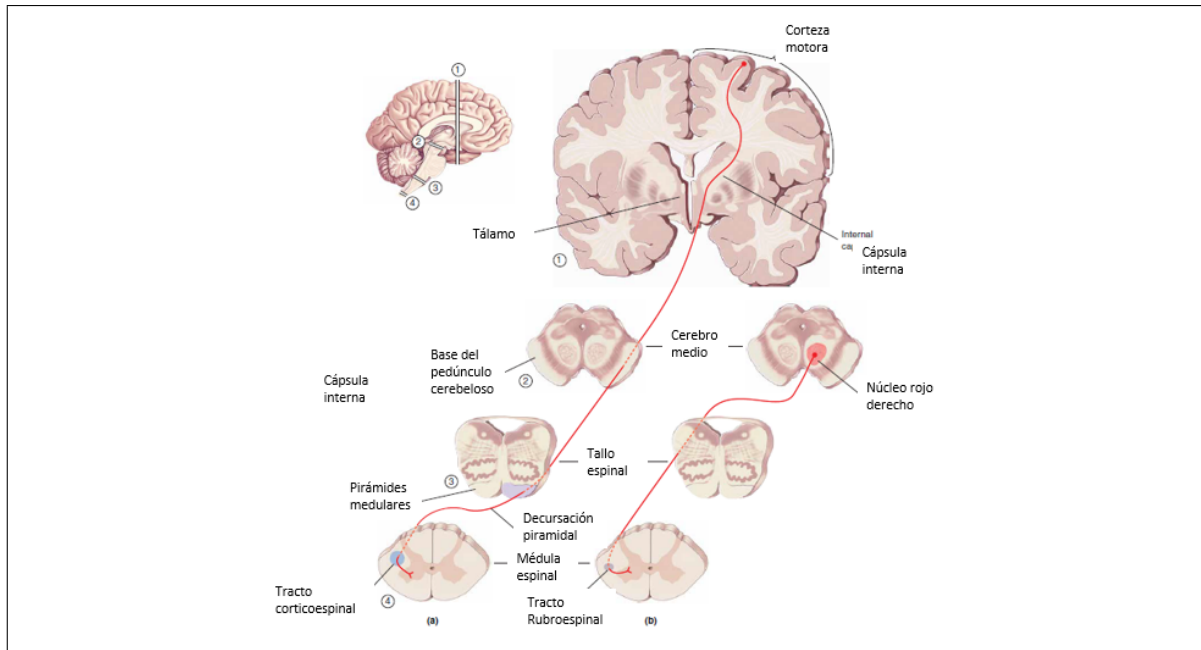


Figura 2.9: Esquema que representa las vías laterales descendientes. Del lado izquierdo observamos el tracto corticoespinal (a) que se origina en la CM, descienden a la capsula interna y cruzan por el tálamo, para posteriormente descender por los pedúnculos cerebelosos y continuar por las pirámides medulares, decursar y formar el tracto corticoespinal lateral. Estos axones terminan en la región dorso-lateral de las astas ventrales en la sustancia gris, donde se encuentran las neuronas motoras e interneuronas que controlan la musculatura distal y proximal, particularmente la flexora [4]. Del lado derecho encontramos el tracto Rubroespinal, que se ubica ventrolateralmente al tracto corticoespinal lateral y se proyecta hasta segmentos cervicales, con funciones flexoras en los músculos de extremidades anteriores (b). Modificado de Bear [4, 11].

definido como el movimiento completo de la extremidad, que comienza con el despegue de la extremidad del suelo y termina con el subsecuente contacto con el suelo de la misma extremidad (figura 2.11) [17, 18, 19]. En animales cuadrúpedos la locomoción se caracteriza por el apoyo con el suelo de dos o tres extremidades al mismo tiempo, esto depende de la especie. En las ratas podemos observar la marcha lateral que consiste en una zancada, donde el orden del contacto de las extremidades con el suelo es: extremidad posterior izquierda, extremidad anterior izquierda, extremidad posterior derecha y extremidad anterior derecha [19].

En el movimiento se ven involucrados principalmente tres articulaciones: la cadera, la rodilla y el tobillo. En la fase de balanceo, al inicio del ciclo se presenta una flexión de las 3 articulaciones (F1), a la mitad del balanceo, la rodilla y el tobillo empiezan a llevar a cabo una extensión para mover el cuerpo delante de la cadera mientras la cadera permanece flexionada (E1), la fase de balanceo termina cuando hace contacto la pata con el suelo, acto seguido ocurre una flexión del tobillo y la rodilla (E2), así como una contracción de alargamiento de los músculos extensores

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

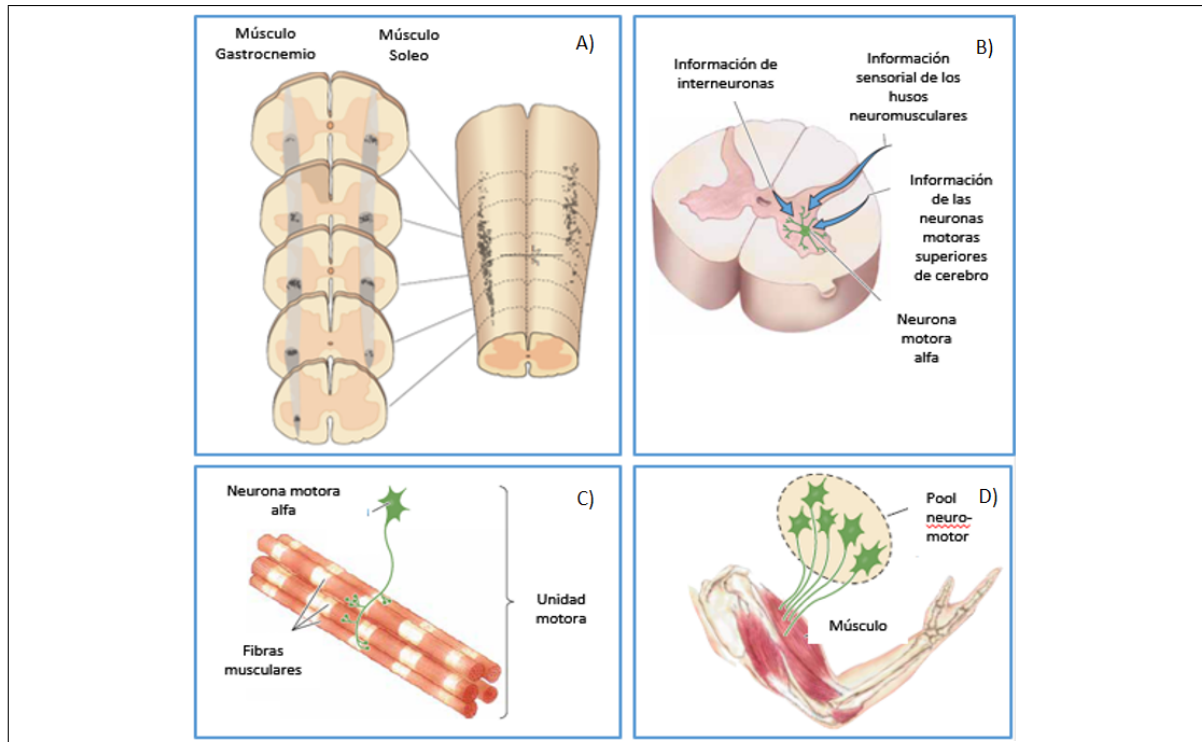


Figura 2.10: Esquema donde se representan las estructuras de la médula espinal (ME) involucradas en la regulación del movimiento voluntario. En el inciso A) observamos la esquematización de secciones transversales de la ME y la distribución del pool neuromotor a lo largo de los distintos segmentos del músculo Gastrocnemio y Soleo. La imagen B) ilustra los distintos tipos de entrada de información sobre las neuronas motoras alfa, El esquema C) muestra los elementos de una unidad motora, y el esquema D) representa lo que sería un pool neuromotor. Modificado de Bear y Purves [4, 7].

del tobillo y la rodilla debido a la carga del peso (figura 2.12) [15, 18, 20]. Mientras que la capacidad de flexibilidad y de resorte de los músculos permiten el movimiento del cuerpo sobre y por delante de la posición del otro pie; en este momento las tres articulaciones sufrirán una extensión para propulsar al cuerpo a moverse hacia adelante (E3) [15, 21].

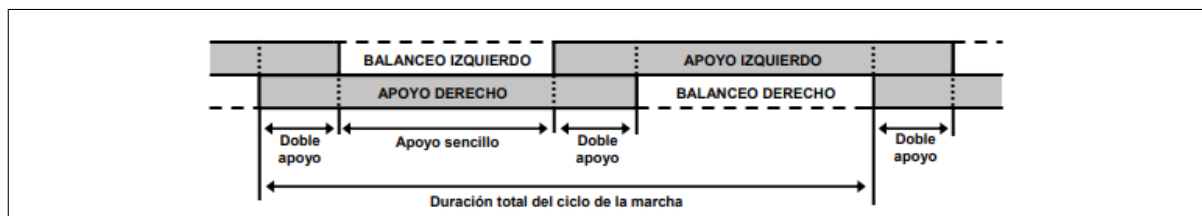


Figura 2.11: Esquema representativo de las fases de la marcha bipedal, aquí podemos observar el estado de ambas extremidades en coordinación durante la deambulación. Se observan las etapas de doble apoyo, la siguiente etapa de apoyo de una extremidad (Apoyo sencillo) mientras la otra se encuentra en balanceo, otra etapa de doble apoyo y la posterior alternancia entre las extremidades izquierda y derecha. Modificado de Hernández Stengele [22]

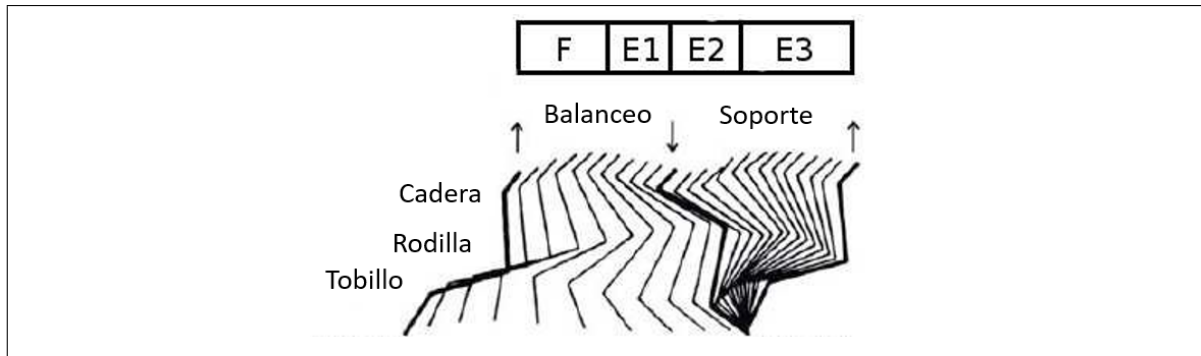


Figura 2.12: Esquema donde se observa el movimiento de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) involucradas en la marcha y su seguimiento en el movimiento completo de las fases (Balanceo y Soporte) y subfases (F, E1, E2 y E3) del ciclo de la marcha. Modificado de Harischandra [23].

Para lograr la locomoción, los músculos deben ser activados de una manera particular y específica, con el fin de tener una completa coordinación en la contracción y dilatación de los músculos flexores y extensores de las extremidades izquierda y derecha, y la coordinación y del tren anterior y el tren posterior; por esta razón la locomoción presenta patrones de coordinación y ritmicidad que son regulados en los niveles bajos del SNC y suelen ser modificadas en el transcurso de la marcha a través de retroalimentación sensorial sin intervención de las estructuras cerebrales (figura 2.13) [8, 19, 24, 25].

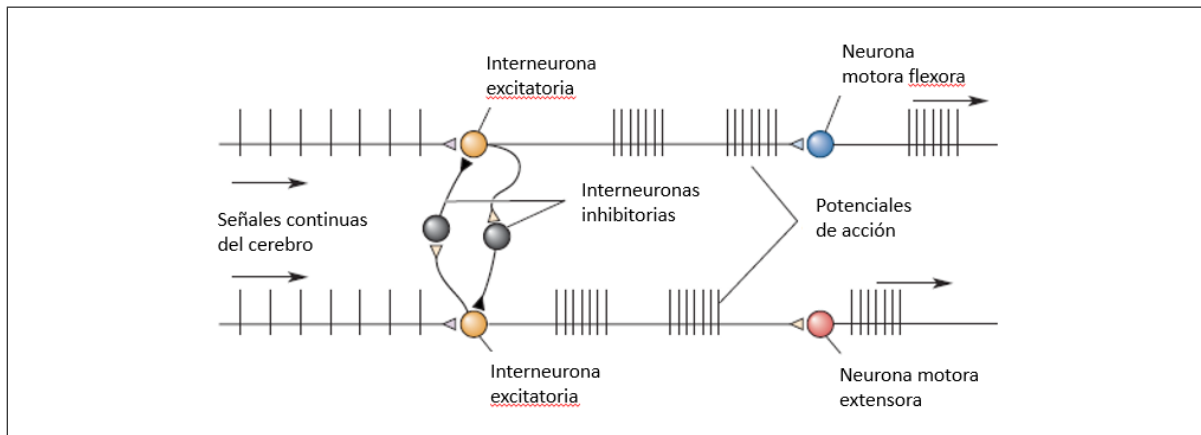


Figura 2.13: Esquema de un posible circuito generador de patrones. En este circuito la marcha se ve iniciada por señales de los comandos superiores, donde un impulso estable excita dos interneuronas que controlan los músculos flexores y extensores respectivamente. La actividad de las dos interneuronas se alterna gracias a la participación de otras interneuronas que inhibe a la otra y viceversa. Modificado de Bear [4].

La coordinación de estos patrones de acción es llevada a cabo por los centros generadores de patrones (CGPs), estos regulan la coordinación de cualquier tipo de movimiento rítmico, como nadar, caminar, masticar, etc. [15, 23]. Los CGPs son redes

neuronales responsables de generar la sincronización y el patrón de las señales de la compleja secuencia de actividad rítmica enviada a los músculos involucrados en la ejecución de la locomoción. Los CGPs son capaces de crear cualquier tipo de actividad rítmica en ausencia de retroalimentación sensorial. La información sensorial usualmente es usada para modificar la actividad sobre la marcha [15, 16, 23].

Esta coordinación se da a través de la intervención de diversos elementos comunes en los distintos CGPs, como: la existencia de neuronas marcapaso que disparan eventos endógenos rítmicos (bursting) y marcan el paso a interneuronas excitatorias e inhibitorias, para coordinar la activación e inhibición de los músculos. Otro elemento es el patrón de interconexiones entre neuronas, donde algunas interneuronas cruzarán la línea media y permitirán la coordinación de los circuitos de un asta ventral con la otra (figura 13), mientras que, otras interneuronas tendrán interacción con otros segmentos o circuitos locales, permitiendo la coordinación entre ellos [15, 21, 26, 27].

Los CGPs involucrados en la marcha de la rata se encuentran distribuidos en la zona lumbar de la ME, en el plano longitudinal entre los segmentos L1 al L5. En el plano transversal su localización no es muy clara pero se cree que se ubican en la zona ventral [16, 28]. Tiene un gradiente de excitabilidad rostrocaudal, siendo mayor en los segmentos más rostrales, que se consideran son los que dirigen todo el ensamblaje [16]. La principal vía reguladora de estos CGPs es a través de neuronas serotoninérgicas y glutamatergicas de la formación reticular que proyectan directamente sobre interneuronas y motoneuronas de los CGPs, a su vez, las neuronas de la formación reticular reciben información de una región en el mesencéfalo, denominada región mesencefálica locomotora, regulada por el hipotálamo y los GB [16].

2.5. Lesión traumática de médula espinal

La LTME es el resultado de un traumatismo que sufre la ME produciendo pérdida tanto de sensibilidad como de la movilidad [29]. En Estados Unidos la incidencia anual es de 30 a 50 por millón de habitantes, por lo que se estima que son cerca 12 mil las personas lesionadas anualmente [31]. En México se estima que la incidencia anual de LTME es de 18.1 personas por millón de habitantes. La población más afectada son los jóvenes en edad productiva, entre 16 a 35 años de edad, lo cual tiene un impacto socioeconómico significativo socioeconómicamente [32]. Entre las principales causas de la LTME destacan los accidentes vehiculares, asaltos, accidentes en el trabajo, casa, deportes y actividades recreativas [29, 30]. Las lesiones pueden ocurrir a la altura de cualquier segmento espinal, y dependiendo del segmento afectado, será la gravedad ya que esto determinará que funciones del cuerpo quedarán afectadas o se perderán, pudiéndose presentar tetraplejía o paraplejía (figura 2.14) [31, 32, 33].

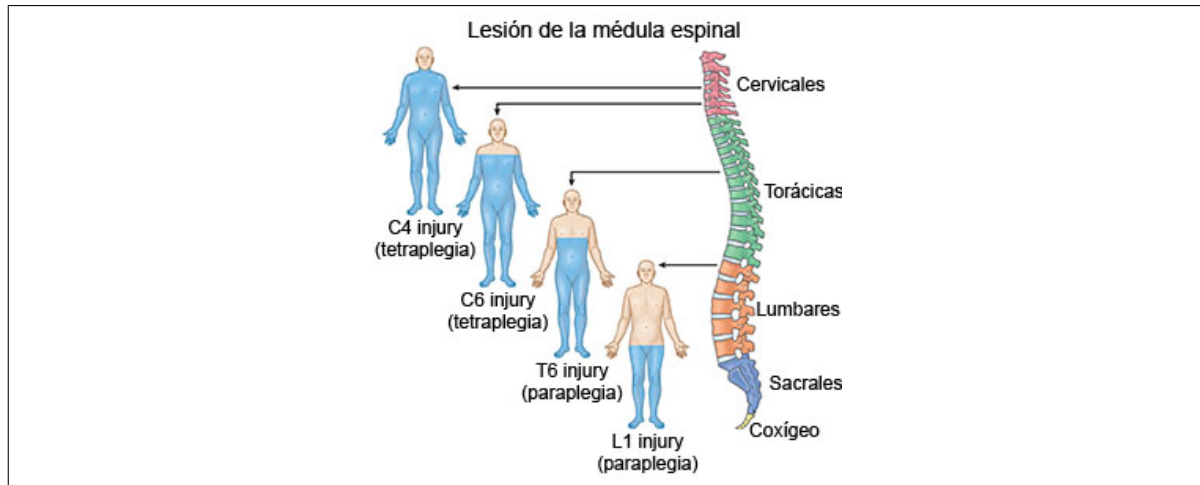


Figura 2.14: Esquema que representa las vértebras que componen a la médula espinal y las áreas del cuerpo que resultarían afectadas dependiendo del nivel de la lesión, pudiendo producir parálisis de ambas extremidades inferiores (paraplegia) o de las cuatro (tetraplegia). Recuperado de: <https://digital.hbs.edu/platform-rctom/submission/santa-clara-valley-medical-center-pioneering-spinal-cord-injury-care-with-telemedicine/>.

2.6. Modelos experimentales de la lesión traumática de médula espinal

Para poder estudiar la fisiopatología de la LTME y probar diferentes estrategias terapéuticas, se han desarrollado modelos animales que simulan los distintos tipos de LTME que pueden ocurrir en los seres humanos. Estos varían en la manera de infligir el daño, y la cantidad de tejido dañado [33, 34]. Existen dos tipos principales de lesión: las lesiones parciales y las lesiones completas [10, 12]. En humanos es común ver lesiones que pueden ser provocadas por caídas u otro tipo de impacto que comprime la ME; estos suelen ser representados con modelos donde se comprime o se realiza una contusión controlada a la ME. También pueden realizarse lesiones con objetos punzocortantes, las cuales son realizadas con secciones con tijeras quirúrgicas, bisturí y otros instrumentos [12].

Entre los modelos de lesión más usados encontramos la compresión, contusión, hemisección, laceración y sección completa [34]. En el modelo de compresión se simula la oclusión de canal espinal con la aplicación de presión persistente. Para realizar este tipo de lesión se usa un clip de aneurisma, un globo o unas pinzas [10, 34, 36]. La contusión se caracteriza por el uso de un impactador de caída libre con peso específico, donde la aceleración y el peso son variables controlables; este modelo es el más usado para reproducir las lesiones más frecuentes en humanos [10, 34, 36]. Los modelos de hemisección se caracterizan por ser unilaterales, en los cuales la he-

la médula izquierda o derecha es seccionada con una tijera o bisturí. Este modelo de LTME es muy utilizado para estudiar la regeneración axonal de los tractos corticoespinales y simula el tipo de lesión infringida por objetos punzocortantes [12, 36]. El modelo de laceración representa el efecto causado por una herida de bala, estos tipos de lesión ayudan a estudiar los mecanismos de inhibición y regeneración de los axones. Estas lesiones son las más difíciles de reproducir por el alto grado de precisión que requieren. La laceración se efectúa manualmente con microtijeras, bisturí [36, 37]. El modelo de sección completa reproduce el tipo de LTME severo y consiste en realizar corte transversal completo para producir la interrupción anatómico funcional de la ME, este modelo es muy utilizado para estudiar la regeneración axonal, la degeneración y la plasticidad [12, 34, 35].

Entre otros modelos menos usados encontramos las lesiones químicas entre las que se encuentra el uso de fotoquímicos para estudiar la isquemia, neurotransmisores como glutamato para estudiar la exitotoxicidad, el uso de ROS para estudiar el daño oxidativo a lípidos y proteínas, la aplicación de inyecciones de bromuro de etidio o virus (hepatitis) para estudiar la desmielinización, etc. [34] Estos modelos son útiles para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la LTME, las vías de señalización involucradas, o algún proceso en particular como a isquemia o la desmielinización. No obstante, su uso es limitado debido a que no reproducen completamente el daño producido por un traumatismo [34].

2.7. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal

La LTME desencadena una serie de eventos fisiopatológicos que suelen ser agrupados en daño primario y daño secundario [30, 31]. La lesión primaria es el daño mecánico que provoca la ruptura de tejido, de meninges y de vasos sanguíneos, así como el daño directo a las neuronas, mielina de los axones y nervios espinales [30, 38]. El daño secundario es la exacerbación del daño primario por la activación de diferentes procesos bioquímicos. A manera de secuencia temporal, la lesión se puede subdividir en fase aguda, subaguda y crónica [30].

La *fase aguda* suele durar de segundos a minutos y abarca tanto los eventos de daño primario como los de daño secundario, entre ellos encontramos los eventos hemorrágicos que producen edema, que en conjunto con la ruptura de membranas neuronales, producirá desregulación en la homeostasis de iones así como la liberación de neurotransmisores, afectando la excitabilidad y transmisión sináptica y la permeabilidad de las membranas; la falta de oxígeno (isquemia) y la hipoglucemia

son resultado de la interrupción del flujo sanguíneo, lo cual desencadena la disminución del adenosin trifosfato [30, 39, 40].

La *fase subaguda* dura días a semanas, los eventos de la fase aguda persisten y aparecen nuevos. La presencia de glutamato extracelular desencadena eventos reactivos promoviendo la acumulación de calcio intracelular, causando daño mitocondrial y aumento en la producción de ROS y RNS, activación de caspasas y calpainas que promueven apoptosis. A su vez, la disminución de ATP ocurrida en la fase aguda produce la liberación de contenido lisosomal y de enzimas como fosfolipasas, proteasas, ATPasas y endonucleasas, que promueven la muerte celular por necrosis. Las ROS y RNS también desencadenan el proceso de lipoperoxidación, resultado de la ruptura de las paredes celulares [30, 39, 40]. A la par de estos eventos, ocurre una respuesta inflamatoria donde neutrófilos, macrófagos y microglía producirán citosinas proinflamatorias, ROS y RNS que exacerbarán el daño, incrementando la zona de lesión [30, 39, 40]. Otro proceso aledaño es la gliosis reactiva, que consiste en la formación de la cicatriz glial por parte de la reactivación de células de la glia, en especial de los astrocitos que sufren cambios morfológicos y producen acumulación de glucoproteínas y proteoglicanos en la matriz extracelular [30, 39, 40].

La *fase crónica*, que dura de meses a años, los procesos degenerativos continúan y se extienden a lo largo del sitio de lesión. El proceso de gliosis reactiva continua y la cicatriz glial se consolida, los oligodendrocitos a su vez, producen moléculas inhibitorias de la regeneración axonal como Nogo, Maps y tenacina [30, 39, 40]. Ambos procesos conforman una barrera física, que conlleva efectos inhibitorios para la regeneración axonal. Esta barrera es un intento de detener el avance de la lesión y de evitar la formación de posibles reconexiones aberrantes, resultantes de los procesos de plasticidad espontánea que se presentan después de una LTME [30, 39, 40]. Los axones desmielinizados sufren degeneración walleriana (DW), proceso donde los axones degenerados y los debris celulares acumulados son removidos [30, 39, 41]. Al mismo tiempo, se terminan de consolidar las cavidades quísticas características de las LTME crónicas, que a su vez contribuyen a que el microambiente no sea permisivo para la regeneración axonal.

2.8. Características de la marcha después de una lesión traumática de médula espinal

Después de una LTME ocurre una inmediata pérdida del control de las funciones motoras y sensitivas, lo que incluye la pérdida sobre el control de la marcha y diversas alteraciones secundarias. Se produce una distrofia axonal en las neuronas cuyos

axones resultaron dañados, este daño se exagera generando degeneración neuronal anterógrada y retrograda (distal y caudal a la lesión), por lo que las señales de los mandos superiores (cerebro y tallo cerebral) quedan interrumpidas [42, 43]. La denervación conlleva a un estado de relativa inexibilidad debido a la falta de neuromoduladores que inician el movimiento, por lo que persiste una parálisis muscular flácida y pérdida de reflejos debajo del nivel de la lesión, lo cual se denomina *shock espinal* [44, 45, 46]. Después de unas semanas posteriores a la LTME se presenta hiperexcitabilidad en los circuitos distales, debido a la desregulación de los neurotransmisores y los potenciales de membrana, la falta de inhibición por parte de mandos superiores y la presencia de plasticidad axonal para compensar la pérdida de estimulación mediante la ramificación axonal y la formación de nuevos circuitos neuronales aberrantes, que termina produciendo espasticidad [8, 44, 46]. La espasticidad es una exageración de la parte tónica y fásica en los reflejos de estiramiento, resultado de la hiperexcitación de los reflejos espinales, lo que produce movimientos exagerados, mioclonias e hipertonia muscular [47]. Los músculos por su parte, pueden desarrollar fibrosis, atrofas, decremento en sus propiedades elásticas, en el número de sarcomeras, acumulación de tejido conectivo y alteración en sus propiedades contráctiles [44, 45, 46].

La plasticidad neuronal es importante cuando se presentan LTME en donde una porción del tejido no resulta dañada, como en las lesiones parciales, ya que debido a esta plasticidad, las señales de los mandos superiores pueden tomar vías alternas, o hacer relevos con axones que no resultaron dañados para hacer llegar la información a los circuitos locales, pero en una LTME donde todo el tejido resulta dañado, como en el modelo de sección completa, la información de los mandos superiores no podrá llegar a los circuitos locales distales [8, 48]. Distintos trabajos en gatos han mostrado la presencia de movimientos rítmicos bien organizados en el tren posterior después de una LTME aguda por sección completa de ME cuando una estimulación farmacológica es administrada, lo que indica la preservación en la funcionalidad de los CGPs después de la LTME [8]. Mientras que en modelos crónicos de LTME se observa una pérdida y/o reducción de estos movimientos. También se ha observado la presencia de movimientos de locomoción ficticios, lo que indica degeneración y un cambio funcional en los circuitos involucrados [8, 49]. Algunas técnicas de estimulación farmacológica en conjunto con entrenamiento han mostrado mantener en condiciones óptimas el funcionamiento de los CGPs después de una LTME por sección completa en gatos [8].

3. ANTECEDENTES

3.1. Recuperación funcional

Uno de los principales objetivos de las estrategias promotoras de la regeneración de la ME es la restauración de las funciones motoras. La regeneración funcional puede deberse en gran medida a una combinación entre la regeneración neuronal, axonal, ramificación axonal y a cambios en la plasticidad de las vías descendientes [49]. La ramificación axonal es un fenómeno que ocurre con normalidad en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP), al contrario de lo que se observa con la regeneración axonal, que se ve limitada en el SNC de los vertebrados superiores [49, 50]. En LTME por sección parcial, Tuszynski propone que la reinervación de las estructuras cerebrales para recuperar la funcionalidad puede ser lograda a través de la estimulación de los mecanismos de plasticidad compensatorios, ya sea a través de la ramificación de axones sanos que cruzan la zona de la lesión (inciso C de la figura 3.1), o, a través de la regeneración axonal a corta distancia de axones lesionados formando relevos con axones no dañados hacia la zona distal del sitio de lesión (inciso B de la figura 3.1) [50, 51]. En LTME por sección completa se propone que la reinervación puede ser lograda a través de la regeneración axonal a larga distancia, cruzando a la zona distal de la lesión (inciso A de la figura 3.1) [50]. Los enfoques experimentales para lograr la regeneración funcional han abarcado desde el uso de puentes y/o andamios celulares en la cavidad formada en el sitio de lesión, la estimulación con factores de crecimiento, eliminación de moléculas inhibitoras del crecimiento axonal, modificación en la expresión de las células para promover el crecimiento axonal, uso de células troncales, así la rehabilitación con ejercicios para aprovechar la plasticidad que se activa después de la LTME [49].

3.2. Técnicas de análisis de la recuperación funcional

La evaluación sensorial y motora es un factor importante para medir la eficacia de los tratamientos [52]. El primer método descrito con el fin de estandarizar los métodos de evaluación de la funcionalidad motora fue la escala de evaluación motora propuesta por Tarlov en 1954, quien realizó un análisis no cuantitativo en campo abierto que

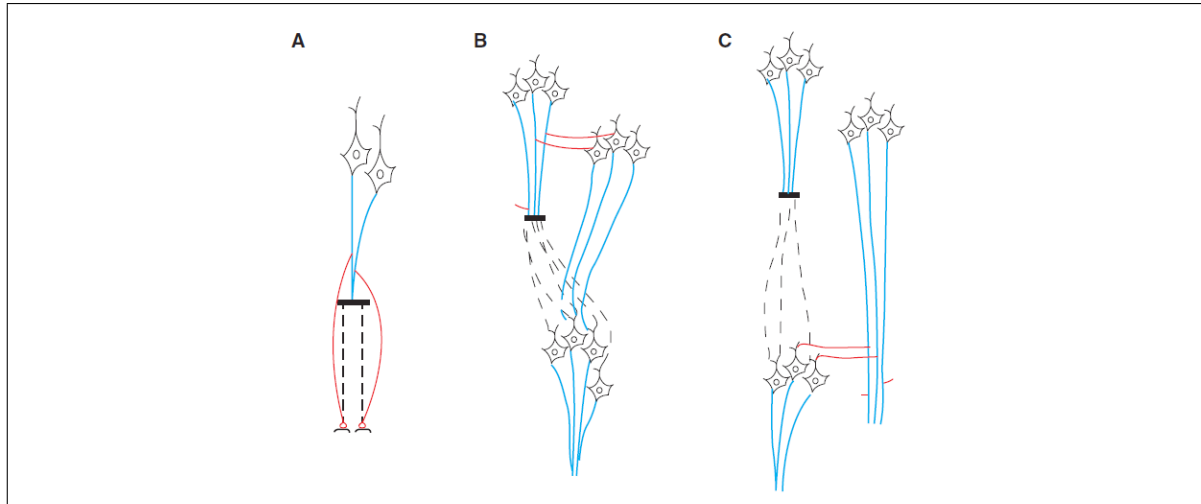


Figura 3.1: Esquemas de las estrategias diseñadas para promover la reinervación axonal propuestas por Tsuzyski. A) Regeneración axonal a larga distancia en un modelo de lesión traumática de médula espinal (LTME) por sección completa; B) Regeneración axonal a corta distancia en un modelo de LTME por sección parcial, y creación de relevos con vías descendentes remanentes; y C) Sprouting de los axones remanentes para mantener la conexión distal. En líneas rojas se observa el crecimiento axonal propuesto, en líneas azules los axones remanentes o intactos y en líneas negras punteadas el fenómeno de degeneración walleriana. Tomado de Giger [50].

consiste en una observación sencilla de la locomoción del animal mediante, una escala compuesta por 5 puntos, donde 0 representa ausencia de movimiento voluntario y 4 una recuperación completa de la función motora [52, 54, 10]. Otro intento con el fin de estandarizar las escalas de recuperación funcional fue el de Basso, Beattie y Bresnahan y cols. en 1995, desarrollaron una escala motora semi-cuantitativa a partir de la escala de Tarlov conocida como la escala de la BBB [55]. Esta escala permite evaluar de manera semicuantitativa y general la recuperación de la funcionalidad residual de las extremidades posteriores al considerar la amplitud del movimiento, coordinación, postura, colocación plantar, y la coordinación entre los miembros anteriores y posteriores [55]. Debido a lo anterior, la escala BBB permite evaluar la integridad de las vías corticoespinales modelos de LTME por sección parcial, como lo observó Basso al evaluar LTME por contusión de intensidad leve y moderada (figura 3.2). Cuenta con tres fases de recuperación y 21 puntos definidos por el comportamiento motor de la rata en un campo abierto. En la fase temprana (calificaciones de 0 – 7), se toma en cuenta desde el movimiento nulo, hasta las posibles combinaciones de movimiento ligero o extenso de las tres articulaciones (tobillo, rodilla y cadera), culminando con un movimiento amplio de las tres articulaciones. En la fase intermedia (calificaciones de 8 – 13), se observan movimientos amplios, repetidos y generalizados en las 3 articulaciones, la colocación dorsal y plantar de las patas, así

como el apoyo plantar con soporte del peso y la coordinación de las extremidades anteriores y posteriores. En la fase tardía (calificaciones de 14 – 21), se consolida la coordinación de entre las extremidades anteriores y posteriores, se ubica adecuadamente la pata y se presenta estabilidad de la posición de tronco y posicionamiento de la cola, y en el mejor de los casos, una marcha normal [55].

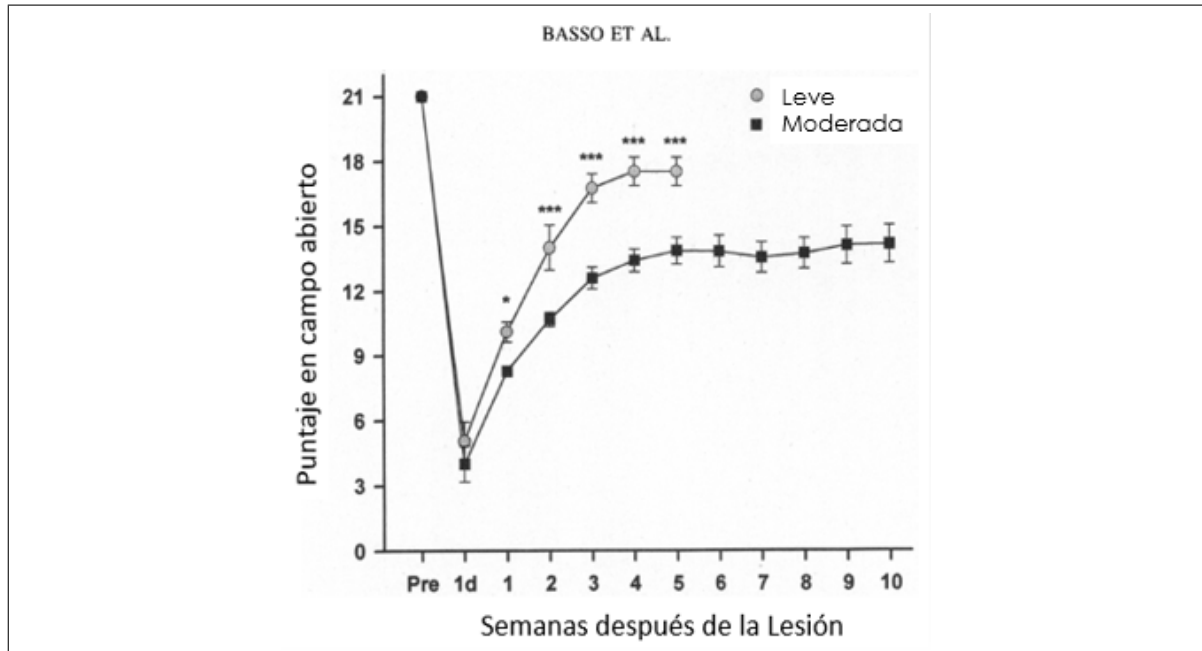


Figura 3.2: Evaluación de la función motora realizada con la escala Basso, Beatide y Brenahan (BBB), donde se muestra la curva de recuperación presentada por los dos grupos de animales lesión traumática de médula espinal (LTME) por contusión leve y el otro con LTME por contusión moderada sin tratamiento durante 10 semanas, en donde se pueden observar las diferencias entre los dos grupos. Modificado de Basso [55]

En 2002, M. Antri y cols., desarrollaron una modificación de la escala BBB para poder evaluar animales con LTME por sección completa, la cual evalúa la recuperación funcional intrínseca de los circuitos que controlan la función motora del tren posterior [56]. Esta escala modificada consta de 4 niveles con 22 categorías. En el primer nivel (calificaciones 0 – 1) corresponde a animales que no son capaces de soportar su propio peso y por lo tanto no pueden caminar, se consideran los movimientos reflejos como 1. En el nivel 2 (calificaciones de 2 – 9) toma en cuenta la ritmicidad, consistencia, coordinación, así como la amplitud de los movimientos efectuado [56]. El nivel 3 (calificación de 10) se caracteriza por una clara alternancia y amplitud de los movimientos, así como por un soporte de peso ocasional. En el nivel 4 (calificaciones de 11 – 22) se observa un mayor apoyo plantar con el suelo, junto con soporte de peso corporal y presencia de movimientos rítmicos alternados en sus extremidades poste-

riores hasta observar una marcha normal [57]. El uso de esta evaluación en modelos de LTME por sección completa nos permite observar con mayor claridad la mejoría en la recuperación funcional (figura 3.3) [56].

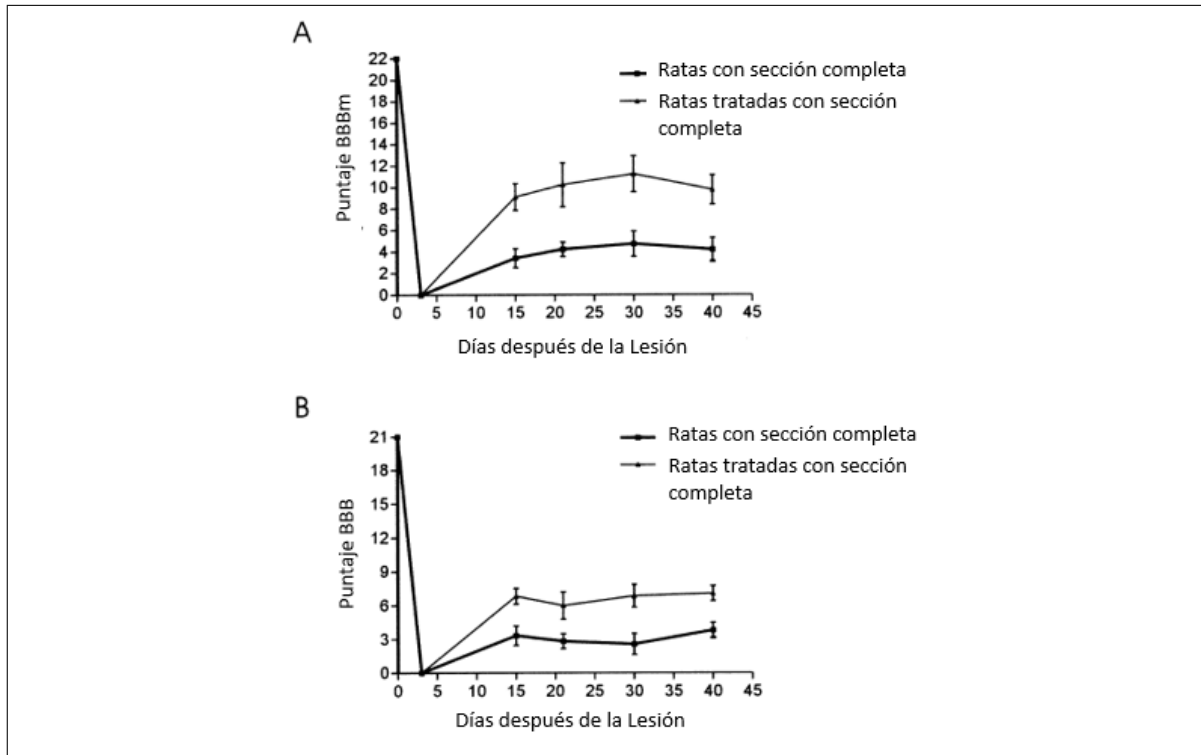


Figura 3.3: Evaluación de la escala Basso, Beatide y Brenahan (BBB) (B) y su versión modificada (BBBm) (A) de ratas con una lesión traumática de médula espinal (LTME) por sección completa, con o sin tratamiento con Quipacina para estimular los centros generadores de patrones responsables de la coordinación de las extremidades posteriores. La comparación de los grupos, ratas tratadas y ratas con LTME se llevó a cabo los días 3, 15, 21, 28 y 43, donde se observa la curva de recuperación en ambos grupos, siendo más evidente al utilizar la escala BBBm. Modificado de Antri [56].

Otros análisis que suelen ser usados ocasionalmente incluyen el plano inclinado desarrollado por Alex Rivlin y cols. en 1977, el cual permite evaluar el control postural del animal para mantener el equilibrio [57, 58]; el análisis de las huellas o footprints desarrollado por Cheng y cols. en 1997, donde se observa el apoyo plantar, coordinación y la fuerza de soporte [52, 10, 59]; y la prueba de la gradilla, que puede ser tanto horizontal como inclinada, donde se mide la habilidad de integración sensoriomotora para evitar caer entre las rejillas de la gradilla [52, 58, 59].

Tanto las escala BBB y BBBm, como las otras pruebas de evaluación mencionadas presentan limitaciones cuantitativas, ya que son pruebas subjetivas que dependen del evaluador, por lo que en los últimos años se han buscado y desarrollado pruebas y métodos de evaluación más precisas y objetivas. Uno de ellos es el registro cinemáti-

co de la marcha, que consiste en el rastreo del movimiento de las articulaciones involucradas en la marcha (cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y la falange del quinto metatarsiano) con ayuda de una grabación de video, para después realizar un análisis computacional del movimiento, para lo cual se evalúan las fases de balanceo y soporte que componen el ciclo de la marcha a través de las mediciones de los ángulos, desplazamiento, altura y longitud, así como la velocidad de los movimientos (figura 3.4 y figura 3.5) [60, 61, 62, 63, 64]. La mayoría de ellos se efectúan con la ayuda de una caminadora y la suspensión del animal, mientras que otros se realizan con la deambulación del animal sobre una base de acrílico [60, 64].

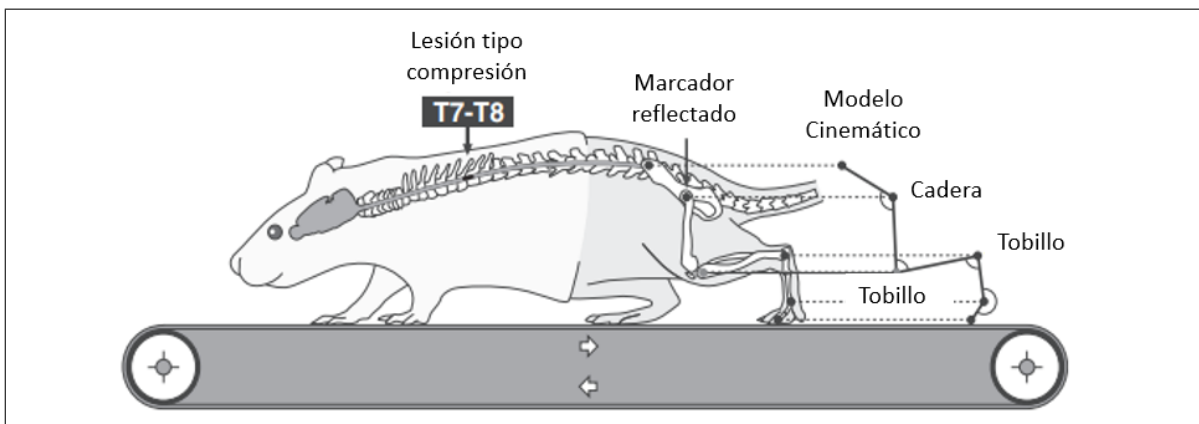


Figura 3.4: Esquema representativo de un análisis cinemático de la marcha del tren posterior después de una lesión traumática de médula espinal (LTME) por compresión, donde se aprecia el seguimiento de las articulaciones señaladas (cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo), así como los ángulos considerados para poder evaluar la mejoría en función locomotora. Modificado de Alluin [63].

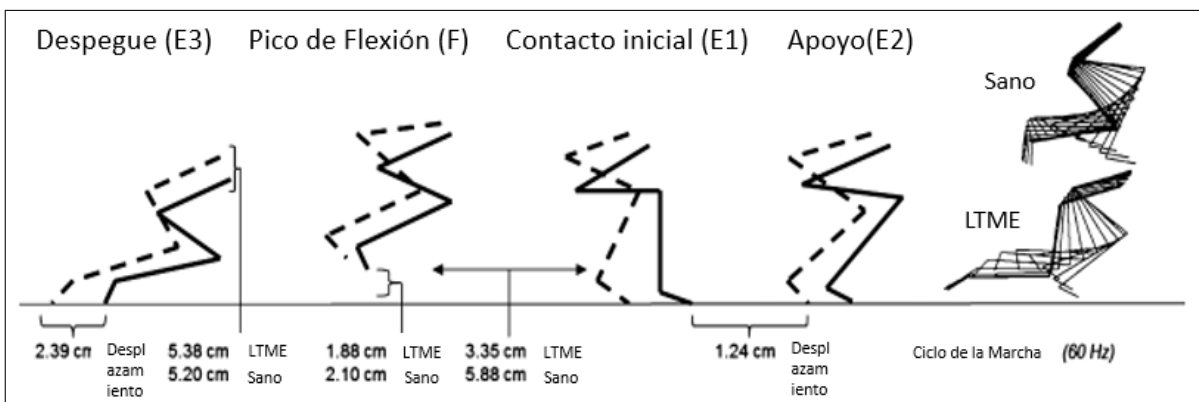


Figura 3.5: Análisis cinemático de la marcha. Se aprecia los trazos de las articulaciones involucradas en la marcha, antes (líneas negras continuas) y después de 3 semanas de una lesión traumática de médula espinal (LTME) por contusión leve (líneas negras punteadas). El análisis se utilizó para observar el movimiento durante las fases que componen el ciclo de la marcha (E3, F, E1 y E2). En ella se contrasta el desplazamiento de la extremidad completa en cada una de las fases. Modificado de Hansen [64].

Existen pruebas electrofisiológicas que también son consideradas pruebas de precisión para evaluar la funcionalidad, como los registros electromiográficos y los potenciales evocados. Los registros electromiográficos consisten en el uso de electrodos en músculos agonistas y antagonista involucrados en la marcha, que permiten obtener el registro de su actividad, caracterizar el patrón de activación de los músculos y los circuitos locales involucrados en ello (figura 3.6) [53]. Los potenciales evocados pueden ser motores (MEP) o somatosensoriales, los SSEP permiten determinar la integridad de las vías involucradas en los reflejos, mientras que en los MEP permiten evidenciar la funcionalidad descendente de los tractos espinales involucrados (3.7) [53, 65].

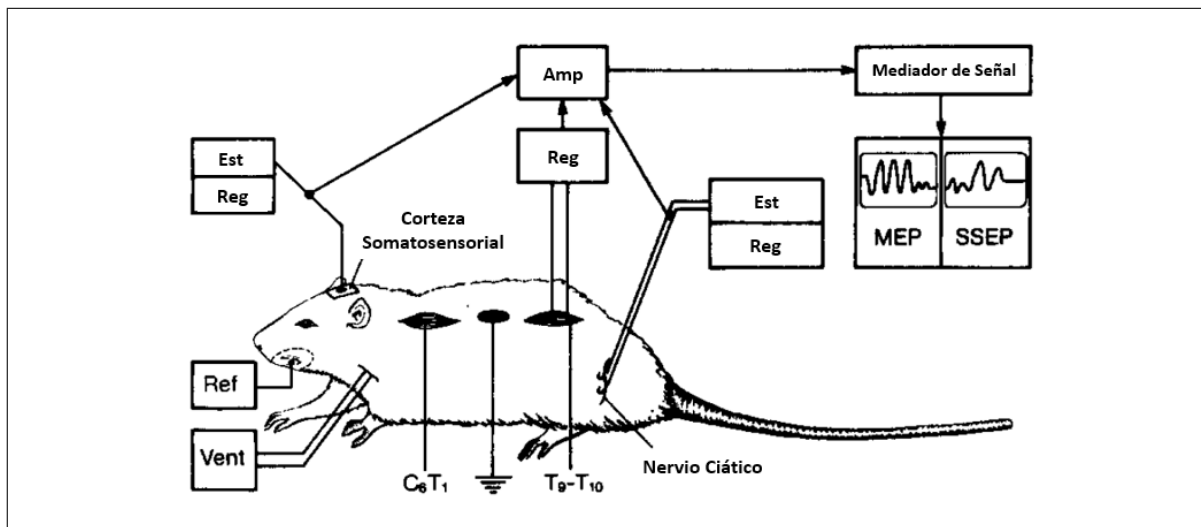


Figura 3.6: Registro electromiográfico A) Músculos iliopsias izquierdo (l IP), tibialis anterior izquierdo (l TA) y tibialis anterior derecho (r TA), Antes de una LTME (A1), 15 días después de la lesión (A2) y 22 días después de la lesión (A3); B) Esquema del registro promedio de los músculos flexores y extensores antes de la LTME (B1) y después de la lesión (B2), en el e puede observar la descoordinación resultado de la LTME. Modificado de Antri [65]).

3.3. Tipos de tratamientos

Hoy en día no existe algún tratamiento eficaz para la LTME, esto se debe a la compleja fisiopatología y los muchos aspectos que el tratamiento debe abarcar para lograr una recuperación en las funciones perdidas, incluyendo la disminución de la muerte neural, área de cavitación, la recuperación del número de células neurales, la estimulación de la regeneración axonal, ramificación axonal y remielinización. Entre los distintos tratamientos que se han utilizado encontramos la administración de proteínas exógenas, trasplante de células y el injerto de tejidos.

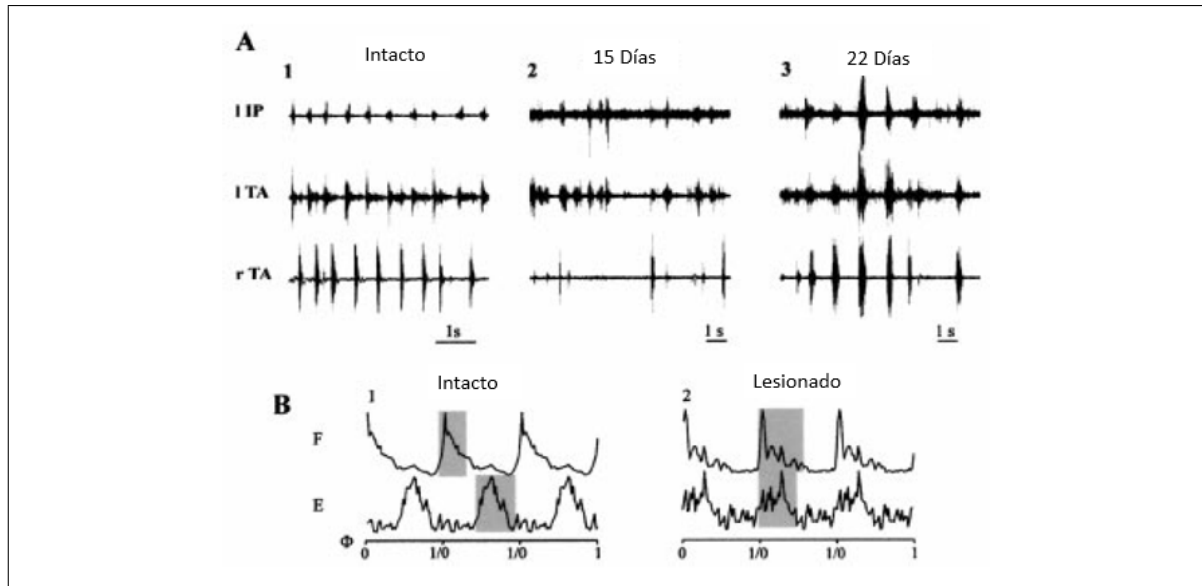


Figura 3.7: Técnica de registro del potencial motor evocado (MEP) y potencial somatosensorial evocado (SSEP). En los MEP, el estímulo (Est) se realiza en la corteza Somatosensorial y su registro (Reg) se realiza en la torácica 10. En los SSEP, el estímulo se realiza en el nervio ciático, y su registro se realiza a lo largo de la médula espinal, o en la corteza Somatosensorial. En ambos casos se aplica un nodo de referencia (Ref), y el animal se encuentra bajo condiciones de ventilación (Vent) controladas. Modificado de Fehlings [56].

3.3.1. Factores de crecimiento y enzimas exógenas

Entre ellos encontramos el uso de diferentes factores crecimiento o proteínas anti-inflamatorias, que confieren un efecto positivo para la regeneración [66]. El uso de neurotrófinas como BDNF, NGF, NT-3 y FGF en modelos de LTME han mostrado promover recuperación funcional, actuando como neuroprotectores, promoviendo la ramificación axonal y remielinización [67, 68, 69]. La administración de interleucina-10 promueve la mejoría en la recuperación funcional, debido a la neuroprotección que confiere y a la reducción del daño en la zona afectada [70]. El uso de anticuerpos específicos para moléculas inhibitorias de la regeneración, como Nogo-A (proteína asociada a la mielina) también promueve la mejoría en la recuperación funcional después de su administración, debido a que bloquea el efecto inhibitorio que desencadena Nogo-A al unirse a su receptor, promoviendo así la regeneración axonal [66]. El uso de la enzima condroitinasa ABC (ChABC) es uno de los más utilizados en los protocolos de regeneración después de una LTME. La ChABC es una enzima proveniente de la bacteria *Proteus vulgaris*, la cual rompe los condroitin sulfatos formados en la cicatriz fibroglial, permitiendo así el crecimiento axonal en el sitio de lesión [71, 72]. En distintos trabajos como los de Cheng y cols. en 2015, Xiong y cols. en 2016, Wang y cols. en 2011, Karimu-Abdolrezaee y cols. en 2010, Bradbury

y cols. en 2002 y 2010, se ha demostrado que su uso en dosis repetidas o únicas en fase crónica y aguda en distintos modelos de LTME promueve una mejoría en la función locomotora, incremento en la ramificación axonal a través de la zona de lesión e incrementando formación de nuevas conexiones, a través de la eliminación de los condroitin sulfatos [71, 72, 73, 74, 75, 76]

3.3.2. Trasplante de células

El trasplante de células es otro de los enfoques que han sido más desarrollados a nivel experimental para el tratamiento de la LTME. Entre las células más usadas encontramos, las células estromales de médula ósea (CEMO), células envoltentes de bulbo olfatorio (OECs), células progenitoras neurales (NPCs) y las células pluripotenciales inducidas (iPSCs). Entre ellas, las CEMO muestran una amplia gama de beneficios tróficos y reguladores, son de fácil obtención, presentan relativa seguridad debido a que no induce el desarrollo de tumores, y su uso no tiene implicaciones éticas, lo que las vuelven más atractivas que otros tipos de células para diferentes protocolos regenerativos [67, 77]. Su uso en distintos trabajos ha mostrado su capacidad para reducir apoptosis, producir neuroprotección, modular la respuesta inmune, promover neurogénesis, presentar diferenciación a linaje neural, promover la angiogénesis y la remielinización, así como reducir el área de cavitación. Hawryluk y cols. en 2012, Cantinieaux y cols. en 2013 y Qu y cols. en 2017, reportaron la expresión de diversos factores tróficos por parte de las CEMO como BDNF, NGF, VEGF y FGF que podrían verse involucrados en la neuroprotección y regeneración axonal después de una LTME [77, 78, 79]. Zurita y cols. en 2004 y 2006, en modelos crónicos de LTME por contusión, demostraron que el trasplante de CEMO mejoró y aceleró la recuperación funcional en las ratas trasplantadas, donde las CEMO mostraron diferenciación a linaje neuronal y reducción del área de cavitación [80, 81]. Liang y cols. y Luo y cols. en el 2009 y Okuda y cols. en 2016, probaron el trasplante de estas células, en modelos agudos de LTME por sección completa, donde observaron que su aplicación promovió una mejoría en la recuperación funcional, gracias a la regeneración axonal y diferenciación a un linaje neural [82, 83, 84]. Lu y cols. en 2004 reportaron el uso de las CEMO en LTME por sección de la columna dorsal agudos, donde también observaron que su presencia promovía la reducción en el área de cavitación, y favorece procesos de neuroprotección y regeneración axonal en la zona de lesión [85].

3.3.3. Injerto de tejidos

Uno de los enfoques dirigidos para promover el recrecimiento axonal y a la subsecuente mejoría de la función locomotora es el uso de trasplantes de tejido como el de

nervio periférico fresco (NPF) y predegenerado (NPP). Ramón y Cajal y cols. en 1928 y Aguayo y cols. en 1981 probaron que su uso promovía la regeneración de los axones a través del injerto y la reconexión funcional [86, 87]. Buoizianu-Anguiano y cols. en 2015, mostraron que después del trasplante de NPP durante 21 días, se favorece la recuperación funcional y la regeneración axonal a través del injerto [88]. Nordblom y cols. en 2009, Pierdona y cols. en 2012 y Lee y cols. en 2009, demostraron que el uso de injertos de NPF, promueve la mejoría en la recuperación funcional, a través de la regeneración axonal en el injerto [89, 90, 91]. Akeshasan y cols. en 1996 demostraron que el uso de segmentos de NPP facilitó el crecimiento y la velocidad del crecimiento neurítico a diferencia del uso de segmentos de NPF [92]. Esta mejoría en la funcionalidad motora se debe a que el injerto de nervio periférico actúa como guía y soporte para que los axones crezcan a través de él, ya que la presencia de las células de Schwann y de macrófagos, que promueven la remoción de debris, activan la liberación de diversas neurotrofinas como BDNF, NT-3, NGF y VEGF que producen neuroprotección y favorecen el crecimiento axonal, lo que se puede reflejar en una mejoría en la funcionalidad motora [93].

3.4. Tratamientos con enfoques combinados

A pesar de que se han reportado gran variedad de tratamientos como los antes mencionados, no existe alguno que produzca la recuperación de las funciones perdidas en su totalidad. Debido a esto, distintos protocolos han adoptado enfoques combinados con el uso de puentes o andamios, células mesénquimales o progenitoras y factores de crecimiento. El uso combinado de los tratamientos ha mostrado abarcar distintos aspectos de la fisiopatología necesarios a tratar para promover la regeneración después de una LTME, que a su vez han mostrado mayor efectividad en la recuperación funcional comparado con sus usos individualmente.

3.4.1. Tratamientos combinados con el uso de nervio periférico

El trasplante de NPP y NPF ha sido probado en distintas ocasiones en combinación con distintos tratamientos. Buzoiano-Anguiano y cols. en 2015, utilizó el injerto de NPP 21 días en conjunto con CEMO, observaron una mejoría significativa en la recuperación funcional y un aumento en la mielinización y regeneración axonal, tanto rostral como caudal a los dos meses del trasplante [88]. Tsai y cols. en 2005, así como Theisen y cols. en 2017, observaron una mejoría en la recuperación funcional después de injertar NPF con FGF, así como aumento en la regeneración de axones corticoespinales a través del injerto [96, 97]. En la mayoría de las veces, el uso de nervios ha

sido utilizado con combinación con la enzima ChABC. Paul y cols. en 2017 y Houle y cols. en 2006, mostraron que las fibras axonales fueron capaces de regenerarse a través del injerto de un NPP, además, observaron que la capacidad de los axones para salir del injerto al tejido del hospedero fue aumentada después de su trasplante combinado con ChABC [94, 95]. En otro trabajo de Paul y cols. en 2015, probaron que la combinación de NPF, ChABC y FGF promovía una mejoría en la regeneración axonal y en el registro electromiográfico del esfínter uretral, en comparación con el grupo sin la enzima [98]. Así mismo Tom y cols. en 2008, 2009 y 2016, reportaron el uso de NPP en distintas combinaciones con ChABC y GDNF, ChABC y BDNF, o ChABC solamente, en los que se demostró que el uso de la ChABC promovía un microambiente más permisivo para la regeneración y la ramificación axonal, lo que a su vez permitió una mejoría en la recuperación funcional promovida por la regeneración axonal al utilizarla con combinación con GDNF, o una mejoría en la reconexión axonal al combinarlo con BDNF [99, 100, 101].

3.4.2. Tratamientos combinados con el uso de la condroitinasa ABC

La ChABC no solo ha sido utilizada en conjunto con injertos de nervio. Fouad y cols. en 2005 y Xiong y cols. en 2016, reportaron su uso en conjunto con células OECs y CEMO respectivamente, Fouad y cols. aplicaron un tratamiento triple de OECs, con células de Schwann en matrigel y la enzima ChABC, mientras que Xiong y cols. usaron a las CEMO trasfectadas con gen de aumento de expresión de BDNF, ambos observaron un aumento en la recuperación funcional, regeneración axonal y en la remielinización [102, 74]. Wang y cols. en 2011 y Shinozaki y cols. en 2016 probaron el uso de la enzima ChABC en conjunto con rehabilitación tarea-específica y con una caminadora, donde también observaron recuperación funcional correlacionada con el aumento de la ramificación y regeneración axonal [75, 103]. Karimi-Abdolrezaee y cols. en 2010 y Xia y cols. en 2017, utilizaron la enzima ChABC en combinación con trasplante de NPCs y factores de crecimiento (EGF, bFGF, PDGF-AA) por parte de Karim, y microfibras de electrospinning con dibutiril cíclico AMP (bucladesina) por parte de Xia, donde ambos, además de observar recuperación funcional, también observaron remielinización, ramificación axonal y la reducción de la cicatriz glial [76, 104].

3.4.3. Tratamientos combinados con el uso de células estromales de médula ósea

El uso de CEMO, como se mencionó anteriormente, ofrece muchas ventajas para su uso en tratamientos combinados y ha sido reportado en distintos tipos de combinaciones. Hejcl y cols. en 2010, reportaron el uso de CEMO sembradas en un hidrogel de metacrilamida donde observaron mejoras significativas en la recuperación funcional en el grupo con la combinación, mayor preservación del tejido y regeneración axonal a través del hidrogel [105]. Lu y cols. en 2007 y Kadoya y cols. en 2009, probaron el uso de CEMO transfectadas con NT-3, donde observaron que las células disminuyeron la cavidad cística, revascularización y promovieron la regeneración axonal a través de la cicatriz [106, 107]. Lu y cols. en 2005 y Koda y cols. en 2009 transfectaron CEMO con expresión de BDNF, donde ambos observaron mejoras en la recuperación funcional y un aumento en el número de fibras axonales regeneradas en el grupo con células transfectadas [85, 108]. Zeng y cols. en 2011 y Chen y cols. en 2014 probaron las CEMO con andamios de Gelatin sponge (GS), PLGA y otro en ME acelular, donde demostraron que la combinación de ambas estrategias ofrecía una mayor recuperación y regeneración axonal en comparación de los grupos de andamios sin células, así como mejoras significativas comparados con el grupo control [109, 110].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día la LTME no tiene cura ni tratamiento eficaz que ofrezca una recuperación completa de las funciones perdidas. En algunos estudios se ha observado cierto grado de recuperación funcional después del uso de tratamientos únicos, pero no han sido suficientes para promover resultados consistentes, y menos con su uso en modelos de LTME por sección completa en fase crónica. Por lo que, se han intentado diferentes combinaciones de tratamientos con el fin de incidir sobre mas procesos fisiopatológicos de la LTME a fin de aumentar la recuperación funcional en comparación de su uso por separado en los tratamientos únicos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál sería la combinación terapéutica adecuada para lograr este objetivo.

5. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que algunos tratamientos únicos como el uso del NPP, CEMO y ChABC, han demostrado promover una regeneración axonal y una remielinización a través de diversos mecanismos, favoreciendo a la recuperación de la función locomotora, pero de una manera insuficiente para obtener una recuperación total de las funciones perdidas después de una LTME. En distintos trabajos se ha observado que el uso del NPP, CEMO y la ChABC en combinación con otros tratamientos, han mostrado un mayor incremento en la regeneración y remielinización axonal, a comparación de su uso como tratamientos únicos, promoviendo así un mayor efecto en la recuperación funcional motora. No obstante, estas 3 estrategias no han sido empleadas en combinación después de una LTME en fase crónica y debido a sus diferentes

mecanismos de acción, esto podría incrementar el grado de recuperación motora.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El uso del tratamiento combinado de NPP, CEMO, y la enzima ChABC, promoverá una mayor recuperación de la función motora del tren posterior en comparación con el tratamiento combinado de NPP con CEMO sin la enzima, y de los tratamientos únicos con CEMO o NPP, en ratas con LTME por sección completa y crónica?

7. HIPÓTESIS

El uso combinado de NPP, CEMO y la enzima ChABC favorecerá en mayor grado la recuperación de la función motora del tren posterior en comparación con el uso combinado de NPP con CEMO sin la enzima, y de los tratamientos únicos con NPP o CEMO, en un modelo LTME por sección completa y crónica.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de tratamientos únicos con NPP o CEMO, y de tratamientos combinados de NPP y CEMO, con o sin la ChABC en la recuperación de la función locomotora del tren posterior en ratas con LTME por sección completa y crónica.

8.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tratamiento único con NPP o CEMO sobre la recuperación de la función locomotora utilizando la escala BBB, BBBm y la cinemática de la

- marcha.
2. Evaluar el efecto del tratamiento combinado con NPP y CEMO sobre la recuperación de la función locomotora utilizando la escala BBB, BBBm y la cinemática de la marcha.
 3. Evaluar el efecto del tratamiento combinado con NPP y CEMO sobre la recuperación de la función locomotora utilizando la escala BBB, BBBm y la cinemática de la marcha.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL

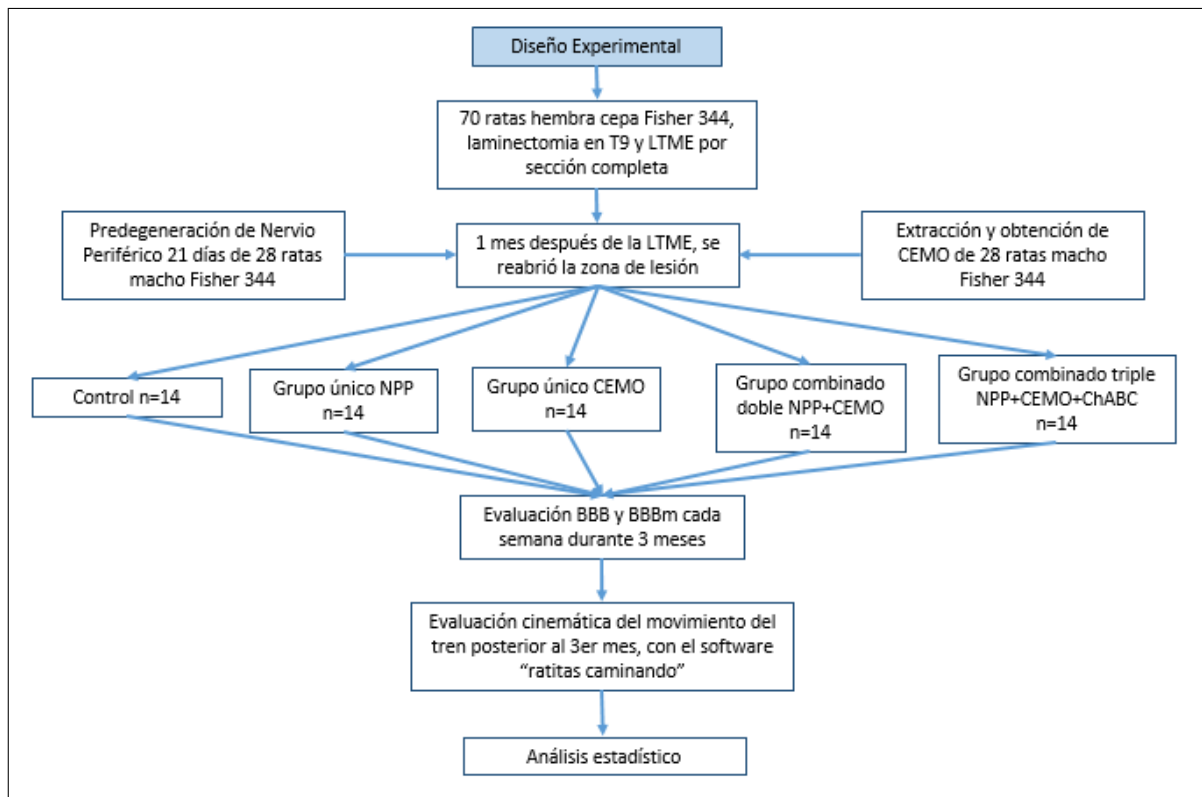


Figura 9.1: Diagrama de flujo del diseño experimental de este trabajo. Torácica 9 (T9), lesión traumática de médula espinal (LTME), células estromales de médula ósea (CEMO), nervio periférico predegenerado (NPP), condroitinasa ACB (ChABC), Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), Basso, Beattie, Bresnahan modificada (BBBm).

10. METODOLOGÍA

10.1. Población

Ratas Fisher 334.

10.2. Muestra

Se utilizó un total de 126 ratas Fisher 344 con una edad entre 8-10 semanas y un peso entre 200 y 250 g. Para los procedimientos de LTME y trasplante fueron utilizadas 70 hembras divididas al azar en 5 grupos, como donadores de nervio ciático fueron utilizados 28 machos y para la obtención de CEMO se utilizaron 28 machos.

10.3. Consideraciones éticas

El presente trabajo fue autorizado por el Comité Local de Investigación y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número de registro R-2014-3601-9. El manejo y cuidados de los animales se llevaron a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062.

10.4. Lesión de médula espinal

Se produjo una LTME en ratas hembra de la cepa Fisher 344, de entre 200 y 250 gramos de peso. Antes del procedimiento quirúrgico las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg) intramuscular. Una vez que los animales entraron en plano anestésico se cortó longitudinalmente la piel y los músculos paravertebrales para exponer las apófisis espinosas torácicas y posteriormente se expuso la ME realizando una laminectomía en la vértebra torácica 9 (T9). Se cortó sagitalmente la porción dorsal del saco dural, cuidadosamente se realizó la sección completa transversal de la ME expuesta utilizando tijeras de microcirugía, y se verificó la ausencia de tejido remanente y que la lesión haya sido completa. Se cerró la duramadre con un punto (nylon nueve ceros), y se colocó un fragmento de

tejido adiposo subcutáneo para evitar la formación de cicatriz de tejido fibronectivo. El músculo y la piel se cerraron por planos.

10.5. Lesión del nervio periférico para trasplante

Veintiún días antes del trasplante, 28 ratas machos de entre 250 – 300 gramos de peso fueron usadas como donadoras de nervio periférico. Las ratas fueron anestesiadas como se describió previamente, se les realizó una incisión longitudinal y disección por planos en ambos muslos de la rata para identificar el nervio ciático, que posteriormente fue sometido a sección transversal total en la porción cefálica del muslo; el muñón caudal del nervio seccionado se fijó con un punto de sutura nylon siete ceros al músculo adyacente. El día del trasplante se anestesió a las ratas para extraer los segmentos del nervio ciático distal al corte de aproximadamente 2cm de longitud. El fragmento de nervio fue colocado en solución salina isotónica helada, hasta el momento del trasplante como NPP.

10.6. Obtención de células mesenquimales

Las CEMO se obtuvieron de ratas donantes de la sepa Fisher 344, de aproximadamente 200 a 250 gr de peso, a las que se les realizó eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal. Las dos extremidades inferiores (tibia y fémur) de cada rata se extrajeron con ayuda de material quirúrgico estéril, después se les retiró la piel y el músculo en condiciones de esterilidad para limpiar y obtener los huesos. La médula ósea fue obtenida a través de lavados repetidos con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) GIBCO, de ambos fémures y tibias con una jeringa de 3 ml. La médula obtenida se depositó en un tubo cónico de 15 ml (Sarsted). La muestra se centrifugó durante 7 minutos a 1300 RPM y 4°C para obtener las células; posteriormente, para extraer las CEMO se usó el gradiente de separación de Ficol (SIGMA) (3 ml), centrifugadas a 2000 RPM a 24°C durante 45 minutos. Las células obtenidas se sembraron en un frasco de cultivo de 75 cm² con 10 ml de D-MEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (FSB, GIBCO), 2 ml de L-glutamina (GIBCO), 2 ml de Antibiótico-Antimicótico (GIBCO) y 2 ml de aminoácidos no esenciales (GIBCO). Posteriormente se les colocó en una incubadora Water-Jacketed a 37°C con CO₂ al 5%, hasta que las células formaron una monocapa de fibroblastos. Después de la formación de la monocapa homogénea en el frasco de cultivo, se volvió a resembrar CEMO sobre la capa de fibroblastos y se mantuvieron durante 4 pases hasta su maduración.

10.7. Transplantes

Cuatro semanas posteriores a la LTME por sección completa, la lesión se reabrió el sitio de lesión, el tejido adiposo fue retirado y después de haber identificado la incisión dural, la lesión se reabrió longitudinalmente. La ME fue expuesta y se identificó la zona con la cicatriz fibrilial. Posteriormente las ratas fueron asignadas a uno de los cinco grupos experimentales. Al Grupo 1 (control, n=14) únicamente se reabrió la herida quirúrgica hasta observar el saco dural. En el Grupo 2 o grupo trasplantado con CEMO (n=14), se reabrió el saco dural y se removió cuidadosamente con tijeras de microcirugía la cicatriz de la ME retirando un segmento transversal de aproximadamente 4 mm, así como 1mm rostral y caudal adicional a los bordes de la cicatriz con ayuda de un bisturí, dejando un hueco de aproximadamente 6mm de longitud; se realizaron 2 inyecciones con 5 μ l cada una de medio DMEM (GIBCO) conteniendo 3×10^4 CEMO a cada lado de la ME parasagitalmente a una profundidad de 2 mm tanto rostral y caudal al borde del muñón respectivo. En el Grupo 3 o grupo trasplantado con NPP (n=14), se reabrió y se realizó la remoción de la cicatriz de la ME de la misma manera que en el grupo 2, en el hueco resultante de 6mm se trasplantó longitudinalmente 3 o 5 segmentos de NPP de 6mm de longitud; los implantes fueron fijados con fibrine glue (BAXTER). En el grupo 4 o grupo trasplantado con NPP+CEMO (n=14), se reabrió y se realizó la remoción de la cicatriz de la ME de la misma manera que en el grupo 2, en el hueco de 6 mm resultante se realizaron 2 inyecciones de CEMO en cada muñón como se describe previamente en el grupo 2, posteriormente, se trasplantó de 3-5 segmentos de NPP de 6 mm de longitud, los cuales fueron fijados con fibrine glue. Al grupo 5 o grupo trasplantado con NPP+CEMO+ChABC (n=14) se reabrió y se realizó la remoción de la cicatriz de la ME de la misma manera que en el grupo 2, además, al momento de realizar las 2 inyecciones de CEMO tanto en la zona rostral como caudal, como se describe en el grupo 2, se adicionó 6 μ l de la enzima ChACB (2 unidades/ml Seikagaku 100332 de Cape Cod), inyectando un total de 11 μ l, después el hueco fue rellenado con 3-5 trozos de NPP fijados con fibrine glue.

10.8. Evaluación de la función motora

La locomoción del tren posterior se evaluó tanto con la escala BBBm, que consta de 22 puntos divididos en 4 niveles, y evalúa la frecuencia, ritmicidad y alternancia de los movimientos con presencia o ausencia del soporte de peso corporal y apoyo plantar; así como con la escala BBB de 21 puntos divididos en 3 niveles, la cual

mide la amplitud del movimiento de cada articulación y de la zancada, postura y coordinación entre los miembros anteriores y posteriores. Cabe mencionar que los evaluadores desconocían el tratamiento asignado a cada animal. Los animales fueron evaluados y grabados con una cámara de video Nikon antes del trasplante, después del trasplante y cada semana durante las siguientes 13 semanas.

10.9. Cinemática de la marcha

Los animales se evaluaron mediante registro cinemático de la marcha a los tres meses después del trasplante. Se les colocó marcas de tinta indeleble con plumón (Sharpie®) sobre la piel tomando en cuenta la cresta iliaca y las articulaciones cadera, rodilla, tobillo y falange del quinto metatarso de ambas extremidades posteriores de los animales. Posteriormente cada uno de los animales se introdujo por separado, a una pasarela construida con paredes de acrílico transparente (60X5X5cm) donde se grabó la marcha de los animales con una videocámara digital comercial, tomando cuando menos 4 zancadas consecutivas (posteriores a la primera zancada de los animales para excluir la fase de inicio de la marcha, “arranque”), primero del animal marchando hacia la derecha y posteriormente a la izquierda, para observar el movimiento en las dos extremidades posteriores. Mediante un programa de computo (Total Video Converter) se obtuvieron fotografías digitales de cada uno de los cuadros de la grabación (30 cuadros / segundo). En las fotografías se determinó las coordenadas cartesianas de las marcas colocadas en las articulaciones de los animales, utilizando para ello el programa ImageJ (Figura 10.1), las coordenadas obtenidas se convirtieron de pixeles a centímetros mediante marcas de referencia (5 cm) colocadas en la pasarela. Esto se repitió para 5 animales de cada grupo de tratamiento, con la adición de una rata normal o sana, para fines comparativos.

Los valores en centímetros obtenidos se introdujeron a un software denominado *Ratitas caminado*, el cual fue diseñado en el CINVESTAV - IPN (Figura 10.2). El programa trabaja uniendo los puntos de las articulaciones, definidos por las coordenadas cartesianas, y exhibe todas las líneas resultantes del movimiento que ejecuta la extremidad del animal durante la marcha, lo que permite visualizar la secuencia de movimientos del miembro del animal durante la deambulación.

El programa proporcionó los datos correspondientes a los ángulos formados en ambas extremidades de la cadera, rodilla y tobillo durante la deambulación del animal. Con lo que se calculó la apertura de los mismos con una herramienta de ayuda del mismo programa, tanto para la fase de apoyo como la fase de soporte. Repitiéndose todo el proceso para 5 ratas representativas de cada grupo, y un grupo control.

Así mismo, el programa reconstruye el movimiento pendular que se forma en las

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

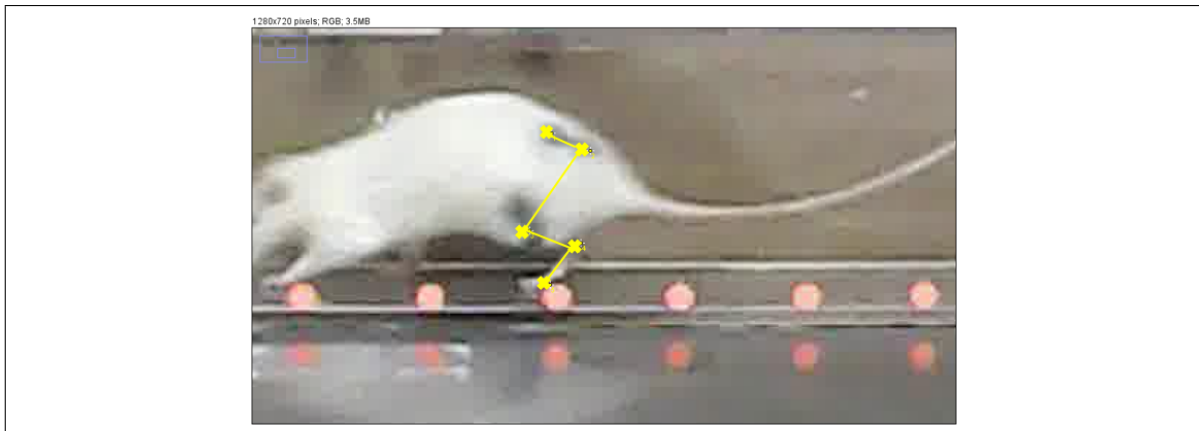


Figura 10.1: Representación gráfica del uso de la herramienta del programa Image J, para ubicar puntos y realizar la localización manual de la cresta iliaca y de las articulaciones, cadera, rodilla tobillo y falange del quinto metatarsiano, en cada una de las imágenes obtenidas de los videos de las ratas caminando dentro de la pasarela de acrílico. En la imagen se observa una rata normal

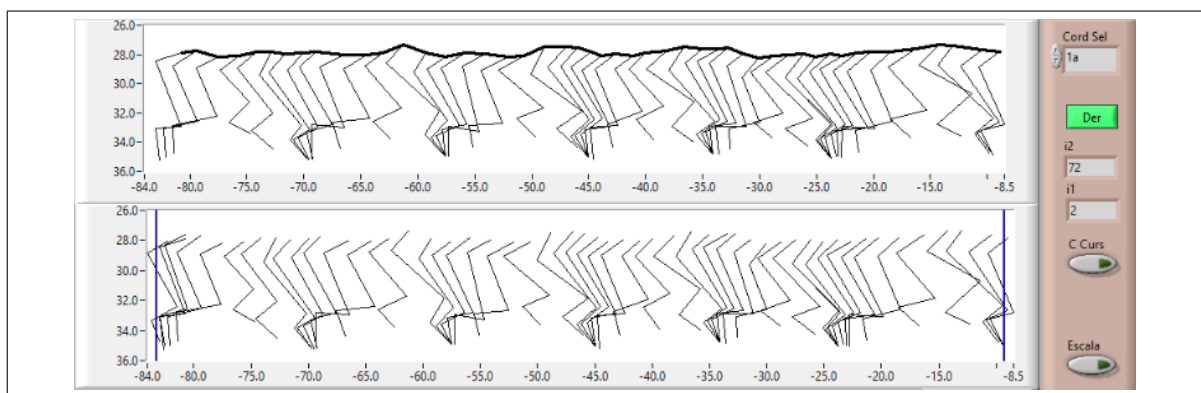


Figura 10.2: Trazo del movimiento completo de la marcha, donde se observa las líneas resultantes formadas por las articulaciones cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y falange del quinto metatarso, en la ejecución del movimiento de la extremidad izquierda de una rata normal obtenido con el programa “Ratitas caminando”.

extremidades (Figura 10.4). El movimiento péndulo es la apertura del movimiento completo de la extremidad desde la fase de apoyo (E2) hasta la siguiente fase de apoyo de la misma extremidad, pasando por E3, F y E1. La cresta iliaca es el eje longitudinal fijo, mientras que el tobillo funge como la referencia del punto en movimiento. Se obtuvo el movimiento del péndulo para las 5 ratas representativas de los grupos y su apertura en grados se midió con una herramienta del programa Image J.

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

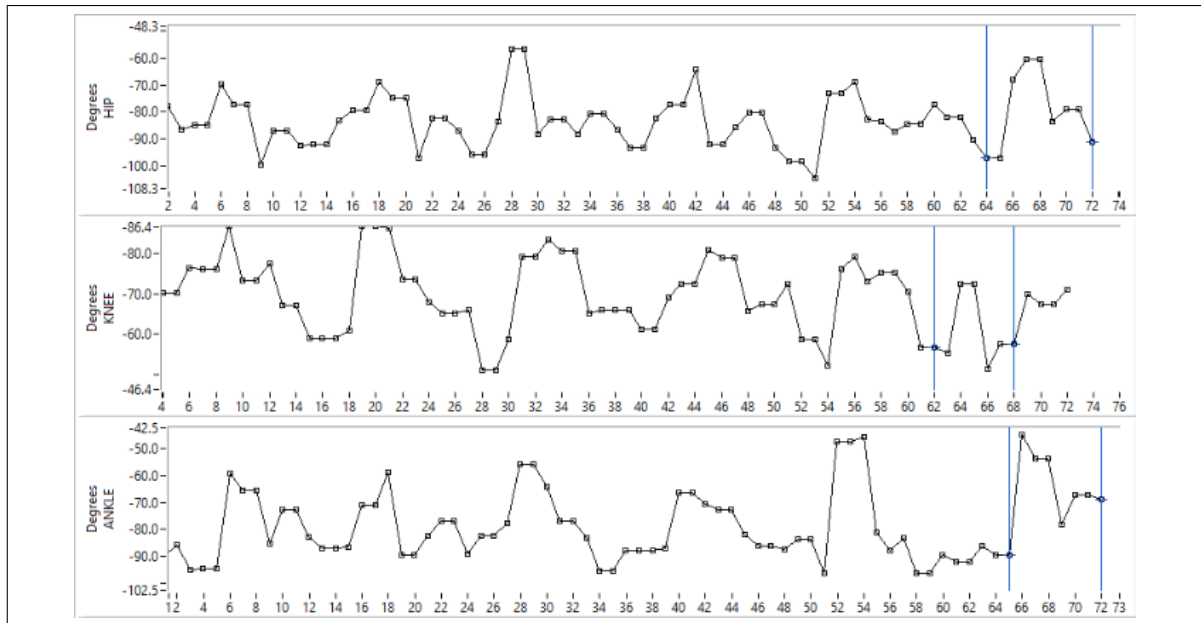


Figura 10.3: Visualización de la variación de la apertura de los ángulos de las articulaciones cadera, rodilla y tobillo sobre la marcha de una ratas normal en la extremidad derecha.

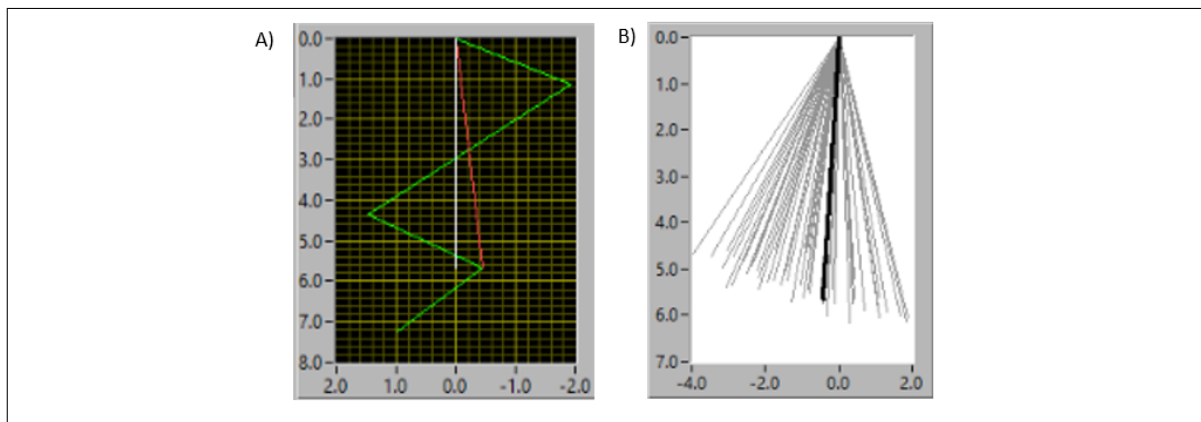


Figura 10.4: Representación gráfica del eje fijo formado en la cresta iliaca (línea blanca) y de su unión con el punto de referencia de movimiento, que es el tobillo (línea roja), inciso A). Ambos tomados para la reconstrucción del movimiento del péndulo, en el ciclo completo de la marcha, inciso B).

10.10. Análisis Estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se utilizó el programa GraphPad Prism 6. El análisis estadístico de las evaluaciones conductuales en campo abierto (BBB y BBBm) se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguida de la prueba post-hoc de Tukey para hacer la comparación múltiple e identificar la diferencia entre los 5 grupos después los 3 meses de tratamiento. El análisis estadístico de la apertura de ángulos de

balanceo, soporte y movimiento pendular de la cinemática de la marcha se efectuaron mediante un ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey, para poder observar las diferencias entre los 5 grupos experimentales incluidos. Posteriormente, se realizó un análisis de correlación de Pearson para observar la similitud en el uso de las tres pruebas, donde se comparó el porcentaje de recuperación obtenido por cada grupo de tratamiento en el último día de evaluación de la BBB estándar y BBBm, y el porcentaje de recuperación observado por cada grupo de tratamiento en el movimiento pendular de la cinemática de la marcha. En el presente estudio se consideró significativo una $P < 0.005$.

11. RESULTADOS

11.1. Evaluación funcional con la BBB estándar

Debido a que la BBBm no es una escala ampliamente utilizada en los pocos estudios que trabajan en lesión de ME, fue necesario evaluar a los grupos con la escala de la BBB propuesta por Bethie, Basso y Bresnahan en 1995, diseñada para su uso en modelos de contusión. Se observó que el grupo control obtuvo una calificación promedio de 1.8 en la escala de la BBB desde las primeras semanas, y de 1.75 la última semana, lo que se traduce a ausencia de movimientos o movimientos limitados en una o dos articulaciones, o amplio en una y limitado en la otra. Al hacer la comparación entre los grupos tratados contra el grupo control, se observó que todos los grupos que recibieron algún tratamiento obtuvieron un aumento significativo con una $P < 0.0001$ (Figura 11.1). El grupo trasplantado con CEMO obtuvo un puntaje promedio de 2.55 la última semana de estudio; el grupo NPP mostró un puntaje de 3.25, el grupo NPP+CEMO, obtuvo un puntaje promedio de 3.85, mientras que el grupo NPP+CEMO+ChABC presentó una calificación de hasta 4.18 en las últimas semanas de evaluación.

Al momento de comparar los grupos (Figura 11.1), se observó que el grupo NPP y ambos grupos combinados mostraron diferencias significativas cuando fueron comparados con el grupo CEMO (los tres grupos con una $P < 0.0001$). Al mismo tiempo los grupos combinados mostraron diferencias significativas al ser comparados con NPP ($P < 0.0001$). Entre ambos grupos combinados no se encontró diferencias significativas, pero sí una tendencia por parte del grupo NPP+CEMO+ChABC a obtener mayores calificaciones.

11.2. Evaluación funcional con la BBBm

Para poder evaluar la recuperación de la función locomotora en ratas con LTME por sección completa crónica en los diferentes grupos, se utilizó la escala BBBm propuesta por M. Antri y D. Orsal, en 2002, desarrollada especialmente para modelos de sección completa. El grupo control mostró ausencia de movimientos o movimientos limitados con calificaciones de 1.25, hasta alcanzar 1.62 en la última semana (Figura

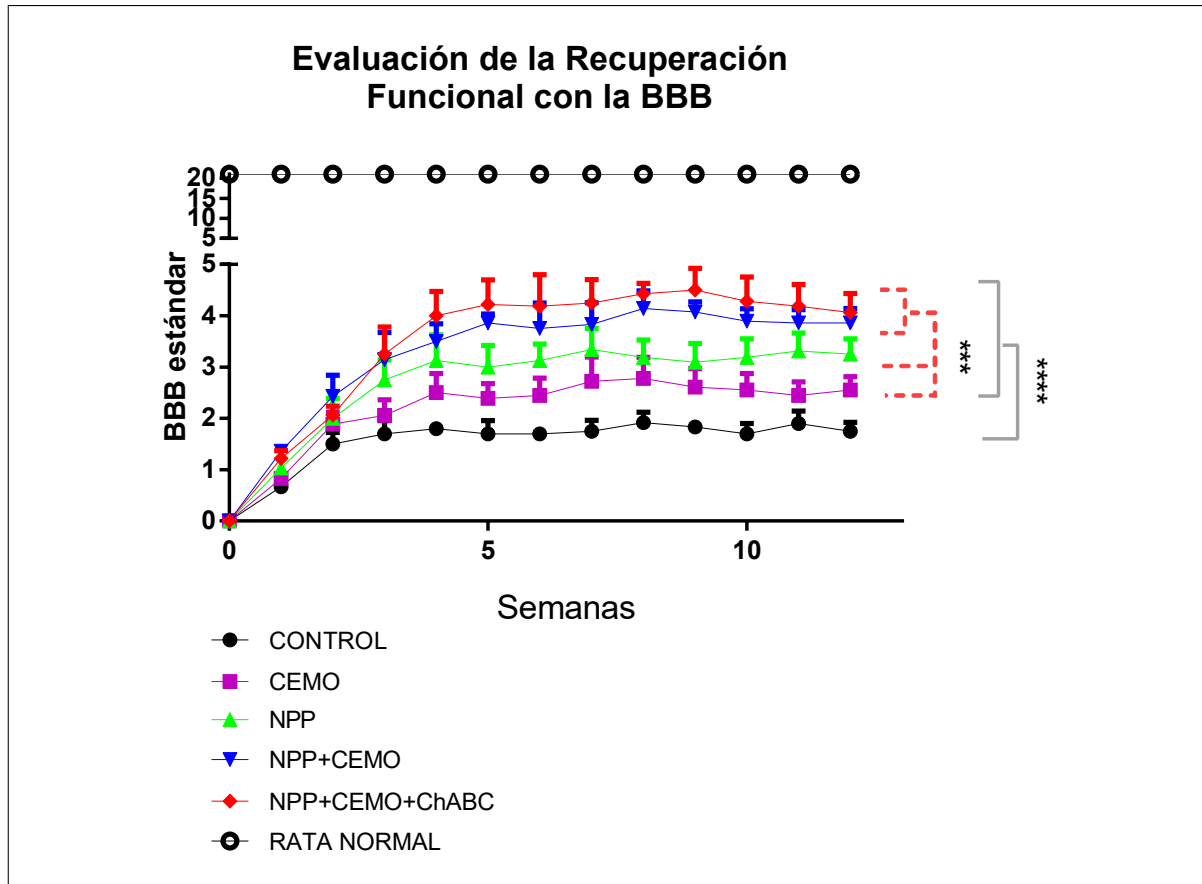


Figura 11.1: Evaluación de la recuperación funcional mediante la escala BBB estándar. Los grupos con mostraron mejoras significativas en sus puntuaciones en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$). Los grupos con tratamiento combinado mostraron mejoras significativas al ser comparados con los que recibieron NPP y CEMO ($P < 0.0001$). Cada punto representa el promedio \pm E.E. por grupo ($n=6$). Los braquets grises indican diferencias significativas vs grupo control y los braquets rojos punteados indican diferencias significativas entre grupos. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Nervio periférico predegenerado (NPP), células estromales de médula ósea (CEMO) y condroitinasa ABC (ChABC).

11.2). Todos los grupos que recibieron algún tratamiento incrementaron sus puntajes significativamente desde la tercera hasta la última semana en comparación con el grupo control, teniendo diferencias significativas ($P < 0.0001$). En las últimas semanas, el grupo que recibió tratamiento con CEMO alcanzó un promedio de 2.55 en la escala de la BBBm; el que recibió NPP obtuvo un incremento de hasta 3.7; el grupo con NPP+CEMO mostró un 5.12, mientras que el grupo NPP+NPP+ChABC obtuvo una puntuación de 5.47.

En la comparación entre grupos (Figura 11.2), el grupo que recibió el NPP y los grupos con tratamientos combinados mostraron diferencias significativas al ser comparados contra el grupo al que se le aplicaron las CEMO: NPP ($P < 0.001$), NPP+CEMO

y NPP+CEMO+ChABC ($P < 0.0001$). Así mismo, los grupos combinados mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo NPP: NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC ($P < 0.0001$). Aunque no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos con tratamientos combinados, se observó una tendencia a obtener calificaciones más altas por parte del grupo tratado con NPP+CEMO+ChABC.

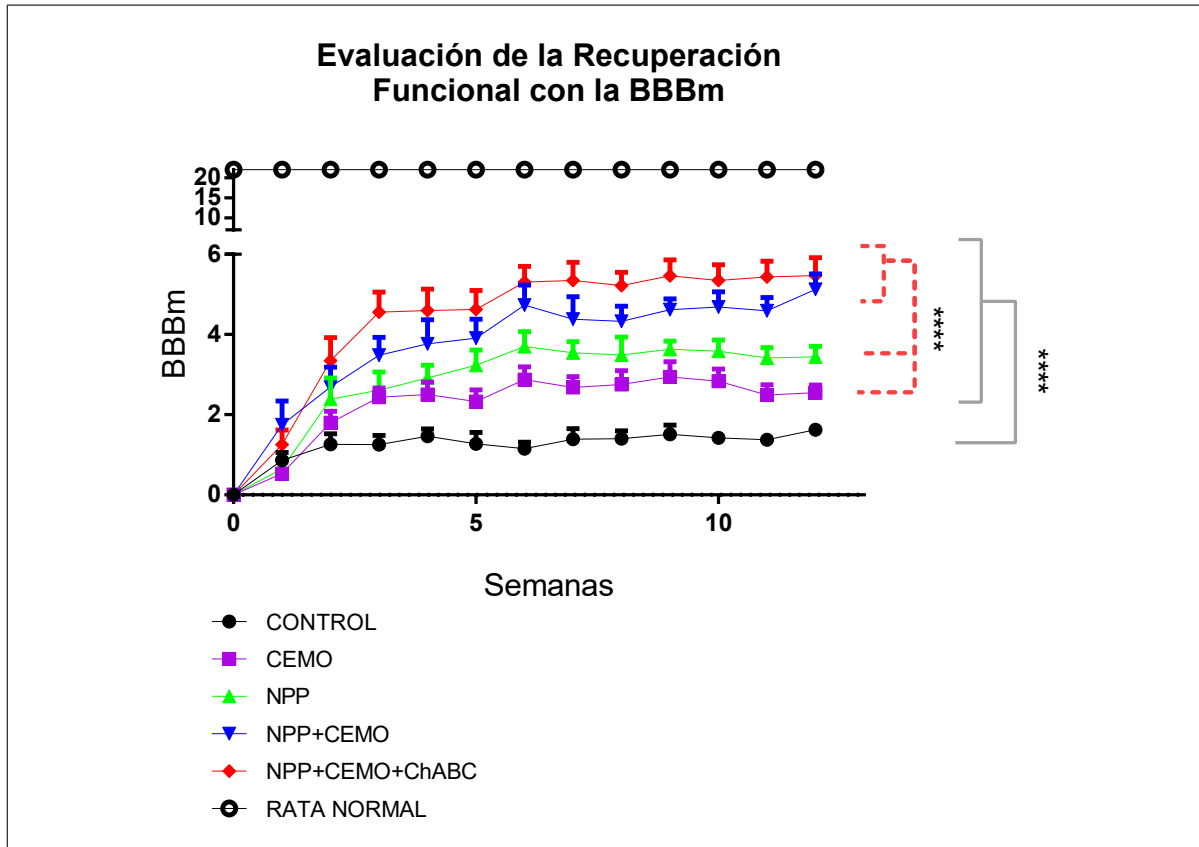


Figura 11.2: Evaluación de la recuperación funcional mediante la escala BBBm. Todos los grupos tratados presentaron una mejoría significativa en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$). Los grupos con tratamiento combinados mostraron diferencias al ser comparados con NPP y CEMO ($P < 0.0001$). Cada línea representa el promedio \pm E.E. por grupo ($n=6$), los braquets grises indican diferencias significativas vs el grupo de control y los braquets rojos punteados indican las diferencias significativas entre grupos. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Nervio periférico predegenerado (NPP), células estromales de médula ósea (CEMO) y condroitinasa ABC (ChABC).

11.3. Cinemática de la marcha

Debido a que las evaluaciones funcionales de campo abierto con la escala BBB son semicuantitativas y presentan ciertas limitaciones, se realizó un análisis cuantitativo

más preciso utilizando la cinemática de la marcha, donde se obtuvo el trazo del seguimiento de las articulaciones durante la marcha, así como la amplitud de los ángulos formados por las articulaciones.

En el trazo de la deambulación del animal (Figuras 11.3, 11.4 y 11.5) se puede observar que ningún grupo presentó apoyo de apoyo plantar y soporte de peso. El grupo control presentó ausencia o movimientos limitados constantemente en cadera, rodilla y tobillo, es decir arrastre completo de la extremidad. En los grupos con tratamiento único no se logró observar movimientos rítmicos que representen a las fases de ciclo de la marcha. El grupo tratado con NPP presentó algunos movimientos leves no rítmicos ocasionales, pero en menor frecuencia que los animales de los grupos con tratamientos combinados. Por el contrario, los dos grupos que recibieron tratamientos combinados, se observaron movimientos frecuentes y rítmicos en las tres articulaciones que podrían estar representando el ciclo de la marcha, donde la fase de balanceo, que es caracterizada por la ausencia de contacto con el suelo, se ve representada por un movimiento tipo arco, donde una extremidad sobrepasa el eje de apoyo de la otra extremidad, mientras que la fase de soporte se observa al finalizar este movimiento, donde la rodilla y la parte dorsal de la pata sirven de apoyo con realización de movimientos frecuentes contrastando con lo observado en el grupo control.

11.4. Apertura de ángulos en el balanceo

Al analizar las amplitudes de los ángulos en el balanceo, se encontró que en la cadera (inciso A de la Figura 11.6), todos los grupos con tratamiento mostraron un aumento significativo en la apertura del ángulo al ser comparados con el grupo control ($P < 0.0001$); la del grupo CEMO con una apertura promedio de 9.13, la del grupo con NPP con una apertura de 12.35, la del grupo con NPP+CEMO con 15.45, y la del grupo con NPP+CEMO+ChABC con 14.78. La comparación entre grupos mostró un aumento significativo de los grupos que recibieron tratamientos combinados al ser comparados con el grupo CEMO, NPP+CEMO ($P < 0.01$) y NPP+CEMO+ChABC ($P < 0.05$).

En cuanto a la articulación de la rodilla (inciso B de la Figura 11.6), todos los grupos tratados mostraron un aumento significativo en la amplitud de los ángulos al ser comparados con el grupo control ($P < 0.0001$); el grupo que recibió CEMO con una apertura promedio de 7.29, el grupo que recibió NPP con una apertura de 9.77, el grupo NPP+CEMO con 14.73, y el grupo NPP+CEMO+ChABC con 12.12. La comparación entre grupos mostró que los tratamientos combinados tuvieron un aumento significativo en la amplitud del movimiento cuando fueron comparados contra el grupo CEMO ($P < 0.0001$) y contra el grupo NPP (NPP+CEMO con una $P < 0.01$ y

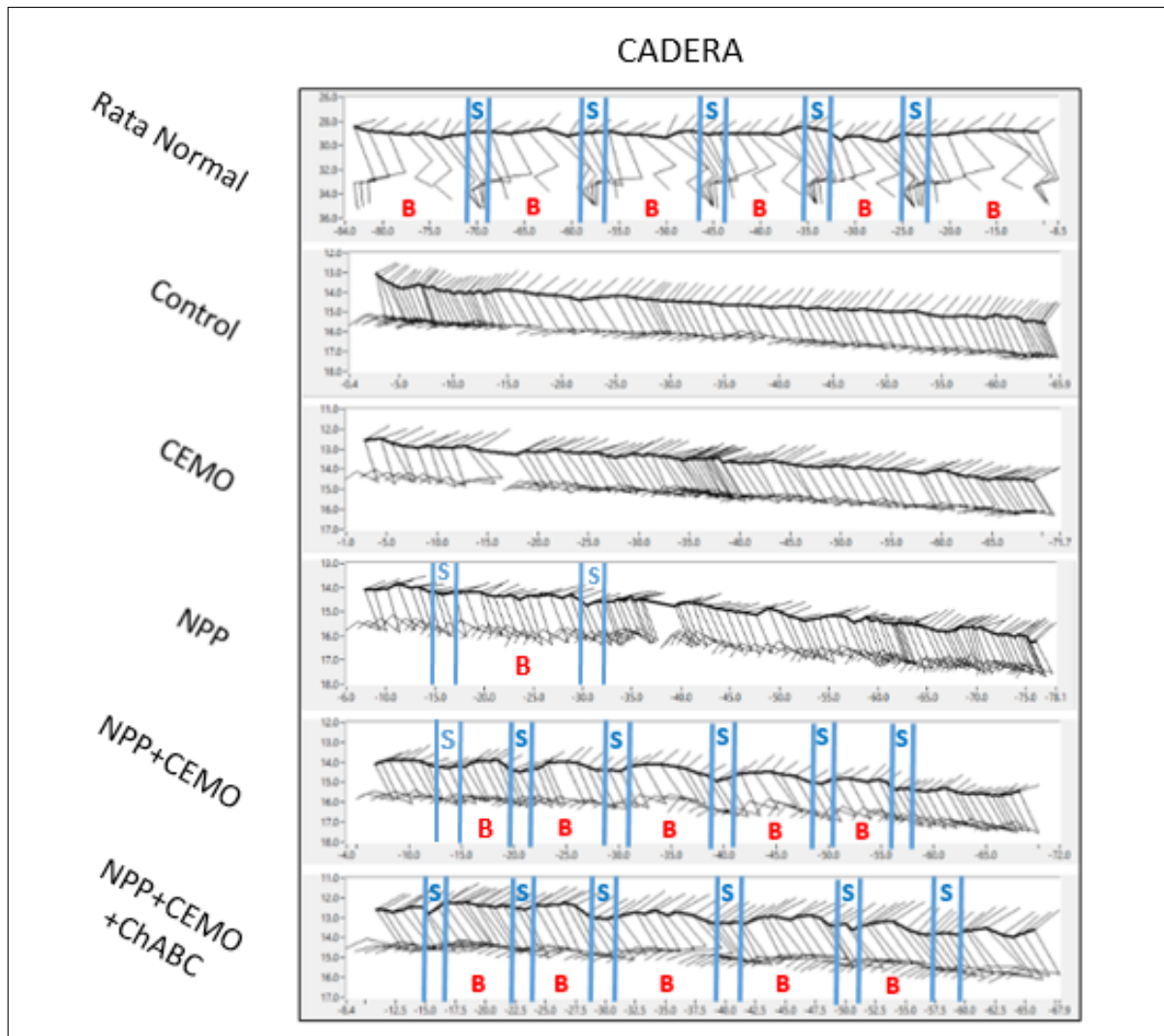


Figura 11.3: Trazos del movimiento de deambulaci3n de la cadera (l3nea negra marcada), en una rata representativa para cada grupo y una rata normal, donde se observan los movimientos r3tmicos de soporte (S) y de balanceo (B). Se identifica en los grupos con tratamientos combinados dobles y triples, a diferencia del grupo control y de los tratamientos 3nicos, la presencia de movimientos frecuentes y r3tmicos que pueden estar representando el ciclo de la marcha.

NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.05$).

En la articulaci3n del tobillo (inciso C de la Figura 11.6), todos los grupos tratados mostraron un aumento significativo en la amplitud de los 3ngulos en comparaci3n con el grupo control ($P < 0.0001$); el grupo con CEMO obtuvo una apertura promedio de 3.81, NPP con una apertura de 9.86, NPP+CEMO con 12.86, y el grupo NPP+CEMO+ChABC con 11.44. En la comparaci3n entre grupos se pudo observar como el grupo NPP y los grupos que recibieron tratamientos combinados mostraron un aumento significativo en la apertura del movimiento en comparaci3n con el grupo

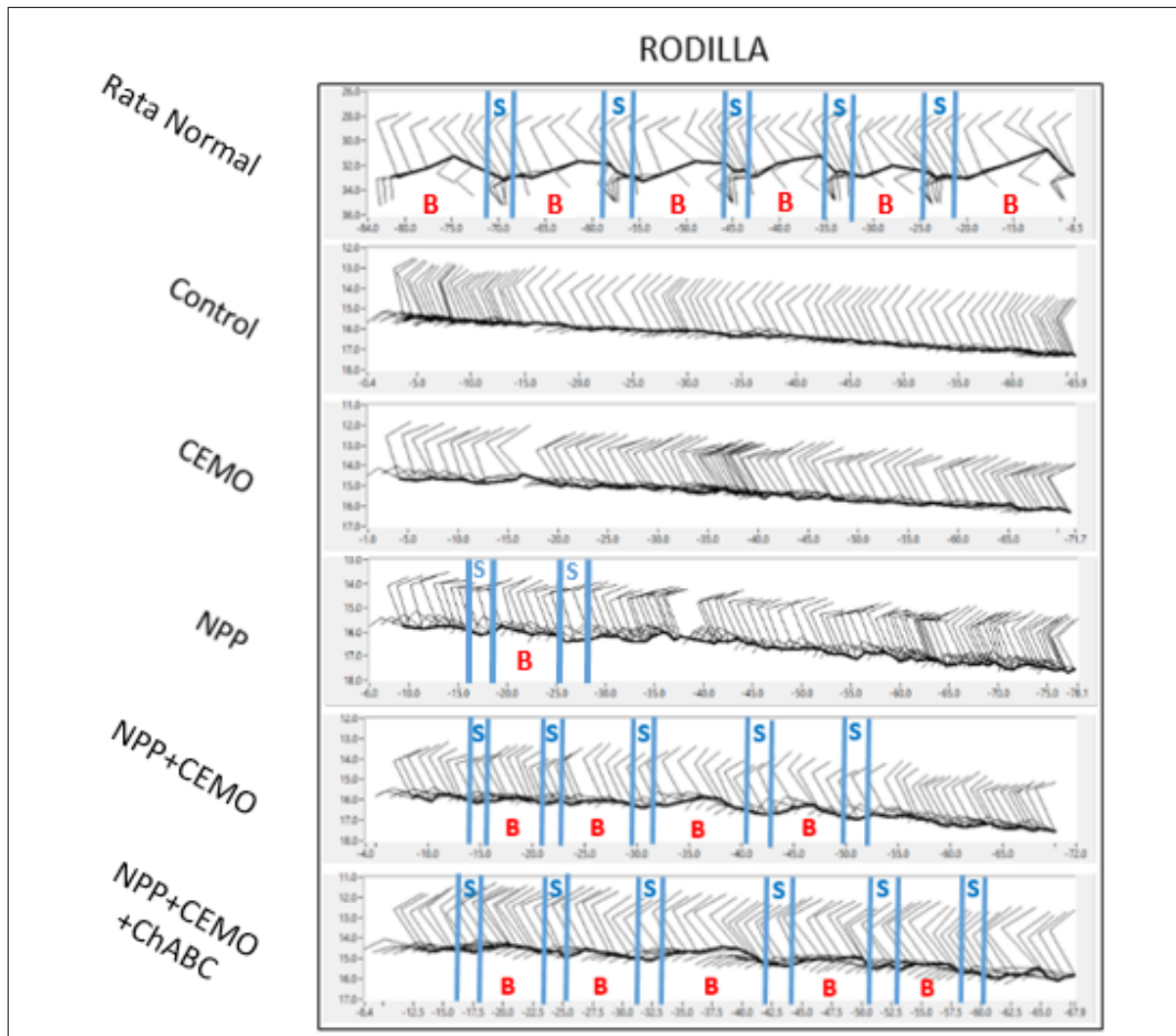


Figura 11.4: Trazos del movimiento de deambulación de la rodilla (línea negra marcada), en una rata representativa para cada grupo y una rata normal, donde se observan los movimientos rítmicos de soporte (S) y de balanceo (B). Se identifica en los grupos con tratamientos combinados dobles y triples, a diferencia del grupo control y de los tratamientos únicos, la presencia de ciclos que representan el ciclo de la marcha.

CEMO (NPP con una $P < 0.05$, NPP+CEMO con una $P < 0.05$, NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.001$), también se pudo observar como el grupo NPP+CEMO mostró un aumento significativo cuando se comparó con el grupo con NPP ($P < 0.05$).

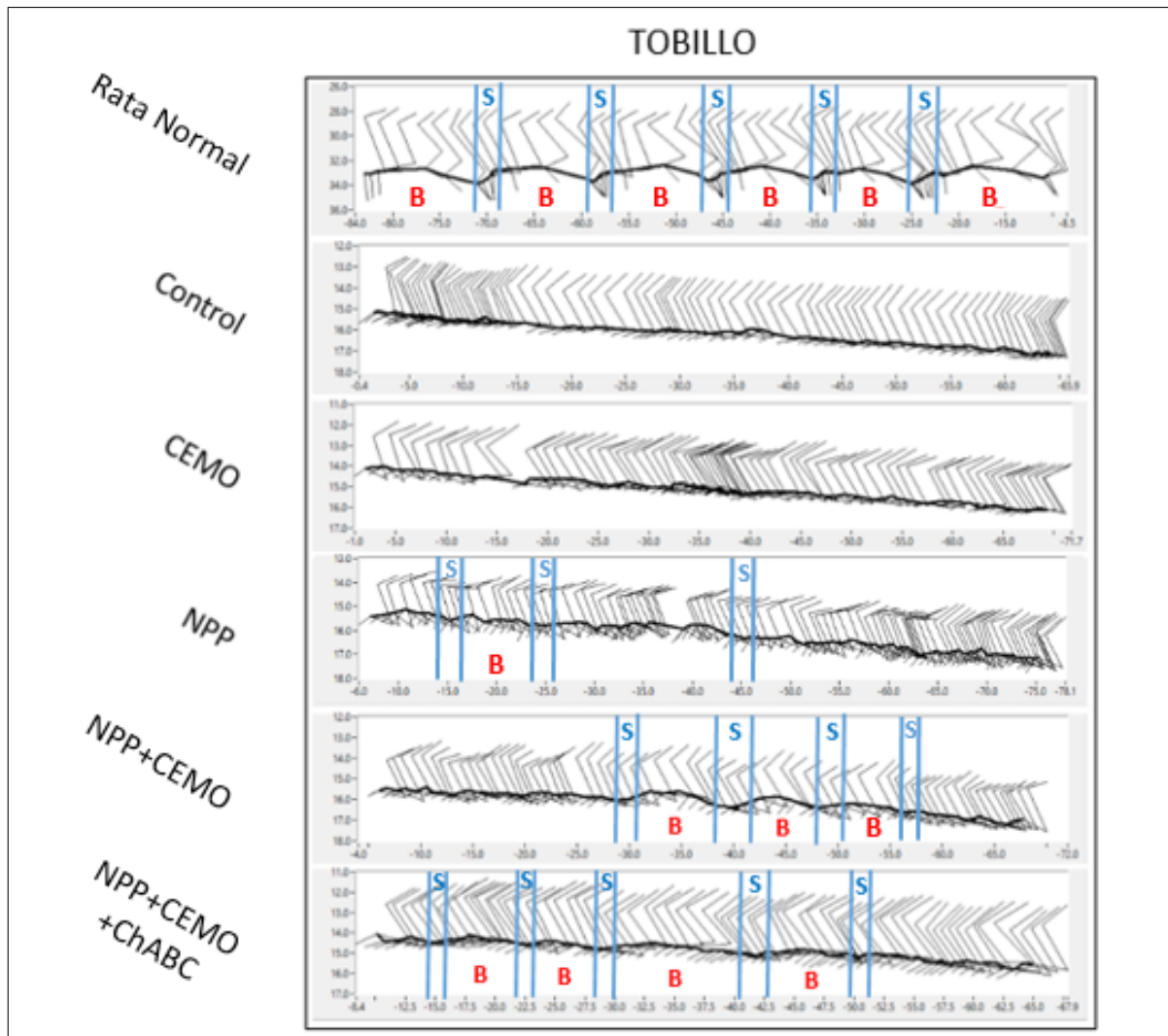


Figura 11.5: Trazos del movimiento de deambulaci3n de la rodilla (lnea negra marcada), en una rata representativa para cada grupo y una rata normal, donde se observan los movimientos rtmicos de soporte (S) y de balanceo (B). Se identifica en los grupos con tratamientos combinados dobles y triples a diferencia del grupo control y de los grupos con tratamientos 3nicos, la presencia de ciclos que representan el ciclo de la marcha.

11.5. Apertura de 3ngulos en el soporte

Al analizar las amplitudes de los 3ngulos en el soporte se encontr3 que en la articulaci3n de la cadera (inciso A de la Figura 11.7) todos los grupos con tratamiento mostraron un aumento significativo al ser comparados con el grupo control ($P < 0.0001$); el grupo trasplantado con CEMO con una apertura promedio de 15.51, el grupo NPP con una apertura de 21.02, el grupo NPP+CEMO con una de 28.20, y el grupo NPP+CEMO+ChABC con 31.04. Al hacer la comparaci3n entre grupos observamos

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

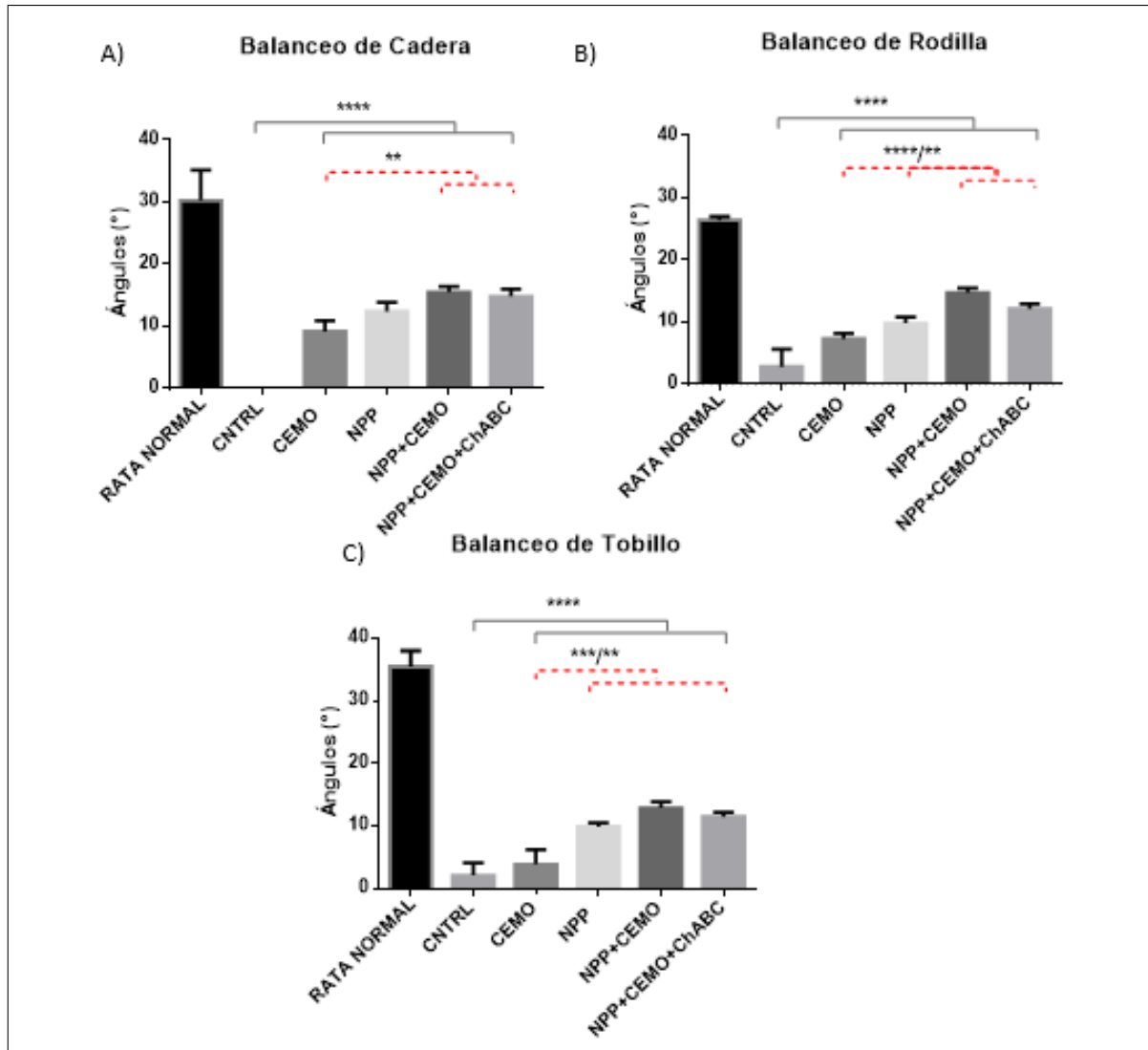


Figura 11.6: En la figura se observa la amplitud de los ángulos del balanceo. A) se observa la amplitud de la fase de balanceo en la cadera; B) se observa la amplitud de la fase de balanceo en la rodilla; C) se observa la amplitud de la fase de balanceo en el tobillo. Cada columna representa el promedio \pm E.E (n=5). Los braquets grises indican diferencias significativas vs grupo control y los braquets rojos punteados indican las diferencias significativas entre grupos. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01. Nervio periférico predegenerado (NPP), células estromales de médula ósea (CEMO) y condroitinasa ABC (ChABC).

que los grupos que recibieron tratamientos combinados mostraron un aumento significativo en comparación con el grupo CEMO (NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC con una P<0.001). también se encontró que solamente el grupo NPP+CEMO+ChABC mostró un aumento significativo al ser comparado con el grupo NPP (P<0.05).

Al evaluar la articulación de la rodilla (inciso B de la Figura 11.7) se observó

que todos los grupos tratados obtuvieron un aumento significativo en la amplitud del ángulo al ser comparados contra el grupo control ($P < 0.0001$); el grupo trasplantado con CEMO con una apertura promedio de 11.89, el grupo NPP con una apertura de 17.20, el grupo NPP+CEMO de 26.01, y el grupo NPP+CEMO+ChABC de 22.93. Al realizar la comparación entre grupos se encontró que el grupo con NPP y los grupos con tratamientos combinados obtuvieron un aumento significativo en la amplitud del ángulo en comparación con el grupo CEMO (NPP con una $P < 0.05$ NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.0001$). también se encontró que los grupos con tratamientos combinados tuvieron un aumento significativo en la amplitud del ángulo en comparación con el grupo NPP (NPP+CEMO con una $P < 0.01$ y NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.05$).

Respecto a la articulación del tobillo (inciso c de la Figura 11.7) se encontró que los grupos con tratamiento presentaron un aumento significativo en la amplitud del ángulo al hacer la comparación contra el grupo control ($P < 0.0001$); el grupo trasplantado con CEMO con una apertura promedio de 6.25, el grupo NPP con una apertura de 18.6, el grupo NPP+CEMO con 24.08, y el grupo NPP+CEMO+ChABC con 22.13. En la comparación entre grupos, se observó que tanto el grupo NPP como los grupos que recibieron tratamientos combinados mostraron un aumento significativo en la amplitud del ángulo en comparación con el grupo CEMO (NPP con una $P < 0.01$, NPP+CEMO con una $P < 0.001$ y NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.0001$).

11.6. Movimiento pendular

En el análisis del movimiento pendular se observó que la apertura del movimiento del grupo control fue reducida, con una apertura promedio de 2.72 (inciso B de la Figura 11.8). Se encontró que todos los grupos tratados mostraron un aumento significativo en la apertura del movimiento contra el grupo control ($P < 0.0001$) (inciso A de la Figura 11.8), el grupo CEMO con una apertura promedio de 4.07, el grupo NPP con una apertura de 7.82 (inciso C de la Figura 11.8), el grupo NPP+CEMO con una apertura promedio de 10.19 (inciso D de la Figura 11.8), el grupo NPP+CEMO+ChABC con una apertura promedio de 9.4. Al hacer la comparación entre grupos se observó que el grupo NPP y combinados presentaron una mejoría significativa en la amplitud del movimiento en comparación con el grupo CEMO (NPP con una $P < 0.05$, NPP+CEMO y con una NPP+CEMO+ChABC con una $P < 0.001$).

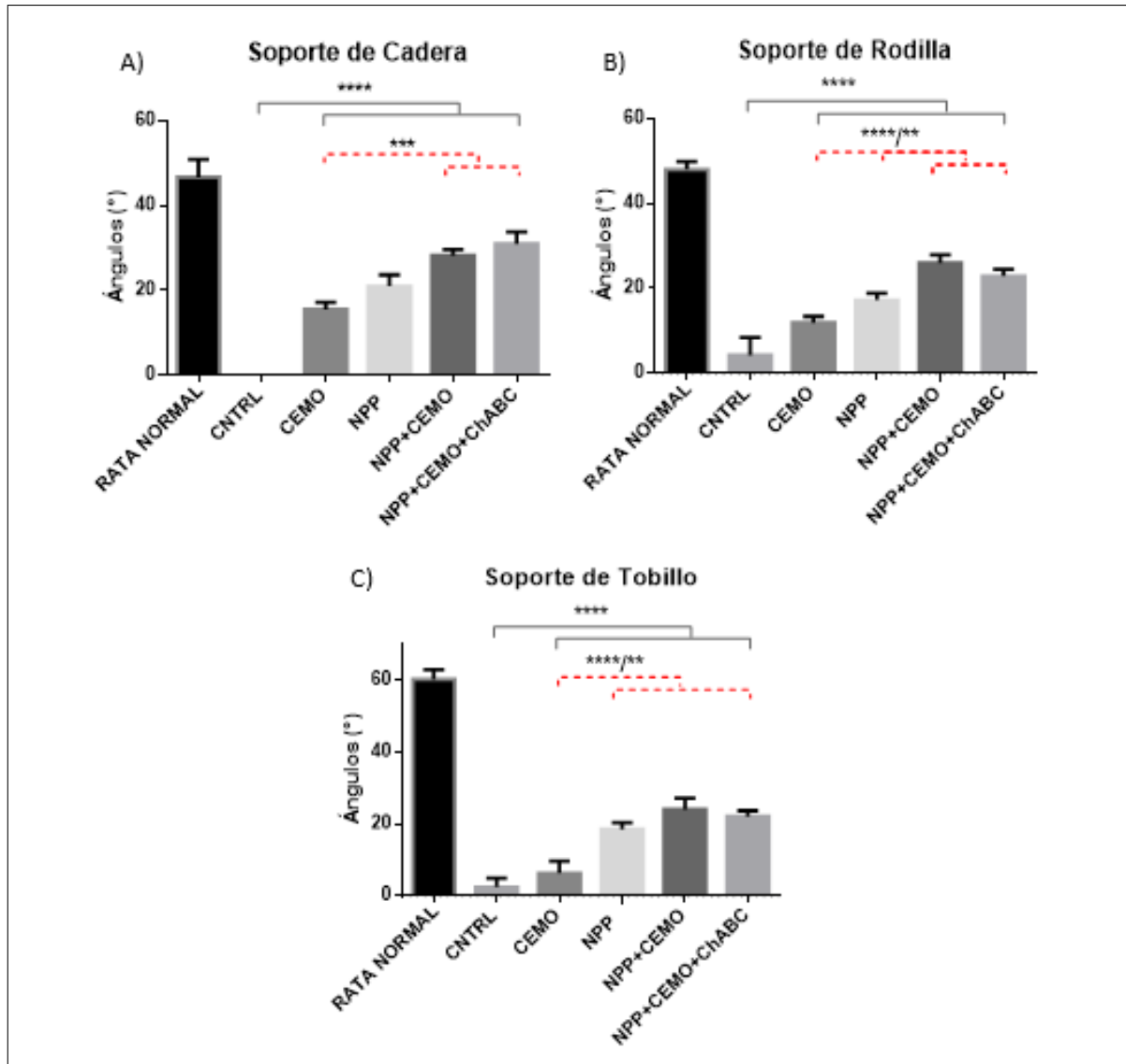


Figura 11.7: En la figura se observa la amplitud de los ángulos en el soporte. En el panel A) se observa la amplitud de la fase de balanceo en la Cadera; en el panel B) se observa la amplitud de la fase de balanceo en la Rodilla; y en el panel C) se observa la amplitud de la fase de balanceo en el tobillo. Cada columna representa el promedio \pm E.E. (n=5). Los braquets grises indican diferencias significativas vs grupo control y los braquets rojos punteados indican diferencias significativas entre grupos. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. Nervio periférico predegenerado (NPP), células estromales de médula ósea (CEMO) y condroitinasa ABC (ChABC).

11.7. Comparación de pruebas de evaluación

Al realizar el análisis de la correlación entre los porcentajes de recuperación observados por los grupos con los diferentes tratamientos y en las diferentes pruebas de

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

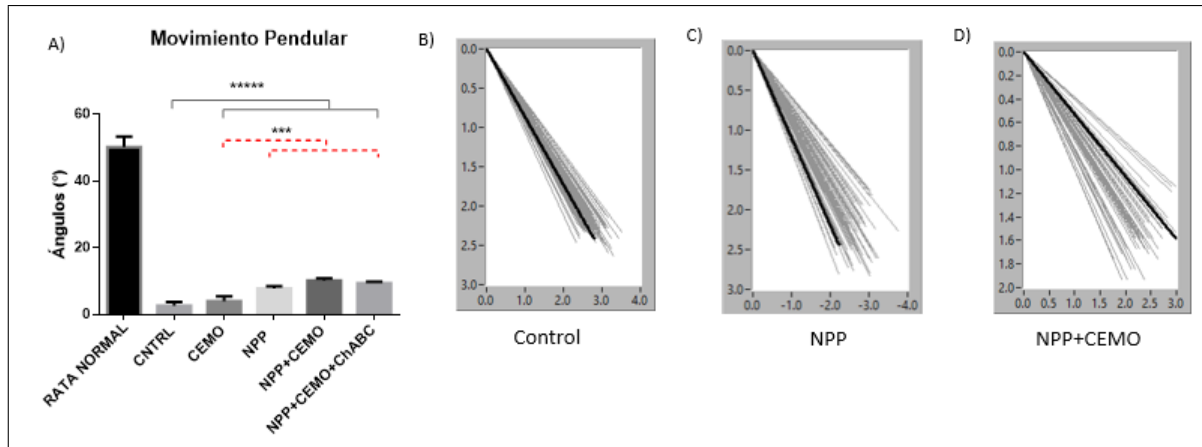


Figura 11.8: A) Se observa la gráfica de comparación de la apertura de los ángulos del movimiento pendular. En las figuras de la derecha se observa la apertura del ángulo del péndulo en un animal representativo para el grupo control (B), para el grupo NPP (C), así como para el grupo NPP+CEMO (D). Cada columna representa el promedio \pm E.E (n=5). Los braquets grises indican diferencias significativas vs grupo control y los braquets rojos punteados indican diferencias significativas entre grupos. ****p<0.0001, **p<0.01. Nervio periférico predegenerado (NPP), células estromales de médula ósea (CEMO) y condroitinasa ABC (ChABC).

evaluación funcional, se observó que los coeficientes de correlación (r) fueron de $r=0.98$ entre las pruebas BBB estándar y BBBm (inciso A de la Figura 11.9), $r=0.98$ entre las pruebas BBB estándar y el mov. pendular (inciso B de la Figura 11.9), y de $r=0.96$ entre las pruebas BBBm y el mov. pendular (inciso C de la Figura 11.9). Esto nos indica que existe una alta correlación entre los resultados que se obtienen con las pruebas BBB, BBBm y cinemática del movimiento, por lo que puede utilizarse cualquiera de ellas para evaluar el grado de recuperación funcional después de una LTME por sección completa fase crónica.

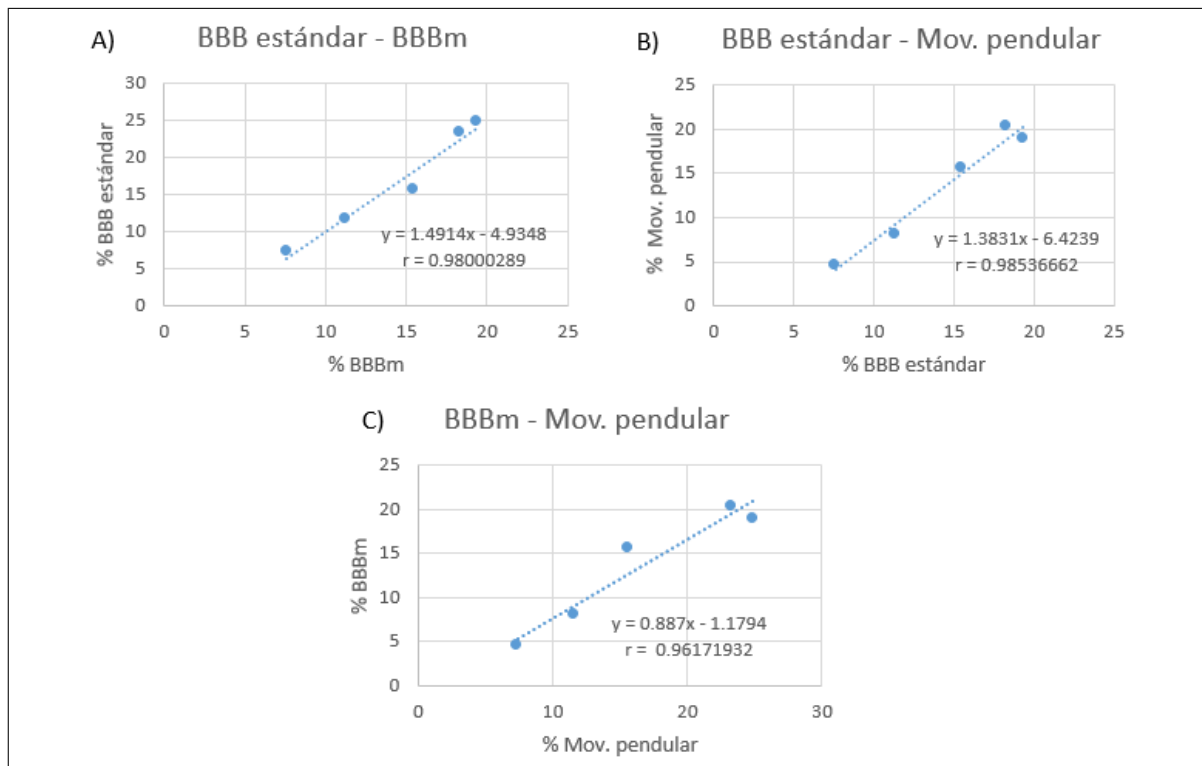


Figura 11.9: Se observan las nubes de dispersión de los porcentajes de recuperación observados en cada grupo de tratamiento, entre las pruebas BBB estándar y BBBm (A), BBB estándar y mov. pendular (B), y entre la BBBm y el mov. pendular (C). línea de tendencia (línea punteada azul); la ecuación del gráfico ($y=mx -b$); y el coeficiente de correlación de Pearson (r)

12. DISCUSIÓN

Con el propósito de observar el efecto del uso de los tratamientos únicos y combinados después de una LTME por sección completa fase crónica, en este trabajo se propuso evaluar el efecto en la recuperación funcional del uso del trasplante de tratamientos únicos con CEMO o NPP, y de los tratamientos combinados NPP+CEMO y NPP+CEMO+ChABC, a través de dos escalas de evaluación motoras BBB estándar y BBBm, y un análisis cinemático de la marcha, para observar cual promueve un mayor aumento en la función locomotora del tren posterior.

La escala de evaluación funcional de la BBB estándar, es uno de los métodos más registrado en la literatura para la lesión de médula espinal. En su versión modificada por M. Altri y cols. en 2002, les permitió observar una curva de recuperación funcional más marcada, debido a que la BBB estándar no considera ciertas características importantes en la coordinación del movimiento entre ambas extremidades inferiores (58). En este trabajo se utilizaron las dos escalas, encontrándose que los grupos se comportaron de una manera similar, observándose las mismas diferencias significativas, los mismos porcentajes de recuperación, así como un valor de correlación alto entre ambas escalas, lo que nos indica que ambas escalas nos permiten observar la recuperación y es indiferente el uso de una o la otra. Por otro lado, la cinemática de la marcha es otro método menos utilizado que permite estudiar detalladamente la estructura del movimiento mediante en el rastreo del movimiento de las articulaciones involucradas en la marcha, incluyendo las fases de balanceo y soporte y a través de las mediciones de los ángulos y del desplazamiento de las articulaciones (125). Este análisis es más preciso para extraer información de la estructura del movimiento y para evaluar la efectividad de los tratamientos. Después de haber realizado el análisis de correlación entre los tres métodos de evaluación, observamos que la cinemática tuvo una correlación alta con las dos escalas de evaluación funcional de campo abierto BBB y BBBm, demostrando que la recuperación observada es consistente, y que, además, los tres métodos de evaluación son igual de eficientes para observar la recuperación de la función locomotora.

12.1. Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación de los tratamientos únicos

Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación del tratamiento único con Células Estromales de Médula Ósea

El efecto del uso de CEMO después de una LTME, ha sido estudiado en distintos trabajos, tanto en su trasplante como tratamiento único y en combinación con otros tratamientos. Liang y cols. y Luo y cols. en 2009, reportaron la inyección de 500 000 y de 3 millones de CEMO en el área de lesión después de una LTME de tipo sección completa en fase aguda, donde ambos demostraron una mejoría de 4 puntos en la escala BBB estándar sobre la calificación obtenida por el grupo sin células a las 10 semanas de tratamiento [82, 83]. El trasplante de CEMO mostró mejoras en la recuperación del tejido, donde se observó un aumento en la regeneración axonal y reducción del área lesionada, disminución de la muerte celular por apoptosis, diferenciación de las células implantadas a linaje neural y mejoras en la conductividad eléctrica de los estímulos [82, 83].

En el presente trabajo el grupo tratado con CEMO mostró un incremento en los puntajes obtenidos al ser comparado contra el grupo control, observándose una recuperación del 12% (4 en la BBBm y 3 en la BBB estándar) en ambas escalas, y del 10% en el análisis del movimiento pendular. Mientras que el grupo control mostró una recuperación cercana al 8% en ambas escalas y en el análisis del movimiento pendular. El análisis de la cinemática de la marcha también nos permitió observar la presencia de movimientos poco estructurados en la reconstrucción de los trazos de las articulaciones sobre la marcha, a diferencia de lo observado en el grupo control, donde se observó un completo arrastre de la extremidad. Al hacer el análisis de los movimientos de las articulaciones cadera, rodilla y tobillo, en fase de soporte y balanceo, observamos un aumento significativo en la amplitud de los ángulos de un 25% en el grupo tratado con CEMO, a diferencia del 10% observado en el grupo control.

Nuestros resultados concuerdan con los trabajos que han reportado previamente el uso de las células y su evaluación con la escala BBB estándar, donde también se ha observado un aumento de los grupos tratados con CEMO por sobre el grupo control, pero con la diferencia de que en este trabajo el aumento obtenido fue menor, esto puede deberse al tipo de modelo como al número de células trasplantadas. Se ha sugerido que puede haber una relación en función de la cantidad de células administrada, pero hasta el momento no existe trabajo alguno que establezca una cantidad óptima para el trasplante en LTME, por lo que el uso de 125,000 pudo limitar la re-

cuperación. Además, los resultados de la cinemática nos permitieron observar que el movimiento completo de ambas extremidades posteriores, y de las 3 articulaciones, se vio favorecido con cierto grado de recuperación después del trasplante de CEMO por sobre el grupo control.

El uso de CEMO en modelos de LTME han mostrado una amplia gama de beneficios tróficos y reguladores, su fácil obtención, su relativa seguridad debido a que no induce el desarrollo de tumores y que su uso clínico está ausente de consideraciones éticas, las vuelven más atractivas para su uso en LTME que otros tipos de células. Se ha demostrado su papel en la neuroprotección y la estimulación de la regeneración axonal, debido a la expresión parácrina de neurotrofinas y factores de crecimiento, como BDNF, NGF, GDNF, VEGF y FGF [77, 78, 79]. Luo y cols. y Cantinieaux y cols. en 2012, observaron que su uso reduce la apoptosis e incrementa la neuroprotección, revascularización y reducción del área de cavitación [78, 112], Akiyama y cols. en 2002 y Ding y cols. en 2014, observaron que favorecen la mielinización y mejoran la conductividad [113, 114]. Mercedes Zurita y cols. en 2004 y 2006, Liang y cols. y Luo y cols. en 2009, observaron que promovían al crecimiento axonal, al servir de soporte estructural; también reportaron su diferenciación a linaje neural, lo que promueve la formación de nuevas conexiones axonales y relevos en los circuitos espinales [80, 81, 82, 83]. Diversos trabajos han descrito el efecto de modulación de las CEMO sobre el sistema inmune, sobre la migración, diferenciación, proliferación y activación de células como los linfocitos Tc, linfocitos B, células dendríticas y Natural Killers a través de la expresión de diversas citosinas, lo que también se promueve neuroprotección y reducción del área afectada [115]. Estas células probablemente estén favoreciendo la recuperación funcional a través de estas propiedades neuroprotectoras y regenerativas, como lo son el aumento de la expresión de factores de crecimiento, la extensión de prolongaciones, la diferenciación a linaje neural, lo que podría estar favoreciendo la regeneración, neuroprotección, la activación y renovación de los circuitos involucrados en el movimiento, permitiendo observar cierto grado de mejoría por sobre lo observado en el grupo control.

Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación del tratamiento único con Nervio Periférico Predegenerado

El uso del injerto de NPP como tratamiento único se ha reportado en distintos modelos de LTME. Buzoianu-Anguiano y cols. en 2015, obtuvieron puntajes cercanos a 4 en la BBB estándar a los dos meses de haber trasplantado NPP predegenerado 21 días, en un modelo de LTME de tipo sección completa fase crónica, mostrando mejoras en la regeneración axonal en la zona distal y aumento en la remielinización

en comparación con el grupo control [88]. En otros trabajos como los de Pierdona Guzen y cols. en 2012 y Nordblom y cols. en 2009, se ha reportado su uso como NPP en LTME fase aguda, ambos observaron un incremento cercano a 3 puntos en la escala BBB estándar a los 2 meses de tratamiento, así como aumento en la regeneración axonal a través del injerto y las zonas de transición hospedero-injerto y aumento en la remielinización, aunado a una mejoría en la conductividad de los potenciales evocados motores o somatosensoriales a los 6 meses después del tratamiento, lo que puede significar que la regeneración axonal está formando conexiones axonales funcionales [90, 91].

En el presente trabajo, el grupo que recibió el implante de NPP mostró una mejoría en la recuperación funcional cercana al 15 % en ambas escalas (5 puntos en la BBBm y 4 en la BBB estándar) y en el análisis de la apertura del movimiento pendular, con un aumento significativo a lo observado en el grupo control, lo cual concuerda con los resultados observados por Buzoianu-Anguiano y cols, pero sin una mejoría significativa en comparación con el grupo que recibió el trasplante único de CEMO. Además, se pudo notar la presencia de movimientos poco estructurados y poco frecuentes en la reconstrucción de los trazos de las articulaciones sobre la marcha, a diferencia de lo observado en el grupo control. Al hacer el análisis de los movimientos de las articulaciones cadera, rodilla y tobillo, en fase de soporte y balanceo, observamos un aumento significativo en la amplitud de los ángulos de un 35 % en el grupo tratado con NPP, aumentando la amplitud de los movimientos en comparación con el grupo CEMO. Consideramos que el aumento en la amplitud de los movimientos observado en el grupo tratado con NPP, a comparación con el grupo tratado con CEMO, se puede deber a que en el grupo que recibió CEMO el hueco de 6mm en la ME estaba vacío, mientras que en el grupo que recibió el implante de NPP, el hueco fue rellenado con los segmentos del NPP.

Debido a lo descrito en la literatura del uso del NPP en LTME, es posible que el NPP esté potenciando la capacidad de regeneración axonal a larga distancia a través del injerto y produciendo alguna reconexión funcional con algún circuito neuronal involucrado en la marcha en la zona distal, a diferencia de lo observado en el grupo control y el tratamiento con CEMO. El uso de NPP ha demostrado la capacidad para promover la regeneración axonal, ya que sirve como guía y soporte para el crecimiento axonal, debido a la estructura longitudinal, a la presencia de proteínas como las moléculas de adhesión celular (CAM), las proteínas de matriz extracelular como laminina y fibronectina, así como la regulación en la expresión de factores neurotróficos por parte de las células de Schwann como NT3 y GDNF, que favorece el microambiente para la regeneración y la neuroprotección del tejido [116, 117, 118]. El aumento que observamos en la funcionalidad también pudo verse beneficiado debido a la pre-

degeneración de nervio 21 días, ya que los NPP a diferencia de los NPF, presentan un microambiente más permisivo para la regeneración axonal, debido a que la expresión de citosinas antiinflamatorias y factores de crecimiento se ven incrementados [92, 93].

12.2. Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación de los tratamientos combinados

Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación del tratamiento combinado de Nervio Periférico Predegenerado con Células Estromales de Médula Ósea

Al contrario de lo observado con los tratamientos únicos, en el grupo con tratamiento doble, observamos una recuperación cercana al 20 % en ambas escalas funcionales (6 en la BBBm y 5 en la BBB estándar) con un aumento significativo al ser comparados con los dos grupos con tratamiento único. En la apertura del movimiento pendular se observó una recuperación cercana al 22 %, a diferencia de lo observado en los dos grupos con tratamientos únicos y el control. En cuanto a los trazos formados en la marcha se observó que, a diferencia de los tratamientos únicos, este grupo mostró la presencia de movimientos amplios, rítmicos y frecuentes, y que estos fueron más amplios en la cadera y en la rodilla, a diferencia de lo observado en el tobillo. El análisis de la amplitud de los movimientos de las articulaciones cadera, rodilla y tobillo en ambas fases, mostró un aumento cercano al 50 % en este grupo, a diferencia de lo observado en los grupos con tratamientos únicos y el control. Lo que nos habla de que la combinación de los tratamientos está presentando un efecto mayor que su aplicación por separado para este tipo de LTME sobre la recuperación de la funcionalidad.

Esta mejoría del uso combinado de NPP y CEMO concuerda con los resultados obtenidos por Buzoianu-Anguiano y cols., quienes demostraron que la misma combinación de tratamientos después de una LTME por sección completa en fase crónica, permite alcanzar hasta 5 puntos en la escala de la BBB estándar a los 2 meses de evaluación, con mayor presencia de fibras axonales que sobre el injerto y en la zona distal, así como en la remielinización, en comparación de lo que se observa con el grupo trasplantado únicamente con NPP [88]. Trabajos como los realizados por Tsai y cols. en 2005, Lee y cols. en 2002 y Pierdona y cols. en 2012 mostraron los beneficios de la combinación del NPF con la adición de FGF después de 3 meses de tratamiento, donde observaron un aumento en la recuperación funcional, obteniendo calificaciones de 5 en la escala BBB estándar, un mayor aumento en la regeneración de axones y en la remielinización, y un aumento en la mejoría de la conductividad

de MEP y SSEP, a diferencia de lo observado en los grupos con su aplicación única o por separado [90, 91, 96]. Se cree que el uso de la combinación de NPP y CEMO está produciendo resultados favorables y significativos en la recuperación funcional del tren posterior, debido a la suma de propiedades regenerativas y neuroprotectoras que han sido observadas después de trasplantar las CEMO, como la secreción de factores tróficos, extensión de prolongaciones y diferenciación a linaje neural, sumado a las propiedades observadas después del trasplante de NPP, como la secreción de citosinas antiinflamatorias, factores tróficos y presencia de proteínas de adhesión, lo que podría estar fomentando el aumento de la regeneración axonal y en la formación de reconexiones funcionales, con circuitos distales involucrados en la marcha. El aumento en la amplitud de cada articulación y el movimiento pendular están indicando que existe una posible reconexión axonal de algún tracto descendiente involucrado en la actividad locomotora de las extremidades posteriores, o, a través de la formación de algún relevo que estaría actuando sobre los circuitos involucrados en la marcha y en la movilidad de las articulaciones

Efecto en la recuperación funcional después de la aplicación del tratamiento combinado de Nervio Periférico Predegenerado con Células Estromales de Médula Ósea y Condroitinasa ABC

Respecto al uso del tratamiento triple, se observó una recuperación cercana al 22% en ambas escalas funcionales (6 en la BBBm y 5 en la BBB estándar) y en la apertura del movimiento pendular, muy parecido a lo observado en el grupo el con tratamiento doble, con un aumento significativo en comparación de los dos grupos con tratamiento único y el grupo control, lo que recalca que el uso combinado de NPP y CEMO es mejor que su aplicación por separado. En cuanto a los trazos formados en la marcha, este grupo mostró la presencia de movimientos amplios, rítmicos y frecuentes, que fueron más amplios en la cadera y en la rodilla, a diferencia de lo observado en el tobillo. Además, al igual que el grupo con tratamiento doble, se observó un aumento significativo en la amplitud de los movimientos de las articulaciones cadera, rodilla y tobillo en ambas fases, cercano al 50%. Cabe mencionar que no se observó en ninguna evaluación funcional un aumento significativo al ser comparado con el grupo con tratamiento doble.

En otros trabajos que han reportado la adición de ChABC encontramos el estudio de Tom y cols. en 2009, donde el uso de un NPP 7 días, en conjunto con GDNF y ChABC, se observó que el grupo con ChABC, mostraba un incremento de hasta 2 puntos en la escala BBB estándar sobre el grupo sin ChABC [99]. Fouad y cols. en 2005 y Xiong y cols. en 2016, demostraron que la adición de ChABC a dos diferentes

tratamientos después de una LTME por sección completa fase aguda, incremento por 2 y 3 puntos sobre el puntaje obtenido de los grupos de tratamiento sin la ChABC en la escala de la BBB estándar, esta mejoría en la función motora estuvo acompañada de un aumento en el número de fibras axonales que cruzaban la zona de lesión [74, 102].

La ChABC rompe los condroitin sulfatos de los proteoglicanos secretados por los astrocitos reactivos en la cicatriz fibrogliar, los cuales inhiben el crecimiento neurítico y juegan un papel importante previniendo la regeneración después de una lesión del SNC [119, 120]. Su administración en el sitio de lesión ha reportado promover la plasticidad y regeneración de axones lesionados, produciendo una mejoría en la recuperación funcional [99, 120]. En este trabajo el uso de la enzima ChABC no mostró una mejoría aditiva en la recuperación locomotora al ser comparado con el grupo con tratamiento doble, por lo que creemos que el uso de la administración de una dosis única no es suficiente para aumentar la regeneración axonal en el sitio de trasplante. Está limitada mejoría se puede deber probablemente al tiempo de digestión de los condroitín sulfatos en la cicatriz fibrogliar por parte de la ChABC, ya que se ha reportado que su actividad enzimática disminuye hasta un 25% después de 7 a 10 días de la administración a 37°C [99, 119].

En cuanto a la mejora en la amplitud de los trazos de la cadera y la rodilla por sobre lo observado en el tobillo en los dos grupos con tratamientos combinados. Esto puede deberse a la organización de los circuitos de los CGPs para la locomoción, donde las motoneuronas encargadas de activar y regular los movimientos flexores y extensores de la cadera y la rodilla se ubican entre las vértebras lumbares 3 y 5 (L3-L5), que se encuentran más cercanas a la zona de trasplante, mientras que los movimientos del tobillo se ubican más lejos, entre los segmentos espinales L6-S1 (27). En algunos trabajos se ha reportado que el CGP encargado de la iniciación del movimiento y la coordinación de ambas extremidades posteriores, se ubica entre la L1-L2 que se encuentran más cercana a la zona de trasplante, favoreciendo el aumento de movimientos alternos, frecuentes y la coordinación entre ambas extremidades inferiores en los grupos con tratamientos combinados a diferencia de los grupos con tratamientos únicos (130).

12.3. Mecanismo de regeneración propuesto

Esta mejoría en la función locomotora observada en el análisis cinemático de la marcha, y en las evaluaciones funcionales de campo abierto, obtenida con la aplicación de los tratamientos combinados en comparación con los grupos con tratamientos únicos, puede ser el resultado de la suma de los efectos benéficos de cada uno de los tratamientos, que, podrían estar creando un microambiente más propicio para la neuro-

protección y la regeneración axonal. Tuszynski y cols. en 2010, formulan tres hipótesis para la reinervación axonal: la primera es la regeneración axonal a larga distancia, seguida de la formación de sinapsis en células o circuitos diana apropiados; la segunda es la regeneración axonal a corta distancia por parte de los axones dañados, seguida de la formación de sinapsis para crear relevos a objetivos distales; la tercera es la ramificación axonal por parte de axones no dañados, que mantienen la conectividad más allá del sitio de la lesión, y que logran establecer nuevas sinapsis funcionales con células o circuitos diana, previamente desconectados por el daño [50]. Es probable que el NPP, este promoviendo la regeneración axonal a larga distancia, al servir como guía y soporte para el crecimiento axonal, gracias a su estructura longitudinal y a la presencia de proteínas N-CAM, integrinas y fibronectinas, que facilitan la elongación axonal, así como por la expresión de factores de crecimiento por parte de las células de Schwann y los macrófagos, lo que favorece la regeneración axonal y la neuroprotección del tejido como NT-3 y GDNF [116, 117, 118]. Además, se creó que el uso de las CEMO podría estar fomentando el aumento en la recuperación funcional a través de la secreción de factores como BDNF, NGF, NT-3, GDNF y FGF , que favorecen la neuroprotección, remielinización, diferenciación a linaje neural, regeneración axonal, así como la ramificación axonal, lo cual se ha reportado en distintos estudios, también se ha observado que su administración provee de sustrato de adhesión para el recrecimiento axonal debido a la extensión de prolongaciones que podrían estar facilitando la creación de relevos en los circuitos neuronales involucrados en la marcha. Esta suma de factores podría estar facilitando la reconexión funcional con objetivos distales, ya sea con neuronas o circuitos diana involucrados en la actividad locomotora del tren posterior, lo que permite observar estas mejoras en comparación con los grupos con tratamientos únicos [126, 127, 128].

13. CONCLUSION

En el presente trabajo se demostró que con el uso de los tratamientos combinados NPP+CEMO+ChABC y NPP+CEMO, se obtuvo un mayor grado de recuperación funcional, mostrando una mayor amplitud de los movimientos, frecuencia y coordinación entre ambas extremidades posteriores, a diferencia de los tratamientos únicos con NPP y CEMO, que, aunque también presentaron cierta mejoría, esta fue limitada. Por lo anterior, el uso de tratamientos combinados es una mejor alternativa que su uso en tratamientos únicos para lograr una mejor recuperación funcional después de una LTME.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. Sengul and C. Watson. Chapter 6 – Spinal Cord: Regional Anatomy, Cytoarchitecture and Chemoarchitecture. In J.K. Mai and G. Paxinos, editors, *The Human Nervous System (Third Edition)*, pages 186–232. Academic Press, San Diego, 2012. ISBN 978-0-12-374236-0. doi:10.1016/B978-0-12-374236-0.10006-9.
- [2] C. Watson, G. Paxinos, and G. Kayalioglu. *The Spinal Cord: Text and Atlas*. Academic Press, San Diego, 2009. ISBN 978-0-12-374247-6. doi:10.1016/B978-0-12-374247-6.50001-8.
- [3] L. Puelles López, S. Martínez Pérez, and M. Martínez de la Torre. *Neuroanatomía*. Ed. Médica Panamericana, 2008. ISBN 9788479034535. <http://www.medicapanamericana.com.pbidi.unam.mx:8080/VisorEbookV2/Ebook>.
- [4] M.F. Bear, B.W. Connors, and M.A. Paradiso. *Neuroscience*. Neuroscience: Exploring the Brain. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760034.
- [5] S. Jacobson, E. M. Marcus, and S. Pugsley. *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. Springer, 2011. ISBN 978-3-319-60185-4. doi:10.1007/978-3-319-60187-8.
- [6] J. A. García-Porrero Pérez, L. Ezquerro Polo, and J.M. Hurlé. *Neuroanatomía humana*. Editorial Médica Panamericana, 2015. ISBN 9788498357707. <http://www.medicapanamericana.com.pbidi.unam.mx:8080/VisorEbookV2/Ebook>.
- [7] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. LaMantia, and L. E. White. *Neuroscience*. Sinauer Associates, 2004. ISBN 0-87893-725-0.
- [8] G. Barrière, H. Leblond, J. Provencher, and S. Rossignol. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. *Journal of Neuroscience*, 28(15):3976–3987, 2008. doi:10.1523/JNEUROSCI.5692-07.2008.
- [9] Charles Watson and Megan Harrison. The location of the major ascending and descending spinal cord tracts in all spinal cord segments in the mouse: actual and extrapolated. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(10):1692–1697, 2012.
- [10] J. Kjell and L. Olson. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 9(10):1125–1137, 2016. doi:10.1242/dmm.025833.
- [11] P. Rea. *Essential Clinical Anatomy of the Nervous System*. Academic Press, San Diego, 2015. ISBN 978-0-12-802030-2. doi:10.1016/B978-0-12-802030-2.00011-X.
- [12] C. F. Vogelaar and V. Estrada. Experimental spinal cord injury models in rodents: anatomical correlations and assessment of motor recovery. In H. Fuller and M. Gates, editors, *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*. IntechOpen, 2016. ISBN 978-953-51-2498-6. doi:10.5772/62947.

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

- [13] J. K. Mai and G. Paxinos. *The Human Nervous System (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, 2012. ISBN 978-0-12-374236-0. doi:10.1016/B978-0-12-374236-0.10041-0.
- [14] G.F. Striedter. *Neurobiology: a functional approach*. Oxford University Press, 2015. ISBN 9780195396157.
- [15] E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, S. Siegelbaum, and A.J. Hudspeth. *Principles of neural science (Four Edition)*. McGraw-hill New York, 2000. ISBN 9780071810012.
- [16] D. W. Pfaff and N. D. Volkow. *Neuroscience in the 21st century: from basic to clinical*. Springer, 2016. ISBN 978-1-4614-1996-9. doi:10.1007/978-1-4614-1997-6.
- [17] I. Whishaw and B. Kolb. *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press, 2005. ISBN 9780195162851. doi:10.1093/acprof:oso/9780195162851.001.0001.
- [18] M. Nordin and V.H. Frankel. *Biomecánica básica del sistema musculoesquelético*. McGraw-Hill Interamericana, 2004. ISBN 9788448606350.
- [19] C. Kirtley. *Clinical Gait Analysis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2006. ISBN 978-0-443-10009-3. doi:10.1016/B978-0-443-10009-3.50003-5.
- [20] J.D. Cucarian, L.A. León, G.A. Luna, M.R. Torres, K. Corredor, and F. Cárdenas. Temporal and Spatial Characterization of Gait Pattern in Rodents as an Animal Model of Cerebrovascular Lesion. *Acta Biológica Colombiana*, 22(3):307–321, 2017. doi:10.15446/abc.v22n3.65244.
- [21] M.A. Saucedo Romero. Valoración de la marcha humana, 2009. URL <http://132.248.9.195/ptd2009/octubre/0650516/Index.html>. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería, UNAM.
- [22] F. Hernández Stengele. Diseño y construcción de prototipo neumático de prótesis de pierna humana, 2008. URL <http://132.248.9.195/ptd2009/octubre/0650516/Index.html>. Tesis de Licenciatura. Departamento de Computación, Electrónica y Mecatrónica, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas, Puebla.
- [23] N. Harischandra. *Computer Simulation of the Neural Control of Locomotion in the Cat*. PhD thesis, School of Computer Science and Communication, University of Stockholm, 2008.
- [24] R.T. Floyd. *Manual de Cinesiología Estructural*. Editorial Paidotribo, España, 2008. ISBN 9788480199728.
- [25] G.N. Orlovskii, T.G. Deliagina, and S. Grillner. *Neuronal control of locomotion: from mollusc to man*. Oxford University Press, 1999. ISBN 9780198524052. doi:10.1093/acprof:oso/9780198524052.001.0001.
- [26] R.W. Hill, G.A. Wyse, and M. Anderson. *Animal Physiology*, chapter PART IV. Movement and Muscle. Sinauer Associates Sunderland, MA, 2004.
- [27] E. Marder and D. Bucher. Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology*, 11(23):R986–R996, 2001. doi:10.1016/S0960-9822(01)00581-4.
- [28] O. Kiehn and O. Kjaerulff. Distribution of Central Pattern Generators for Rhythmic Motor Outputs in the Spinal Cord of Limbed Vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 860(1):110–129, 1998. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09043.x.

- [29] National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Spinal cord injury: Hope through research, 2013. URL <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Hope-Through-Research/Spinal-Cord-Injury-Hope-Through-Research>.
- [30] C. Profyris, S.S. Cheema, D.W. Zang, M.F. Azari, K. Boyle, and S. Petratos. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 15(3):415–436, 2004. ISSN 0969-9961. doi:10.1016/j.nbd.2003.11.015.
- [31] T. Yılmaz, Y. Turan, and A. Keleş. Pathophysiology of the spinal cord injury. *Journal of Clinical & Experimental Investigations/Klinik ve Deneyisel Arastirmalar Dergisi*, 5(1), 2014. doi:10.5799/ahinjs.01.2014.01.0378.
- [32] S. Estrada-Mondaca, A. Carreón-Rodríguez, M. del C. Parra-Cid, C. Ibarra-Ponce De León, C. Velasquillo-Martínez, C.A. Vacanti, and J. Belkind-Gerson. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*, 49(6):437–444, 2007.
- [33] F.M. Maynard Jr, M.B. Bracken, G. Creasey, J.F. Ditunno Jr, W.H. Donovan, T.B. Ducker, S.L. Garber, R.J. Marino, S.L. Stover, and C.H. Tator. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. *Spinal cord*, 35(5):266, 1997. doi:10.1038/sj.sc.3100432.
- [34] T. Cheriyan, D.J. Ryan, J.H. Weinreb, J. Cheriyan, J.C. Paul, V. Lafage, T. Kirsch, and T.J. Errico. Spinal cord injury models: a review. *Spinal cord*, 52(8):588, 2014. doi:10.1038/sc.2014.91.
- [35] M. Sharif-Alhoseini and V. Rahimi-Movaghar. Animal models in traumatic spinal cord injury. In *Topics in Paraplegia*. IntechOpen, 2014. doi:10.5772/57189.
- [36] Y.P. Zhang, L.B.E. Shields, and C.B. Shields. *Experimental Laceration Spinal Cord Injury Model*, pages 461–470. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. ISBN 978-1-60327-185-1. doi:10.1007/978-1-60327-185-1_39.
- [37] S.M. Onifer, A.G. Rabchevsky, and S.W. Scheff. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR journal*, 48(4):385–395, 2007. doi:10.1093/ilar.48.4.385.
- [38] R. Braakman. Mechanism and pathophysiology of spinal and spinal cord injury. *Neurocirugía*, 2(3):232–244, 1991. ISSN 1130-1473. doi:10.1016/S1130-1473(91)71152-4.
- [39] C. A. Oyinbo. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71(2):281–299, 2011.
- [40] S. Caballero Chacón and M. Nieto-Sampedro. Pathophysiology of spinal cord injury. A review. *Veterinaria México*, 36(1):75–86, 2005.
- [41] P. Shende and M. Subedi. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91:693–706, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.126.
- [42] N. Serradj, S.F. Agger, and E.R. Hollis. Corticospinal circuit plasticity in motor rehabilitation from spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 652:94–104, 2017. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.003. Plasticity and Regeneration After Spinal Cord Injury.
- [43] R. Bjugn, J.R. Nyengaard, and J.H. Rosland. Spinal cord transection—no loss of distal ventral horn neurons. *Experimental Neurology*, 148(1):179–186, 1997. doi:10.1006/exnr.1997.6610.

- [44] K. Fouad, M.M. Rank, R. Vavrek, K.C. Murray, L. Sanelli, and D.J. Bennett. Locomotion After Spinal Cord Injury Depends on Constitutive Activity in Serotonin Receptors. *Journal of Neurophysiology*, 104(6):2975–2984, 2010. doi:10.1152/jn.00499.2010. PMID: 20861436.
- [45] V. Dietz, M. Wirz, and L. Jensen. Locomotion in patients with spinal cord injuries. *Physical therapy*, 77(5):508–516, 1997. doi:10.1093/ptj/77.5.508.
- [46] M.M. Adams and A.L. Hicks. Spasticity after spinal cord injury. *Spinal cord*, 43(10):577, 2005. doi:10.1038/sj.sc.3101757.
- [47] R. Bhimani and L. Anderson. Clinical understanding of spasticity: implications for practice. *Rehabilitation research and practice*, 2014:10, 2014. doi:10.1155/2014/279175. Article ID 279175.
- [48] S. Rossignol and A. Frigon. Recovery of locomotion after spinal cord injury: Some facts and mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1):413–440, 2011. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113746. PMID: 21469957.
- [49] C. Yoon and M.H. Tuszynski. *Frontiers Of Spinal Cord And Spine Repair: Experimental Approaches for Repair of Spinal Cord Injury*, pages 1–15. Springer New York, New York, NY, 2012. ISBN 978-1-4614-4090-1. doi:10.1007/978-1-4614-4090-1_1.
- [50] R.J. Giger, E.R. Hollis, and M.H. Tuszynski. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7):a001867, 2010. doi:10.1101/cshperspect.a001867.
- [51] L. Filli and M.E. Schwab. Structural and functional reorganization of propriospinal connections promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neural regeneration research*, 10(4):509, 2015. doi:0.4103/1673-5374.155425.
- [52] G.A.S. Metz, D. Merkler, V. Dietz, M.E. Schwab, and K. Fouad. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, 883(2):165–177, 2000. doi:10.1016/S0006-8993(00)02778-5.
- [53] G.D. Muir and A.A. Webb. Assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, 12(9):3079–3086, 2000. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00205.x.
- [54] G.C. Koopmans, R. Deumens, W.M.M. Honig, F.P.T. Hamers, H.W.M. Steinbusch, and E.A.J. Joosten. The Assessment of Locomotor Function in Spinal Cord Injured Rats: The Importance of Objective Analysis of Coordination. *Journal of Neurotrauma*, 22(2):214–225, 2005. doi:10.1089/neu.2005.22.214. PMID: 15716628.
- [55] 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*, 12(1):1–21, 1995. doi:10.1089/neu.1995.12.1. URL 10.1089/neu.1995.12.1. PMID: 7783230.
- [56] M. Antri, D. Orsal, and J.-Y. Barthe. Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT₂ agonist. *European Journal of Neuroscience*, 16(3):467–476, 2002. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x.
- [57] A.S. Rivlin and C.H. Tator. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of neurosurgery*, 47(4):577–581, 1977. doi:10.3171/jns.1977.47.4.0577.

- [58] J.C. Bresnahan, M.S. Beattie, F.D. Todd, and D.H. Noyes. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impactation device. *Experimental Neurology*, 95(3):548–570, 1987. doi:10.1016/0014-4886(87)90299-8.
- [59] R. Grill, K. Murai, A. Blesch, F.H. Gage, and M.H. Tuszynski. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 17(14):5560–5572, 1997. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-14-05560.1997.
- [60] L.P. Osuna-Carrasco, J.R. López-Ruiz, E.G. Mendizabal-Ruiz, B. De la Torre-Valdovinos, J. Bañuelos-Pineda, I. Jiménez-Estrada, and S.H. Dueñas-Jiménez. Quantitative analysis of hindlimbs locomotion kinematics in spinalized rats treated with tamoxifen plus treadmill exercise. *Neuroscience*, 333:151–161, 2016. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.023.
- [61] M.L. McEwen and J.E. Springer. Quantification of Locomotor Recovery following Spinal Cord Contusion in Adult Rats. *Journal of Neurotrauma*, 23(11):1632–1653, 2006. doi:10.1089/neu.2006.23.1632. PMID: 17115910.
- [62] D.M. Basso, M.S. Beattie, and J.C. Bresnahan. Descending systems contributing to locomotor recovery after mild or moderate spinal cord injury in rats: experimental evidence and a review of literature. *Restorative neurology and neuroscience*, 20(5):189–218, 2002.
- [63] O. Alluin, S. Karimi-Abdolrezaee, H. Delivet-Mongrain, H. Leblond, M.G. Fehlings, and S. Rosignol. Kinematic study of locomotor recovery after spinal cord clip compression injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 28(9):1963–1981, 2011. doi:10.1089/neu.2011.1840.
- [64] C.N. Hansen, W. Linklater III, R. Santiago, L.C. Fisher, S. Moran, J.A. Buford, and D.M. Basso. Characterization of recovered walking patterns and motor control after contusive spinal cord injury in rats. *Brain and Behavior*, 2(5):541–552, 2012. doi:10.1002/brb3.71.
- [65] M.G Fehlings, C.H. Tator, R.D. Linden, and I.R. Piper. Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 69(1):65–78, 1988. doi:10.1016/0013-4694(88)90036-3.
- [66] S. Kabu, Y. Gao, B.K. Kwon, and V. Labhasetwar. Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *Journal of Controlled Release*, 219:141–154, 2015. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.060.
- [67] B.I. Awad, M.A. Carmody, and M.P. Steinmetz. Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury. *World neurosurgery*, 83(1):120–131, 2015. doi:10.1016/j.wneu.2013.01.042.
- [68] K. Keefe, I. Sheikh, and G. Smith. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *International journal of molecular sciences*, 18(3):548, 2017. doi:10.3390/ijms18030548.
- [69] J. Li, Q. Wang, H. Cai, Z. He, H. Wang, J. Chen, Z. Zheng, J. Yin, Z. Liao, and H. Xu. FGF 1 improves functional recovery through inducing PRDX 1 to regulate autophagy and anti-ROS after spinal cord injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(5):2727–2738, 2018. doi:10.1111/jcmm.13566.

- [70] J.R. Bethea, H. Nagashima, M.C. Acosta, C. Briceno, F. Gomez, A.E. Marcillo, K. Loor, J. Green, and W.D. Dietrich. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 16(10):851–863, 1999. doi:10.1089/neu.1999.16.851.
- [71] E.J. Bradbury, L.D.F. Moon, R.J. Popat, V.R. King, G.S. Bennett, P.N. Patel, J.W. Fawcett, and S.B. McMahon. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881):636, 2002. doi:10.1038/416636a.
- [72] A.W. Barritt, M. Davies, F. Marchand, R. Hartley, J. Grist, P. Yip, S.B. McMahon, and E.J. Bradbury. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 26(42):10856–10867, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.2980-06.2006.
- [73] C.H. Cheng, C.T. Lin, M.J. Lee, M.J. Tsai, W.H. Huang, M.C. Huang, Y.L. Lin, C.J. Chen, W.C. Huang, and H. Cheng. Local delivery of high-dose chondroitinase abc in the sub-acute stage promotes axonal outgrowth and functional recovery after complete spinal cord transection. *PLoS One*, 10(9):e0138705, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0138705.
- [74] L.L. Xiong, Y. Li, F.F. Shang, S.W. Chen, H. Chen, S.M. Ju, Y. Zou, H.L. Tian, T.H. Wang, and C.Z. Luo. Chondroitinase administration and pcDNA3. 1-BDNF-BMSC transplantation promote motor functional recovery associated with NGF expression in spinal cord-transected rat. *Spinal cord*, 54(12):1088, 2016. doi:10.1038/sc.2016.55.
- [75] D. Wang, R.M. Ichiyama, R. Zhao, M.R. Andrews, and J.W. Fawcett. Chondroitinase combined with rehabilitation promotes recovery of forelimb function in rats with chronic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 31(25):9332–9344, 2011. doi:10.1523/JNEUROSCI.0983-11.2011.
- [76] S. Karimi-Abdolrezaee, E. Eftekharpour, J. Wang, D. Schut, and M.G. Fehlings. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 30(5):1657–1676, 2010. doi:10.1523/JNEUROSCI.3111-09.2010.
- [77] 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*, 21(12):2222–2238, 2011. doi:10.1089/scd.2011.0596.
- [78] D. Cantinieaux, R. Quertainmont, S. Blacher, L. Rossi, T. Wanet, A. Noël, G. Brook, J. Schoenen, and R. Franzen. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*, 8(8):e69515, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069515.
- [79] J. Qu and H. Zhang. Roles of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Stem cells international*, 2017, 2017. doi:10.1155/2017/5251313.
- [80] M. Zurita and J. Vaquero. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neuroscience letters*, 402(1-2):51–56, 2006. doi:10.1016/j.neulet.2006.03.069.
- [81] M. Zurita and J. Vaquero. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport*, 15(7):1105–1108, 2004.

- [82] H. Liang, P. Liang, Y. Xu, J. Wu, T. Liang, and X. Xu. DHAM-BMSC matrix promotes axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurotrauma*, 26(10):1745–1757, 2009. doi:10.1089/neu.2008.0850.
- [83] J. Luo, H.T. Zhang, X.D. Jiang, S. Xue, and Y.Q. Ke. 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, 2009. doi:10.1007/s00701-009-0402-6.
- [84] A. Okuda, N. Horii-Hayashi, T. Sasagawa, T. Shimizu, H. Shigematsu, E. Iwata, Y. Morimoto, K. Masuda, M. Koizumi, and M. Akahane. 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*, 26(3):388–395, 2017. doi:10.3171/2016.8.SPINE16250.
- [85] P. Lu, L.L. Jones, and M.H. Tuszynski. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Experimental neurology*, 191(2):344–360, 2005. doi:10.1016/j.expneurol.2004.09.018.
- [86] A. Ramón-Cueto, M.I. Cordero, F.F. Santos-Benito, and J. Avila. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25(2):425–435, 2000. doi:10.1016/S0896-6273(00)80905-8.
- [87] A.J. Aguayo, S. David, and G.M. Bray. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *Journal of Experimental Biology*, 95(1):231–240, 1981.
- [88] V. Buzoianu-Anguiano, S. Orozco-Suárez, E. García-Vences, S. Caballero-Chacón, G. Guizar-Sahagún, L. Chavez-Sanchez, and I. Grijalva. 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, 2015. doi:10.1155/2015/389520.
- [89] J. Nordblom, J.K.E. Persson, M. Svensson, and P. Mattsson. Peripheral nerve grafts in a spinal cord prosthesis result in regeneration and motor evoked potentials following spinal cord resection. *Restorative neurology and neuroscience*, 27(4):285–295, 2009. doi:10.3233/RNN-2009-0478.
- [90] F. Pierdoná Guzen, J. Germano Soares, L. Moura de Freitas, J. R. Lopes de Paiva Cavalcanti, F. G. Oliveira, J. Fontenele Araújo, J. de Souza Cavalcante, J. Cley Cavalcante, E. Silva do Nascimento Jr, and M. S. M. de Oliveira Costa. 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(3):265–275, 2012. doi:10.3233/RNN-2012-110184.
- [91] Y.S. Lee, I. Hsiao, and V.W. Lin. Peripheral nerve grafts and afgf restore partial hind-limb function in adult paraplegic rats. *Journal of neurotrauma*, 19(10):1203–1216, 2002. doi:10.1089/08977150260338001.
- [92] N.A. Hasan, M.M. Neumann, M.A. De Souky, K.F. So, and K.S. Bedi. The influence of predegenerated nerve grafts on axonal regeneration from prelesioned peripheral nerves. *Journal of anatomy*, 189(Pt 2):293, 1996.

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con sección completa y crónica de médula espinal

- [93] X. M. Xu, A. Chen, V. Guenard, 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*, 26(1):1–16, 1997. doi:10.1023/A:1018557923309.
- [94] M.A. DePaul, C.Y. Lin, J. Silver, and Y.S. Lee. Combinatory repair strategy to promote axon regeneration and functional recovery after chronic spinal cord injury. *Scientific reports*, 7(1): 9018, 2017. doi:10.1038/s41598-017-09432-6.
- [95] 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*, 26(28):7405–7415, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.1166-06.2006.
- [96] E.C. Tsai, A.V. Krassioukov, and C.H. Tator. Corticospinal regeneration into lumbar grey matter correlates with locomotor recovery after complete spinal cord transection and repair with peripheral nerve grafts, fibroblast growth factor 1, fibrin glue, and spinal fusion. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(3):230–244, 2005. doi:10.1093/jnen/64.3.230.
- [97] C.C. Theisen, R. Sachdeva, S. Austin, D. Kulich, V. Kranz, and J.D. Houle. Exercise and peripheral nerve grafts as a strategy to promote regeneration after acute or chronic spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 34(10):1909–1914, 2017. doi:10.1089/neu.2016.4640.
- [98] M.A. De Paul, C.Y. Lin, J. Silver, and Y.S. Lee. 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):e0139335, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0139335.
- [99] V.J. Tom, H.R. Sandrow-Feinberg, K. Miller, L. Santi, T. Connors, M.A. Lemay, and J.D. Houlé. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 29(47):14881–14890, 2009. doi:10.1523/JNEUROSCI.3641-09.2009.
- [100] V.J. Tom and J.D. Houlé. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Experimental neurology*, 211(1):315–319, 2008. doi:10.1016/j.expneurol.2008.01.021.
- [101] V.J. Tom, H.R. Sandrow-Feinberg, K. Miller, C. Domitrovich, J. Bouyer, V. Zhukareva, M.C. Klaw, M.A. Lemay, and J. D. Houlé. 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*, 239:91–100, 2013. doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.011.
- [102] K. Fouad, L. Schnell, M.B. Bunge, M.E. Schwab, T. Liebscher, and D.D. Pearse. Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 25(5): 1169–1178, 2005. doi:10.1523/JNEUROSCI.3562-04.2005.
- [103] M. Shinozaki, A. Iwanami, K. Fujiyoshi, S. Tashiro, K. Kitamura, S. Shibata, H. Fujita, M. Nakamura, and H. Okano. Combined treatment with chondroitinase ABC and treadmill rehabilitation for chronic severe spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience research*, 113:37–47, 2016. doi:10.1016/j.neures.2016.07.005.

- [104] T. Xia, B. Huang, S. Ni, L. Gao, J. Wang, J. Wang, A. Chen, S. Zhu, B. Wang, and G. Li. The combination of db-cAMP and ChABC with poly (propylene carbonate) microfibers promote axonal regenerative sprouting and functional recovery after spinal cord hemisection injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86:354–362, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.045.
- [105] A. Hejčl, J. Šedý, M. Kapcalová, D. A. Toro, T. Amemori, P. Lesný, K. Likavčanová-Mašínová, E. Krumbholcová, M. Přádny, and J. Michálek. HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem cells and development*, 19(10):1535–1546, 2010. doi:10.1089/scd.2009.0378.
- [106] P. Lu, L.L. Jones, and M.H. Tuszynski. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Experimental neurology*, 203(1):8–21, 2007. doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.030.
- [107] K. Kadoya, S. Tsukada, P. Lu, G. Coppola, D. Geschwind, M.T. Filbin, A. Blesch, and M.H. Tuszynski. Combined intrinsic and extrinsic neuronal mechanisms facilitate bridging axonal regeneration one year after spinal cord injury. *Neuron*, 64(2):165–172, 2009. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.016.
- [108] M. Koda, T. Kamada, M. Hashimoto, M. Murakami, H. Shirasawa, S. Sakao, H. Ino, K. Yoshinaga, S. Koshizuka, and H. Moriya. 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*, 16(12):2206–2214, 2007. doi:10.1007/s00586-007-0499-3.
- [109] J. Chen, Z. Zhang, J. Liu, R. Zhou, X. Zheng, T. Chen, L. Wang, M. Huang, C. Yang, and Z. Li. Acellular spinal cord scaffold seeded with bone marrow stromal cells protects tissue and promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *Journal of neuroscience research*, 92(3):307–317, 2014. doi:10.1002/jnr.23311.
- [110] X. Zeng, Y.S. Zeng, Y.H. Ma, L.Y. Lu, B.L. Du, W. Zhang, Y. Li, and W.Y. Chan. Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 20(11-12):1881–1899, 2011. doi:10.3727/096368911X566181.
- [111] W. Liu, Y. Ding, X. Zhang, and L. Wang. Bone marrow stromal cells inhibit caspase-12 expression in rats with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine*, 6(3):671–674, 2013. doi:10.3892/etm.2013.1201.
- [112] 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*, 7(6):e39500, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0039500.
- [113] Y. Akiyama, C. Radtke, O. Honmou, and J.D. Kocsis. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*, 39(3):229–236, 2002. doi:10.1002/glia.10102.
- [114] P. Ding, Z. Yang, W. Wang, J. Wang, and L. Xue. 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. *American journal of translational research*, 6(3):224, 2014.

- [115] A.J. Nauta and W.E. Fibbe. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10):3499–3506, 2007. doi:10.1182/blood-2007-02-069716.
- [116] K.R. Jessen and R. Mirsky. The repair schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of physiology*, 594(13):3521–3531, 2016. doi:10.1113/JP270874.
- [117] S.M. Amr, A. Gouda, W.T. Koptan, A.A. Galal, D.S. Abdel-Fattah, L.A. Rashed, H.M. Atta, and M.T. Abdel-Aziz. Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan-laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co-transplantation with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: Case series of 14 patients. *The journal of spinal cord medicine*, 37(1):54–71, 2014. doi:10.1179/2045772312Y.0000000069.
- [118] M.P. Côté, A.A. Amin, V.J. Tom, and J.D. Houle. Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 8(2):294–303, 2011. doi:10.1007/s13311-011-0024-6.
- [119] J.C.F. Kwok, F. Afshari, G. Garcia-Alias, and J.W. Fawcett. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restorative neurology and neuroscience*, 26(2, 3):131–145, 2008.
- [120] E.J. Bradbury and L.M. Carter. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain research bulletin*, 84(4-5):306–316, 2011. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.06.015.
- [121] K.S. Cho, X.M. Xu, V. Guenard, and M.B. Bunge. Kinematic Analysis of Restored Gait after Transection and Grafting of Schwann Cell-Seeded Guidance Channels into Adult Rat Spinal Cord. *Spinal Surgery*, 12(2):123–144, 1998. doi:10.2531/spinalsurg.12.123.
- [122] D. Calderón-Vallejo, A. Quintanar-Stephano, I. Hernández-Jasso, V. Jiménez-Hernández, J. Ruiz-Ornelas, I. Jiménez, and J.L. Quintanar. Functional and structural recovery of the injured spinal cord in rats treated with gonadotropin-releasing hormone. *Neurochemical research*, 40(3):455–462, 2015. doi:10.1007/s11064-014-1486-9.
- [123] C. Escobar-Corona, S. Torres-Castillo, E.E. Rodríguez-Torres, B. Segura-Alegría, I. Jiménez-Estrada, and S. Quiroz-González. Electroacupuncture improves gait locomotion, H-reflex and ventral root potentials of spinal compression injured rats. *Brain research bulletin*, 131:7–17, 2017. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.02.008.
- [124] K. Ollivier-Lanvin, I. Fischer, V. Tom, J.D. Houlé, and M.A. Lemay. Either BDNF or NT-3 only neurotrophin producing grafts promote locomotor recovery in untrained spinalized cats. *Neurorehabilitation and neural repair*, 29(1):90, 2015. doi:10.1177/1545968314532834.
- [125] J.R. Cazalets, M. Borde, and F. Clarac. Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *Journal of Neuroscience*, 15(7):4943–4951, 1995. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-07-04943.1995.
- [126] J. Vaquero and M. Zurita. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair, A challenge for contemporary neurobiology. *Histology and histopathology*, 2009. doi:10.14670/HH-24.107.
- [127] X. Chen, Y. Yang, J. Yao, W. Lin, Y. Li, Y. Chen, Y. Gao, Y. Yang, X. Gu, and X. Wang. 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(10):2347, 2011. doi:10.1007/s10856-011-4401-9.

Evaluación de la función locomotora después de una LTME en ratas adultas con
sección completa y crónica de médula espinal

- [128] I.B. Black and D. Woodbury. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(3):632–636, 2001. doi:10.1006/bcmd.2001.0423.

ANEXO A. Escala de la BBB estándar

No. Descripción

- 1 No se observan movimientos en ambas patas traseras (PT)
 - 2 Movimiento limitado (arco < 50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla
 - 3 Movimiento amplio (arco > 50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra
 - 4 Movimiento amplio de dos articulaciones
 - 5 Movimiento limitado de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo)
 - 6 Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera
 - 7 Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera
 - 8 Movimiento amplio de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo)
 - 9 Movimientos rítmicos (coordinados) de ambas PT sin soporte de paso o colocación de la planta, pero in soporte de peso
 - 10 Colocación plantar con soporte de paso cuando no está caminando o pasos ocasionales (\leq al 50%), frecuente (51% a 94%), o constantes (95% a 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar
 - 11 Pasos ocasionales con soporte de paso plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT
 - 12 Pasos frecuentes o constantes con soporte de paso plantar, sin coordinación entre PD y PT
 - 13 Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT
 - 14 Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT
 - 15 Constantemente de pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay dotación interna o externa de la pata, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales
 - 16 Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia adelante. Al hacer contacto con el piso predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo
 - 17 Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia al cuerpo, pero la rota al levantarla
 - 18 Lo mismo que el punto anterior, pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar)
 - 19 La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominó la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla
 - 20 Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominó la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo
 - 21 Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constantes. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominó la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad de tronco
 - 22 Lo mismo que el punto anterior, pero con tronco constantemente estable
-

ANEXO B. Escala de la BBB modificada

Puntaje del desempeño motor	Movimiento	Alternancia Der-Izq	Amplitud	Soporte de peso corporal	Colocación plantar de pie
Nivel 1					
0	No	-	-	-	-
1	Espasmos débiles	-	-	-	-
Nivel 2					
2	Si	No	Corta	-	-
3	Si	No	Amplio	-	-
4	Si	Ocasional	Corto	-	-
5	Si	Ocasional	Amplio	-	-
6	Si	Frecuente	Corto	-	-
7	Si	Frecuente	Amplio	-	-
8	Si	Cnsistente	Corto	-	-
9	Si	Consistente	Amplio	-	-
Nivel 3					
10	Si	Si	Amplio	Ocasional	-
Nivel 4					
11	Si	Ocasional	Amplio	No	Ocasional
12	Si	Frecuente	Amplio	No	Ocasional
13	Si	Frecuente	Amplio	Ocasional	Ocasional
14	Si	Consistente	Amplio	No	Ocasional
15	Si	Consistente	Amplio	Ocasional	Ocasional
16	Si	Frecuente	Amplio	Frecuente	Frecuente
17	Si	Frecuente	Amplio	Frecuente	Consistente
18	Si	Frecuente	Amplio	Consistente	Frecuente
19	Si	Frecuente	Amplio	Consistente	Consistente
20	Si	Existente	Amplio	Consistente	Ocasional
21	Si	Existente	Amplio	Consistente	Frecuente
22	Si	Existente	Amplio	Consistente	Consistente