



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**EFFECTO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO BIOACTIVO DERIVADO DE LA
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP)
EN UN MODELO DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN RATAS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CD. ALÍ ISRAEL SOSA SERRANO

**TUTORES: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO
Dr. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

*Vó Bo
Enr Romo*

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A la memoria de Manuel Miranda Benítez

*“El recuerdo indeleble de tu consejo y amistad trascenderá
más allá de tu existencia”.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar agradeciendo a mi esposa Astrid y a mi hijo Emiliano por ser mi motivación y apoyo constante durante la realización de mis estudios de maestría.

A mis padres y mi hermana por alentarme a dar el extra en el ámbito académico y profesional

Mi más profundo agradecimiento y admiración para el Dr. Enrique Romo Arévalo y el Dr. Gabriel Guízar Sahagún por compartir conmigo la pasión por la investigación, por brindarme su amistad, paciencia y apoyo en los momentos difíciles, sobre todo por acceder a guiarme durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Lía Hoz, por su entusiasmo, consejo, amistad y cariño maternal que siempre mostró hacia mí.

Mi agradecimiento a mi amigo y colega Rodrigo Correa, por ser el responsable de mi llegada al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados.

Al Dr. Higinio Arzate por aceptarme dentro de su equipo de trabajo, por su apoyo y seguimiento durante mi formación como maestro.

También quiero externar mi agradecimiento para el personal del Proyecto Camina A.C. por ayudar con mi desarrollo personal durante mi estancia en la institución.

A mis amigos, y todas aquellas personas que son parte de mi vida por contribuir con su granito de arena.

Al proyecto DGAPA PAPIIT IN206420

Sin todos ustedes nada de esto habría sido posible... ¡gracias totales!

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1 MARCO TEÓRICO	5
MÉDULA ESPINAL	6
- Sustancia Blanca.....	7
- Sustancia Gris	7
MENINGES.....	8
- Duramadre	8
- Aracnoides.....	9
- Piamadre.....	9
MIELINA.....	10
BARRERA HEMATO ENCEFÁLICA.....	11
LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL	12
- Etiología.....	12
- Fisiopatología.....	12
MODELOS ANIMALES DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL.....	15
- Modelo de sección completa.....	15
- Modelo de compresión	15
- Modelo de lesión traumática	15
CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES	16
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP)	20
PEPTIDO DERIVADO DE HACD1/CAP.....	20
CAPÍTULO 3 TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	22
- Planteamiento del problema.....	23

- Justificación	23
- Hipótesis	24
- Objetivo general	24
- Objetivos específicos.....	24
METODOLOGÍA.....	25
- Prueba piloto	25
- Experimento	25
- Método de anestesia	26
- Entrenamiento quirúrgico.....	27
- Procedimiento de lesión de Medula espinal.....	28
- Cuidados post lesión	29
- Desbridamiento de la lesión	29
- Elaboración y colocación de los implantes.....	29
- Procedimiento histológico.....	31
- Ensayo de inmunohistoquímica.....	31
- Evaluación funcional.....	31
- Análisis estadístico.....	32
- Análisis de Kaplan-Meier	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS	53

RESUMEN

Las lesiones en la médula espinal afectan al sistema nervioso central, cuyas repercusiones pueden llegar a la pérdida de la función neuronal de forma devastadora y permanente. Esto se debe a la pérdida de la reconexión axonal, que resulta en la parálisis y pérdida de sensibilidad del cuerpo, así como la pérdida de diversas funciones autónomas; la severidad del daño depende del nivel y la intensidad del traumatismo. La fisiopatología de la lesión medular comprende tres etapas; lesión primaria, lesión secundaria y cicatrización glial. De estos eventos, la cicatrización glial al tratar de limitar el daño en la médula espinal impedirá de una manera irreversible la regeneración axonal y la reconexión neuronal en la zona de la lesión primaria. Desafortunadamente, a la fecha no existe tratamientos capaces de promover regeneración neuronal que permita revertir la discapacidad motora y sensorial.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto morfo-funcional del péptido AVIFM derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP (péptido) y de la Hidrazida del ácido 4-aminobenzoico (Hidrazida) en un modelo murino de lesión en médula espinal.

Para cumplir nuestros objetivos, utilizamos un modelo de lesión moderada de médula espinal en 60 ratas hembra de la cepa Long-Evans que fueron divididas en tres grupos control (lesión, lesión más desbride y lesión más desbride más vehículo) y tres grupos experimentales (lesión más desbride más péptido, lesión más desbride más Hidrazida y lesión más desbride más péptido e Hidrazida). El desbridamiento y la colocación de los implantes se realizó 24 horas post-lesión, la evaluación funcional se realizó cada semana durante 8 semanas mediante la escala BBB. Las ratas se sacrificaron al concluir el periodo de evaluación para realizar el estudio histológico.

Nuestros resultados muestran que el péptido en combinación con la Hidrazida promueve la recuperación de la función motora y la sobrevivencia de los sujetos de estudio. Estos hallazgos promueven el uso de los péptidos cemento específicos en tejidos diferentes a los tejidos mineralizados.

ABSTRACT

Spinal cord injuries affect the central nervous system, the repercussions of which can lead to a devastating and permanent loss of neuronal function. This is due to the loss of axonal reconnection, which results in paralysis and loss of sensation of the body, as well as the loss of various autonomous functions; the severity of the damage depends on the level and intensity of the trauma. The pathophysiology of spinal cord injury comprises three stages; primary injury, secondary injury, and glial scarring. Of these events, glial scarring in trying to limit spinal cord damage will irreversibly prevent axonal regeneration and neuronal reconnection in the area of the primary injury. Unfortunately, to date there are no treatments capable of promoting neuronal regeneration that allows reversing motor and sensory disability.

The objective of this work was to evaluate the morpho-functional effect of the AVIFM peptide derived from the adhesion protein of root cement HACD1 / CAP (peptide) and from the hydrazide of 4-aminobenzoic acid (Hydrazide) in a murine model of spinal cord injury. spinal.

To meet our objectives, we used a model of moderate spinal cord injury in 60 female rats of the Long-Evans strain that were divided into three control groups (lesion, lesion plus debridement and lesion plus debride plus vehicle) and three experimental groups (lesion plus debridement plus vehicle). more debride more peptide, more debride lesion plus Hydrazide and more debride lesion plus peptide and Hydrazide). Debridement and implant placement was performed 24 hours post-injury, functional evaluation was performed every week for 8 weeks using the BBB scale. The rats were sacrificed at the end of the evaluation period for the histological study.

Our results show that the peptide in combination with Hydrazide promotes the recovery of motor function and survival of the study subjects. These findings promote the use of specific cementum peptides in tissues other than mineralized tissues.

INTRODUCCIÓN

La lesión de médula espinal es una condición severa que implica la pérdida de la función sensitiva y motora debajo del sitio de lesión, además de alterar las funciones autónomas correspondientes. Después de un traumatismo en la médula, el tejido empieza a presentar muerte celular, la degeneración de la mielina aunada a la pérdida de la conexión axonal, infiltración de neutrófilos y la ruptura de la barrera selectiva que sella a la médula espinal: la barrera hemato-encefálica¹⁻³.

Esta condición sigue siendo considerada como un estado incurable e irreversible en el cual el tratamiento era solamente paliativo; sin embargo, no fue hasta el siglo XX con el desarrollo de tecnologías como los estudios de imagen, cuando se inició con la investigación de nuevas estrategias encaminadas al manejo de la lesión de médula espinal, principalmente causada por traumatismos⁴⁻⁵.

Las primeras investigaciones se enfocaron en el manejo de la respuesta inflamatoria con la administración de corticoesteroides, cuyos efectos en las dosis adecuadas impedían o limitaban la inflamación que ya era relacionada con el mal pronóstico de este estado⁶.

Con el descubrimiento de las células troncales y de la capacidad de regeneración del Sistema Nervioso Central (SNC) cambió el enfoque de la investigación básica y clínica hacia el desarrollo de terapias basadas en células que no solo restauraban la pérdida de componentes estructurales, también producirían moléculas promotoras de la regeneración tisular, sin embargo, la capacidad de supervivencia de las células implantadas se veía reducida debido al ambiente inhóspito generado durante el desarrollo de los mecanismos de daño. Así comenzó la búsqueda de moléculas o procedimientos que devolvieran las condiciones extracelulares favorables para la regeneración del tejido nervioso⁷⁻⁹.

En los últimos años se ha creado otra perspectiva de investigación basada en la administración de sustancias o moléculas que promuevan la proliferación, migración y diferenciación de las células conservadas en el sitio del daño sin la necesidad de la implantación de células. El empleo de proteínas recombinantes y péptidos bioactivos resulta una opción prometedora; dichas moléculas han sido empleadas en varios modelos preclínicos para regenerar ciertos tejidos¹⁰.

En este sentido, en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la UNAM, se ha realizado investigación sobre el potencial biotecnológico de las proteínas cemento específicas HACD1/CAP y CEMP1. De dichas moléculas, han derivado péptidos

bioactivos que han demostrado la inducción del proceso de mineralización. Uno de esos péptidos es el denominado AVIFM (que corresponde a los primeros cinco aminoácidos del extremo carboxilo terminal de HACD1/CAP), dicha molécula promueve la migración y la diferenciación de células troncales mesenquimales en sitios con defectos críticos, lo que se traduce en la regeneración del tejido dañado y la recuperación de la función de manera similar al tejido sano¹¹⁻¹⁴.

Es por esto, que el uso del péptido AVIFM resulta en una opción prometedora que pudiera promover la regeneración del tejido nervioso por medio de la regulación positiva de la proliferación, migración y diferenciación celular, lo que se traduciría en la recuperación de las funciones perdidas.

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

MÉDULA ESPINAL

La médula espinal es la estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) situada dentro de la columna vertebral, su principal función es transmitir los impulsos nerviosos provenientes del cerebro con el resto del organismo, como se aprecia en la **FIGURA 1**. La información que se obtiene de los estímulos externos viaja a través de los nervios periféricos y se propaga hacia el encéfalo a través de las vías ascendentes, mientras que, la información que se convertirá en la respuesta motora o las funciones autónomas es producida en el cerebro, pasa a través de las vías descendientes y se continúa a los nervios espinales. Estos nervios se disponen en pares y se conectan con el segmento correspondiente de la médula espinal por medio de las raíces dorsal (sensitiva) y ventral (motora) respectivamente, dispuestas en una configuración segmentaria estructural y funcional, así dividen el control nervioso por regiones específicas en el organismo ¹⁵.

En un corte transversal de la médula espinal se pueden distinguir un área central en forma de mariposa que contiene cuerpos neuronales (sustancia gris) que se encuentra rodeada por las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas². La conformación de estas áreas se aprecia en la **FIGURA 2**.

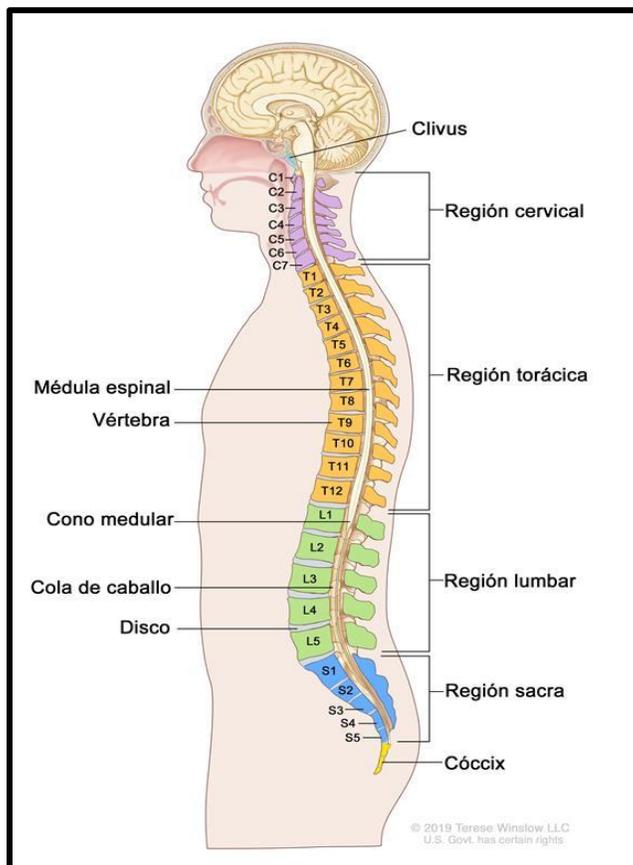


FIGURA 1: Corte lateral de la columna vertebral, donde se aprecia la médula espinal dividida en sus secciones: cervical, torácica, lumbar, sacro y coccígea¹.

- Sustancia blanca

Esta organizada en columnas: anterior, posterior y lateral, cada columna contiene haces de axones recubiertos de mielina a lo largo de la médula espinal, estas fibras siguen direcciones que pueden ser ascendentes y descendientes. Las fibras ascendentes de la columna posterior transmiten la información relacionada con el tacto, vibración y el sentido del movimiento consciente. La información relacionada con el dolor y temperatura y tacto fuerte es transmitida por las fibras de la columna lateral y la información de la propiocepción inconsciente del sistema músculo esquelético se conduce a través de las columnas anteriores. Por otro lado, las vías descendentes se localizan en las columnas laterales, estas se encargan del movimiento voluntario, el balance y movimientos posturales^{15,16}.

- Sustancia gris

Esta zona está conformada por los cuerpos neuronales que se dividen en 10 grupos, como puede observarse en la **FIGURA 2**, y se denominan: láminas de Rexed; de dorsal a ventral las primeras 6 láminas componen la asta posterior, a su vez, la asta anterior se extiende de la séptima a la novena lámina, por último, la décima lámina se ubica en el centro de la médula espinal. Estas láminas, contienen las neuronas que dan origen a los tractos ascendentes y descendientes de la sustancia blanca. La primera lámina da origen a la vía que transmite la información sobre el dolor y estímulos que serán conducidos al tálamo, la segunda lámina recibe información de las columnas posteriores y laterales, además lleva axones hacia las láminas 3 y 4, la tercera lámina está compuesta de neuronas de tamaño variable y recibe las sinapsis que provienen de la raíz posterior, a su vez, recibe dendritas de la cuarta a la sexta lámina, la cuarta lámina da la respuesta a los estímulos de tacto y proyecta axones hacia la segunda lámina, la quinta lámina está compuesta por neuronas que envían sus dendritas hacia la segunda lámina y reciben información nociceptiva proveniente de las vísceras, la sexta lámina se encuentra dividida en una región medial y una lateral, la medial recibe los axones que provienen de los músculos, en la zona lateral se encuentran las neuronas que participan en los reflejos espinales, por su parte la séptima lámina es conocida como el núcleo intermedio lateral, sus neuronas reciben la información de la tercera a la sexta lámina al igual que de las fibras viscerales, esta lámina funciona como un relevo intermedio en la transmisión de los impulsos motores, las neuronas de la octava lámina modulan la actividad motora, es decir, son el origen de la inervación de los músculos, la lámina nueve contiene en su interior células neuronales de diferentes tamaños que dan origen a axones nerviosos motores que se encargan

de la inervación del músculo esquelético, por último, la décima lámina se encuentra en el núcleo y contiene neuronas que se extienden hacia el lado contrario de la médula espinal¹⁵⁻¹⁷.

La sustancia gris y la sustancia blanca se encuentran rodeadas por las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre).

MENINGES

- Duramadre

Es la membrana más externa de origen mesenquimal, es decir, está formada por tejido conectivo, principalmente por fibroblastos y fibras de Colágena dispuestas en diferentes direcciones. Estructuralmente la duramadre se compone de dos capas; una externa (periostio) y una interna (capa meníngea) esta última caracterizada por una menor población de fibroblastos y menos fibras de colágena comparada con la capa externa, en medio de estas dos capas se encuentran los vasos sanguíneos (arterias y senos venosos) que proporcionan la nutrición a la médula espinal^{16,18}.

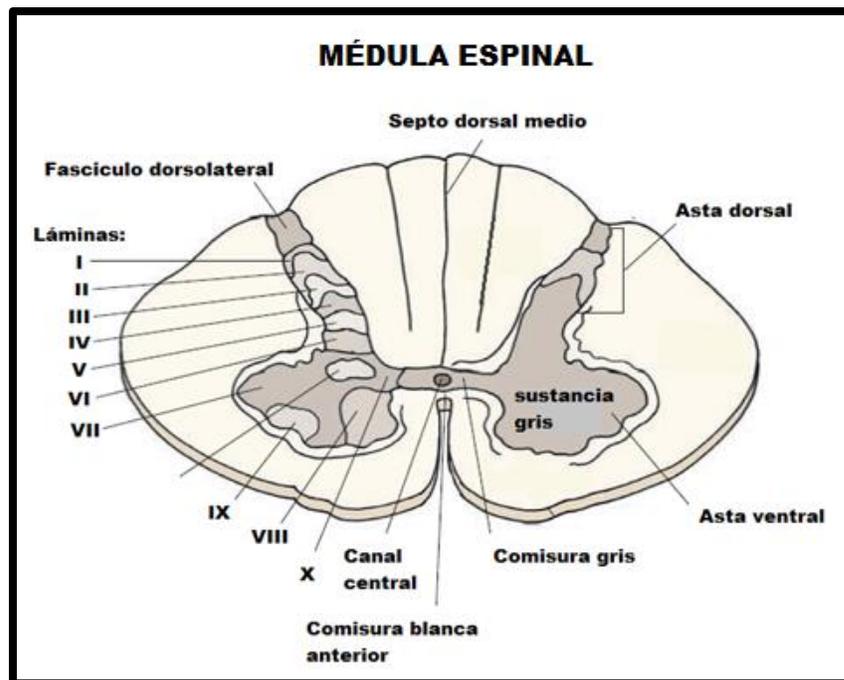


FIGURA 2: Conformación estructural de la médula espinal; la sustancia gris se compone de los cuerpos neuronales, mientras que la sustancia blanca se compone de los tractos nerviosos ascendentes (sensitivos) y descendentes (motores)².

- Aracnoides

Es la membrana intermedia en la cual se forma y contiene el líquido cefalorraquídeo (LCR), su estructura se compone de dos capas celulares diferentes: la primera son las células de la barrera aracnoidea, que impiden el movimiento de fluido a través de ella, mientras que, la segunda capa celular se encuentra la capa reticular, estas células se unen a la piamadre^{4,5}.

Dentro de la aracnoides se encuentran estructuras llamadas granulaciones y vellosidades, las cuales regulan el volumen de LCR transfiriéndolo al torrente sanguíneo¹⁶⁻¹⁸.

- Piamadre

Es una membrana vascular que se encuentra en íntimo contacto con la médula espinal y se extiende hacia cada lado para formar el ligamento dentado donde se adhiere a la aracnoides y la duramadre, así, mantiene a la médula espinal suspendida dentro de las meninges y la protege del daño causado por el movimiento¹⁶⁻¹⁸.

La disposición anatómica de las meninges puede apreciarse en la **FIGURA 3**.

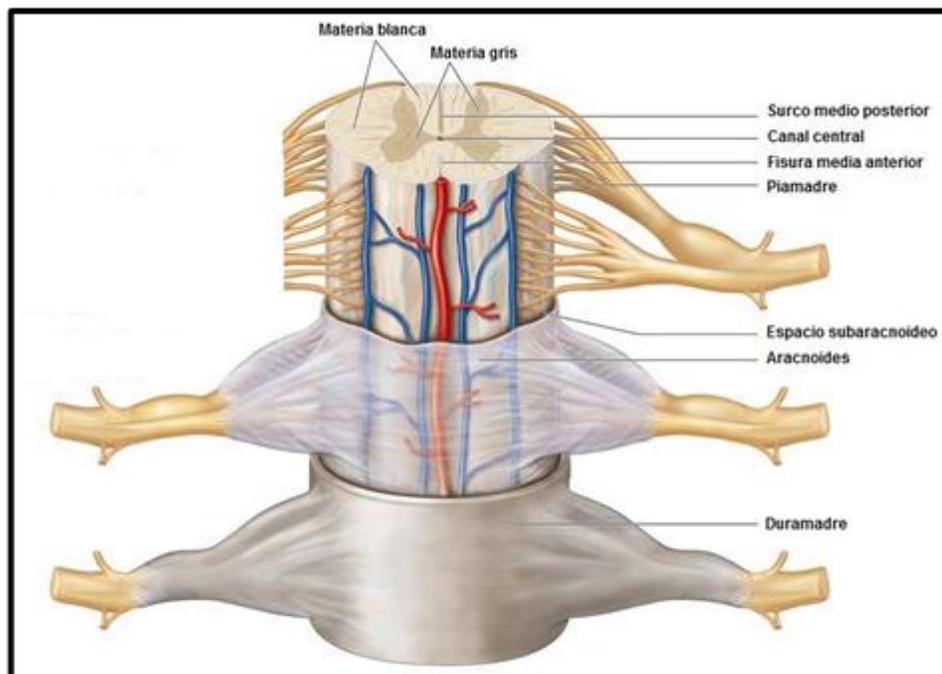


FIGURA 3: Disposición anatómica de las meninges y su relación con la médula espinal³.

MIELINA

Los axones neuronales que conforman los haces nerviosos se encuentran cubiertos por una sustancia conformada en un 80% de lípidos y un 20% de proteínas. Como se muestra en la **FIGURA 4**, en el sistema nervioso central dicha cubierta es provista por los oligodendrocitos, mientras que, en el sistema nervioso periférico, las células de Schwann cubren los haces nerviosos. Su principal función es aumentar la velocidad de los impulsos nerviosos¹⁷⁻¹⁹.

La mielina rodea los axones y adquiere una forma de tubo segmentado, cada segmento de 1 a 2 μm es denominado como nodo de Ranvier, en estos nodos las señales nerviosas saltan y se transmiten, además de esta función, la mielina aumenta la resistencia de los axones y actúa como un aislante electroquímico que evita que el impulso nervioso se propague a las células adyacentes¹⁸⁻¹⁹.

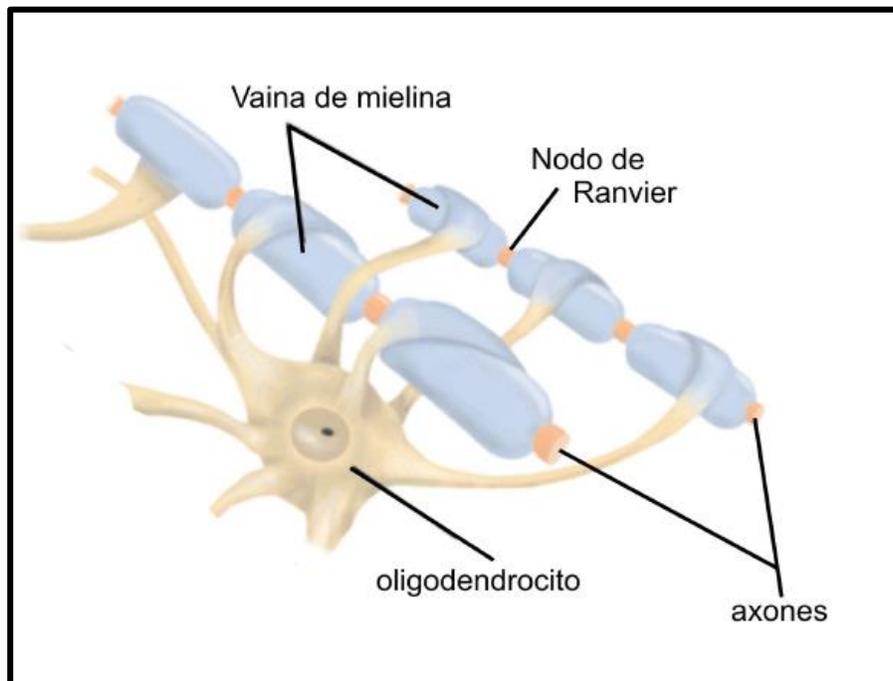


FIGURA 4: Representación esquemática de la formación de la vaina de mielina en el SNC, los pedículos del oligodendrocito se envuelven en los axones nerviosos⁵.

BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

Es una estructura constituida por las células del endotelio, los pericitos, astrocitos perivasculares, la lámina basal de la pared capilar y las células de la microglía como puede observarse en la **FIGURA 5**. El endotelio de los capilares que constituyen la BHE es continuo, lo que lo vuelve impermeable, esto lo convierte en un sistema a de difusión que restringe la entrada de moléculas presentes en el torrente sanguíneo y que pueden ser neurotóxicos, mientras que provee los nutrientes esenciales al sistema nervioso central (SNC). Los pericitos dan apoyo estructural y estabilidad a la red vascular que le confiere capacidad vaso dinámica a los capilares. Por su parte las células de la microglía se encargan de la restricción del paso libre de las moléculas, lo que implica una permeabilidad selectiva y protegen al SNC de la entrada de patógenos²⁰⁻²².

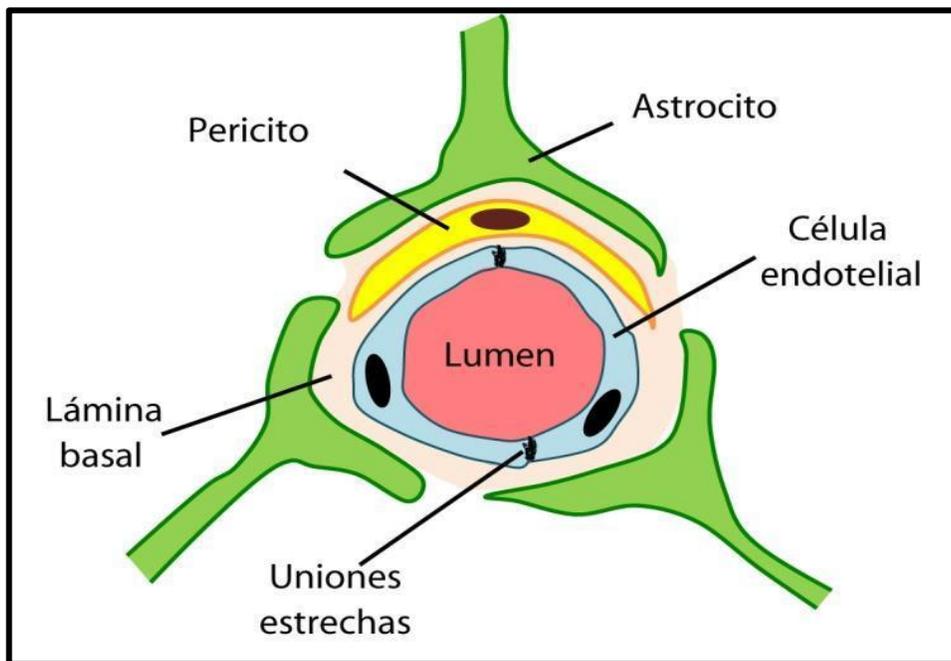


FIGURA 5: Representación esquemática de la BHE; las células que componen el endotelio se ensamblan íntimamente por medio de uniones estrechas, a su alrededor se encuentran los pericitos, por último, los pedúnculos de los astrocitos envuelven el vaso sanguíneo⁴.

LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL

La lesión de médula espinal produce una de las discapacidades más graves que puede sufrir una persona, por lo que tiene repercusiones físicas y psicosociales importantes en los pacientes que la presentan⁷. La Organización Mundial de la Salud estima que tiene una incidencia global de 250,000 a 500,000 casos cada año²³.

La incidencia de dicha lesión es 4 veces mayor en hombres que en mujeres, siendo los grupos de edad más afectados de 19 a los 29 años y en personas de más de 65 años⁷⁻⁹. El 70% de todos estos pacientes presentan diversas complicaciones de salud, todas ellas asociadas principalmente a la pérdida de la función sensitiva y motora de las extremidades (repercusiones psicológicas, atrofia muscular, dolor crónico, infecciones urinarias y ulceraciones posturales). La calidad y esperanza de vida de los pacientes se ve afectada en diferentes niveles dependiendo del grado y el nivel del daño ocasionado a la médula espinal^{24,25}.

- **Etiología.**

La lesión de médula espinal puede ser causada por diversos factores como alteraciones congénitas, síndromes degenerativos, neoplasias y principalmente traumatismos originados en su mayoría por accidentes automovilísticos, caídas y actos violentos²⁶.

- **Fisiopatología**

Después del traumatismo en la médula espinal se da la pérdida de neuronas y de células gliales alrededor del sitio de la lesión, primero se origina la necrosis del tejido que se traduce en cambios metabólicos irreversibles, con lo que se desencadenan la pérdida de la conformación histológica que afecta a la sustancia blanca y gris²⁷⁻²⁹.

La lesión traumática de médula espinal comprende la lesión primaria con la subsecuente extensión del daño denominada lesión secundaria y maduración de la cicatriz glial que se traducirá como alteraciones en las funciones autónomas, sensitivas y motoras²⁸.

La lesión primaria es el resultado de las fuerzas físicas aplicadas a las estructuras que componen la columna vertebral, el traumatismo puede ir desde compresión, cizallamiento, o elongación que provocan la ruptura de la barrera hematoencefálica, la disrupción neuronal, la ruptura de vasos sanguíneos y de las membranas celulares, estos eventos, sumados al espasmo vascular originan isquemia, hipoxia e hipoglucemia²⁹.

Las células propias de la sangre llegan al sitio de lesión gracias a la ruptura vascular, provocando la acumulación de fluido extracelular y la activación de los astrocitos que inician con el edema en la zona inicial de impacto¹¹. Dentro de las primeras 24 horas se hace presente la necrosis y la degeneración de la mielina en los axones afectados, también ocurre la llegada de células fagocíticas que desencadenaran la respuesta inflamatoria²⁷⁻²⁹.

La liberación de moléculas como el Adenosín trifosfato (ATP) por parte de los somas neuronales destruidos o hierro proveniente de los glóbulos rojos a la matriz extracelular activa a las células de la microglía y a las células fagocíticas, que inician con la producción de especies reactivas del oxígeno, específicamente ácido hipocloroso, que es sintetizado por la Mieloperoxidasa. Dicha enzima es secretada abundantemente por las células inflamatorias presentes en la zona de impacto (neutrófilos, macrófagos) y se considera como una molécula efectora clave en la cascada inflamatoria, además de ser una de las principales implicadas en el daño a la cubierta de mielina y a las neuronas en el sistema nervioso central por medio de la peroxidación de los lípidos contenidos en la mielina^{26,27}.

A su vez, las moléculas proinflamatorias provocan el aumento en la proliferación y la activación de los astrocitos, estos liberan proteoglicanos ricos en condroitín sulfato o CSPG cuya estructura se aprecia en la **FIGURA 6** (Brevicano, Agrecano, serglicina y decorina) y

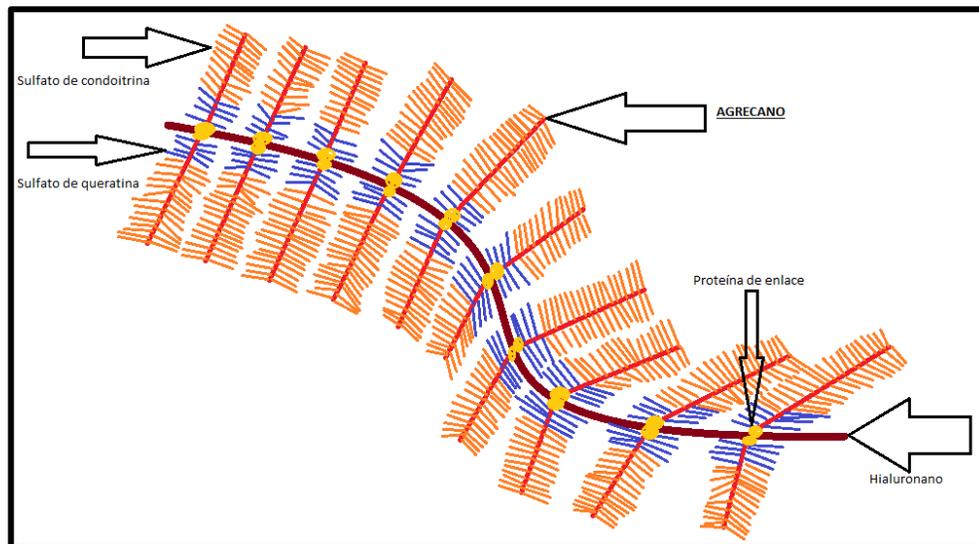


FIGURA 6: Estructura general de los Proteoglicanos del Condroitín sulfato, constituidos por un núcleo proteínico al que se unen cadenas laterales de condroitín sulfato, son secretados por los oligodendrocitos que componen la cicatriz glial⁶.

proteína inhibidora del crecimiento de Neuritas (Nogo), interrumpiendo el crecimiento y la reconexión de los axones³⁰.

Por último, los astrocitos se agrupan alrededor del sitio inicial de impacto formando una barrera física que contribuye con la interrupción en la reconexión axonal, a su vez, los fibroblastos presentes en el tejido conectivo adyacente proliferan, se agrupan cerca de las capas de astrocitos reactivos y producen fibras de colágena que completan la formación de esta barrera llamada cicatriz glial, la suma de estos eventos se traduce en la pérdida de la función sensitiva y motora, cabe mencionar que el tamaño de la cicatriz glial depende directamente de la gravedad del daño³⁰⁻³². La conformación estructural de la cicatriz glial se aprecia en la **FIGURA 7**.

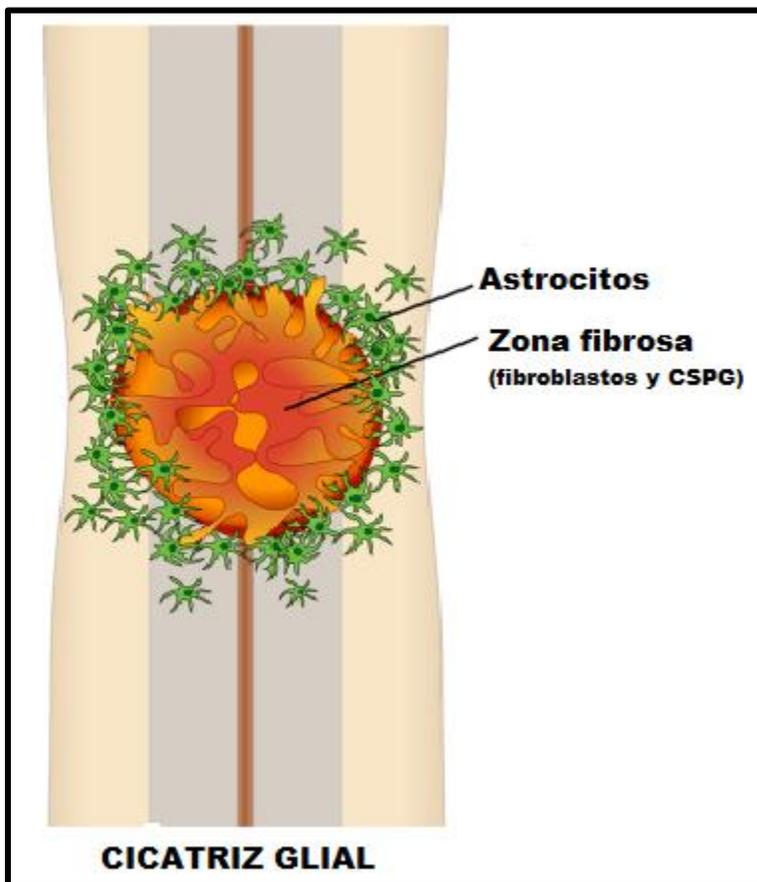


FIGURA 7: Representación esquemática de la cicatriz glial; los astrocitos y los fibroblastos se disponen en la periferia de la zona de lesión e impiden la reconexión axonal⁷.

MODELOS ANIMALES DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL

Uno de los objetivos de la investigación de la lesión de médula espinal es describir los mecanismos de los procesos que se desencadenan cuando se presenta esta patología, con el objetivo de desarrollar nuevas terapias de rehabilitación enfocadas en proteger las células nerviosas sobrevivientes, estimular el crecimiento de los axones y restablecer los circuitos neuronales. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes modelos animales para entender los mecanismos involucrados durante la lesión de médula espinal (perros, gatos, primates no humanos y roedores); idealmente estos modelos deben cumplir con diferentes características como: reproductibilidad, disponibilidad, y la facilidad de poder reproducir diferentes escalas de severidad³³.

En este sentido los roedores pequeños son los animales más utilizados en estudios de lesión de médula espinal debido a su disponibilidad, facilidad de uso comparado con otros modelos animales. Las investigaciones histológicas y con resonancia magnética han demostrado que, de entre todos los roedores que se utilizan, las ratas comparten similitudes morfológicas y estructurales con los humanos, reproduciendo de manera más cercana sus características fisiopatológicas, morfológicas y funcionales³³⁻³⁵. Los modelos animales pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de lesión:

- **Modelo de sección completa:** Es el modelo más fácil de reproducir, sin embargo, es el que tiene menor relevancia, debido a que la sección completa se da muy pocas veces en condiciones normales, no obstante, se han ocupado a lo largo de los años para estudiar los mecanismos de regeneración axonal y para el diseño de andamios encaminados a promover la regeneración del tejido lesionado³⁴⁻³⁶.
- **Modelo de compresión:** En este modelo se ocupa un clip que realiza la función de un aneurisma, este dispositivo se infla a manera que reproduzca el daño por compresión; a diferencia del modelo de lesión traumática, la severidad de la lesión depende del tiempo que dure el dispositivo sobre la médula espinal³⁴⁻³⁶.
- **Modelo de contusión:** Este modelo es uno de los que tienen mayor relevancia clínica, porque reproduce en muchos aspectos lo que sucede en la mayor parte de lesión medular traumática en humanos. Está basado en la aplicación de un golpe transitorio sobre la médula espinal. Para realizarlo se requiere de un dispositivo de peso conocido,

que permita calibrar la velocidad del impacto, creando diversos grados de intensidad: leve, moderado y severo³⁴⁻³⁶.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Desde la antigüedad el tratamiento de la lesión de médula espinal ha sido un reto para los médicos; documentos como el papiro de Edwin-Smith (2600-2200 a.C.) reportan lesiones como fractura y parálisis, además, la define como intratable. En la antigua Grecia, Hipócrates describió que las lesiones que producían parálisis no tenían opciones de tratamiento, por lo tanto, toda persona con lesión de médula espinal estaba destinada a morir, mientras que, todas aquellas fracturas de la columna vertebral que no resultaban en daño a la médula espinal eran tratadas con diferentes artefactos como la escalera hipocrática y el banco hipocrático^{37,38}.

Aproximadamente 100 años más tarde Galeno de Pergamon trató diferentes deformidades de la columna vertebral y ratificó que la lesión medular no era una patología tratable. Esta percepción permanecería igual hasta el siglo VII, donde se realiza la primera laminectomía en un paciente con daño en la médula espinal por compresión, llevada a cabo por Paulus de Aegina³⁷⁻³⁹.

La primera descripción de la médula espinal fue realizada durante el renacimiento por Andrés Vesalio, al que se le atribuyen las palabras que dividen a la columna vertebral en sectores (cervical, lumbar, sacra y coccígea). A finales del siglo XIX, con el surgimiento de las medidas de asepsia, antisepsia y esterilización pudo desarrollarse la primera intervención quirúrgica de la columna vertebral sin riesgo de infección y con un mayor porcentaje de éxito. Posteriormente a inicios del siglo XX la invención de la imagenología permitió a los cirujanos ubicar la lesión medular de forma precisa, lo que dio lugar a la estandarización del tratamiento de la lesión de médula espinal que consistía en: estabilización, descompresión, corrección del daño y rehabilitación. A finales de los años 50's y principios de los 60's del siglo pasado, se inicia la administración de glucocorticoides (Dexametasona y Metilprednisolona) en pacientes con lesión de médula espinal con el objetivo de disminuir el edema provocado por el traumatismo y posteriormente como tratamiento de la inflamación posquirúrgica, hasta entonces sin investigación preclínica que demostrara su actividad neuro protectora³⁸⁻⁴².

En la década de 1970, en búsqueda de evidencia que apoyara que la administración de glucocorticoides presentaba un beneficio a los pacientes con lesión de médula espinal se desarrolló el Estudio Nacional sobre la Lesión Aguda de Médula Espinal I (NASCIS I, por sus siglas en inglés) en el que se comparó la administración de dosis elevadas y dosis bajas de esteroides (100mg y 1000mg por vía endovenosa) y no se demostraron beneficios en ninguna

de las dos concentraciones a los 6 meses y 1 año, además, las dosis altas aumentaron el porcentaje riesgo de adquirir una infección^{38,43,44}.

En un segundo y tercer estudio NASCIS llevado a cabo en la década de los 80 y 90 respectivamente, se demostró la eficacia de la administración de metilprednisolona a 30mg/kg dentro de las primeras 8 horas después del trauma y durante 48 horas para disminuir la respuesta inflamatoria, además, esta investigación reveló los mecanismos celulares de la fisiopatología de la lesión de médula espinal utilizando modelos animales (inicialmente perros, gatos y posteriormente en ratas), Además se demostró que el mayor porcentaje de daño a los tejidos es causado por la apoptosis postraumática, que afecta a las neuronas y a las células de la glía dentro de las primeras 24 horas, sin embargo las estrategias terapéuticas desarrolladas hasta el momento solo prevenían la lesión secundaria inhibiendo los eventos celulares involucrados, sin promover la regeneración del tejido ni el restablecimiento de la función^{43,44}.

Para la década de los 90's e inicios del siglo XXI, el entendimiento de los mecanismos involucrados en la fisiopatología cambió el enfoque de las investigaciones sobre la lesión de médula espinal hacia la búsqueda de la regeneración del tejido, los primeros estudios se basaron en implantación de células troncales embrionarias, pero, debido a implicaciones éticas y legales cayeron en desuso, lo que dio lugar al uso de injertos, principalmente de nervio periférico, los resultados de estas investigaciones postularon que los axones del sistema nervioso central poseen cierta capacidad de regeneración⁴⁵.

El descubrimiento y posterior uso de las células troncales neurales ha contribuido con nuevas investigaciones para la regeneración del SNC, ya que reemplazan las células perdidas durante la destrucción de los tejidos, sin embargo, el desarrollo del microambiente hostil causado por la respuesta inflamatoria y la acumulación de moléculas inhibitorias como los CSPG en la médula espinal lesionada, limita la supervivencia de las células implantadas e impide la correcta integración del implante a los tejidos receptores⁴⁶⁻⁴⁸.

De esta forma, la inhibición de las moléculas que impiden la reparación de los axones se convirtió en otro enfoque terapéutico; los primeros reportes acerca del manejo de la necrosis del tejido nervioso se publicaron hace más de cien años; Allen, trató la lesión de médula espinal por medio de un corte longitudinal en la línea media de esta (mieloidotomía), con el objetivo de drenar el tejido dañado en perros y en humanos. Sin embargo, se han descrito pocos experimentos basados en la remoción del tejido necrótico derivado de lo invasivo que puede

ser el procedimiento y del alto costo con relación al beneficio. En este sentido, Guizar Sahagún y cols. proponen un procedimiento microquirúrgico que se basa en el drenaje del tejido necrótico a las 24 horas posteriores a la lesión, donde se realiza una micro incisión de las meninges, lavado y aspiración de los restos celulares con una cánula y líquido céfalo raquídeo artificial (LCRA), cuyos componentes se exponen en el **ANEXO 1**, o con solución salina al 0.9%, para devolver el equilibrio de electrolitos y eliminar los restos celulares⁴⁹.

Los resultados obtenidos por Guizar Sahagún y cols. demostraron que con esta técnica de desbride y lavado del sitio de lesión se elimina en su mayoría las moléculas que promueven la extensión del daño e impiden la reconexión axonal sin afectar de forma excesiva las meninges, al mismo tiempo que se forma una cavidad con un microambiente equilibrado en él que se pueden implantar células o biomateriales que promuevan la regeneración del tejido, esto hace posible que el pronóstico mejore en los animales experimentales comparados con los grupos control⁴⁹.

Otra alternativa presentada por Kettle y cols. para prevenir la extensión del daño es el uso de moléculas que frenen la destrucción del tejido causado por la producción de ácido hipocloroso, en este estudio *in vitro* se reporta el efecto de diferentes derivados del ácido para-amino benzoico sobre la actividad de los neutrófilos humanos, de los cuales la Hidrazida del ácido 4-paraaminobenzoico (Hidrazida) demostró inhibir la actividad de la mieloperoxidasa de manera selectiva hasta en un 90% sin alterar otras funciones en los neutrófilos, como su actividad fagocítica, cuando se utiliza a concentraciones de 50 μ M hasta 100 μ M sin embargo, su uso como tratamiento neuroprotector no ha sido reportado⁵⁰⁻⁵³.

En años recientes, el desarrollo de terapias encaminadas a la regeneración del tejido perdido sin la necesidad de la implantación de células ha tomado gran importancia gracias al descubrimiento de diferentes moléculas que promueven la proliferación de los precursores celulares remanentes en un defecto, en este sentido en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la UNAM se ha identificado, purificado y caracterizado la Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (HACD1/CAP)¹¹⁻¹⁴.

PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP).

La proteína HACD1/CAP fue la primera proteína identificada como cemento – específica, cuyo gen se localiza en el cromosoma 10, región 13p 14. Dicho gen, codifica para dos proteínas: la proteína HACD1 de 288 aminoácidos (isoforma 1) que se expresa durante el desarrollo y en etapas posnatales en el músculo cardíaco y el músculo esquelético y la proteína HACD1/CAP de 140 aminoácidos (isoforma 2) que corresponde a un splicing alternativo de HACD1 y se expresa en las células del folículo dental⁵⁴.

La proteína HACD1/CAP regula positivamente la diferenciación, desarrollo, adhesión y migración de las células que contribuyen a la formación y mantenimiento del cemento radicular, además, ha demostrado un papel activo en la promoción de la regeneración de tejidos periodontales³¹⁻³³. Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación celular. Se expresa en cementoblastos y algunas poblaciones de células del ligamento periodontal (células troncales del ligamento periodontal) pero no se detecta en otros tejidos bucales como la encía o el hueso⁵⁴⁻⁵⁶.

La caracterización bioquímica de HACD1/CAP expresada de forma recombinante, ha permitido identificar y seleccionar una región peptídica que mimetiza la función biológica de la proteína completa en cuanto a la formación de hidroxiapatita y en los eventos celulares involucrados en la regeneración de tejidos dañados y/o perdidos⁵⁶.

Péptido derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (HACD1/CAP)

La selección del péptido corresponde con los últimos cinco aminoácidos de la terminal carboxilo de HACD1/CAP (AVIFM). Se ha demostrado mediante experimentación, que dicho péptido tiene función biológica semejante a la proteína recombinante y ha abierto la posibilidad de no depender de la proteína recombinante para obtener un efecto clínico. El uso del péptido permite escalar la cantidad de este a los requerimientos deseados, su obtención es más fácil y económica que la proteína recombinante y gracias a su bajo peso molecular, puede disminuir un posible efecto inmune^{11,12}.

Los experimentos en modelos animales utilizando el péptido sintético han demostrado promover la adhesión de los fibroblastos gingivales, células endoteliales y células del músculo liso por medio de la unión a los receptores de integrinas $\alpha 5\beta 1$, los cuales intervienen en diversas funciones principalmente en la adhesión a la matriz extracelular de manera similar a la fibronectina^{11,13}.

Al igual que la proteína completa, el péptido de HACD1/CAP promueve la proliferación y diferenciación en células derivadas del mesénquima por medio de la vía de las MAPK, en donde ERK2 induce la expresión del factor de transcripción c-Fos que está involucrado en la proliferación celular, lo que ha mostrado efectos positivos en la regeneración de tejido en defectos críticos de calvaria de rata por medio de la inducción de la neovascularización y el posterior reclutamiento de células mesenquimales remanentes hacia el sitio de la lesión³⁶. Así mismo, en un estudio experimental, empleando un modelo de defecto de tamaño crítico segmental en la tibia de conejos Nueva Zelanda, el péptido mostró su potencial en la regeneración del tejido faltante, de igual manera, induciendo la formación de vasos sanguíneos y la proliferación de las células precursoras osteogénicas. Sumado a estos hallazgos, la aplicación sistémica del péptido en un modelo de osteoporosis inducida en ratas Wistar, tuvo efectos positivos restableciendo las propiedades biológicas y fisicoquímicas similares al tejido sano sin daño al organismo^{11,14}.

Las funciones biológicas del péptido relacionadas con la regeneración de los tejidos, actuando sobre las células troncales paravasculares, que también se encuentran en el SNC, permiten hipotetizar su uso como terapia regenerativa para la lesión de médula espinal e inducir la proliferación y diferenciación hacia fenotipos neurales o gliales, pues el cemento radicular y la médula espinal se forman a partir de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario promoviendo un efecto positivo en la regeneración de la médula espinal.

CAPÍTULO 3

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lesión de médula espinal es un problema de salud altamente incapacitante, que afecta principalmente a hombres en edad laboral y aumenta al triple la probabilidad de muerte prematura en los pacientes que la padecen. El tratamiento inicial de la lesión a la médula espinal se enfoca primordialmente en la estabilización de la herida y restaurar la homeostasis inmediatamente después del daño. El abordaje a largo plazo atiende principalmente los síntomas ocasionados por la lesión primaria, pero actualmente no existe un tratamiento aprobado que estimule la regeneración del tejido dañado y el restablezca la función motora y sensorial.

Así, buscando alternativas efectivas de tratamiento, nuestra pregunta de investigación es ¿Qué efecto funcional y anatómico tendrá la colocación del implante intra lesional del péptido sintético derivado de HACD1/CAP solo o combinado con Hidrazida en ratas sometidas a lesión traumática de médula espinal?

JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de complicaciones asociadas a la lesión en la médula espinal y a que las terapéuticas actuales solo están diseñadas al tratamiento sintomatológico secundario a la lesión, se requiere de la investigación y desarrollo de alternativas encaminadas a conseguir estimular la regeneración del tejido dañado. Las nuevas tecnologías terapéuticas de la ingeniería tisular inducen la regeneración de los tejidos dañados o perdidos empleando factores de crecimiento, proteínas, péptidos sintéticos, diferenciadores celulares, membranas biocompatibles y células o una combinación de las anteriores.

El uso de péptidos puede modificar respuestas celulares y desencadenar vías de transducción de señales o servir como químiatrayentes de células remanentes próximas al sitio de la lesión.

En este sentido, el péptido bioactivo derivado de HACD1/CAP (AVIFM) ha demostrado poseer propiedades que promueven actividad biológica reparativa, por medio de la proliferación, químiatracción y la estimulación de la diferenciación celular. Por lo que su aplicación como terapéutica encaminada a la regeneración y restablecimiento de la función después de la lesión medular puede contribuir de manera significativa devolver la función y mejorar el pronóstico de la lesión.

HIPÓTESIS

El uso del péptido sintético derivado de HACD1/CAP solo y en combinación con la Hidrazida en lesión primaria de médula espinal tendrá un efecto positivo en la adhesión, quimioatracción y diferenciación de las células remanentes hacia el sitio de la lesión disminuyendo la formación de cicatrización glial, favoreciendo la recuperación de la función motora después de una lesión medular experimental en roedores.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto morfo-funcional del implante temprano del péptido sintético derivado de HACD1/CAP y de la hidrazida del ácido 4-aminobenzoico en el espacio intramedular creado al desbridar el tejido desvitalizado en ratas sometidas a lesión medular de intensidad moderada.

Objetivos específicos

- 1) Objetivo académico para el alumno: Calibrar el procedimiento de microcirugía mediante la realización de ejercicios para el desarrollo de habilidad manual bajo visión microscópica.
- 2) Determinar el efecto del péptido y la Hidrazida (solos o en combinación) sobre la sobrevivencia de los animales con lesión medular.
- 3) Determinar el efecto del péptido y la Hidrazida (solos o en combinación) sobre la recuperación de la función locomotriz de las ratas con lesión medular.
- 4) Determinar el efecto del péptido y la Hidrazida (solos o en combinación) sobre la migración y la diferenciación celular en el sitio del implante de las ratas con lesión medular.
- 5) Evaluar el efecto del péptido y la Hidrazida (solos o en combinación) sobre la expresión de marcadores de tejido nervioso en el área lesionada de la médula espinal.

METODOLOGÍA

- Prueba piloto.

Se realizó un estudio piloto inicial, destinado principalmente a estandarizar los procedimientos experimentales, los métodos de evaluación y los cuidados pos-lesión. Para esta fase se utilizaron 28 ratas hembras de la cepa Long-Evans de 10 a 12 semanas de edad, con un peso de 250 a 300 gramos, que completaron 4 semanas de seguimiento y con las que se formaron siete grupos de cuatro ratas cada uno. Los grupos correspondientes se detallan a continuación:

Grupo Lesión: las ratas se sometieron a lesión de médula espinal, de intensidad moderada, en T9, sin manipulación medular subsecuente.

Grupo Desbride: las ratas se sometieron a lesión medular y 24 h después se desbridó el tejido necrótico-hemorrágico presente en la zona de lesión medular.

Grupo Matrigel (vehículo): en las ratas sometidas a lesión y desbride (como se señaló previamente), se implantó Matrigel, usado como vehículo para las otras moléculas que se implantaron.

Grupo Péptido: en las ratas sometidas a lesión y desbride, se implantó el péptido sintético bioactivo derivado de HACD1/CAP (AVIFM) en una concentración de 50 µg/10µl, suspendido en Matrigel.

Grupo Hidrazida: en las ratas sometidas a lesión y desbride, se implantó Hidrazida del ácido 4 paraminobenzoico en una concentración de 50 µM/10 µl, en Matrigel.

Grupo Péptido + Hidrazida: en las ratas sometidas a lesión y desbride, se implantó una mezcla de péptido e Hidrazida, como fue señalado previamente.

Grupo Colágena: en las ratas sometidas a lesión y desbride, se implantó una mezcla de péptido suspendido en colágena 50µg/10µl.

- Etapa experimental pre-clínica

Para la segunda fase se utilizó una muestra de 60 ratas hembra de la cepa Long-Evans, de 10 a 12 semanas de edad, con un peso de 250 a 300 gramos con las que se formaron 6 grupos de trabajo, 3 grupos de control y 3 grupos experimentales. Cada grupo fue formado por 10 ratas elegidas de manera aleatoria.

La formación de grupos se detalla a continuación:

Grupo 1, Lesión (control): ratas sometidas a lesión moderada de médula espinal en la región de la vértebra T9, sin tratamiento.

Grupo 2, Desbride (control): ratas a las que 24 horas después de la lesión medular se les realizó el desbride del tejido necrótico-hemorrágico.

Grupo 3, Matrigel (control): ratas a las que después de la lesión de médula espinal y el desbride (como mencionado anteriormente), se les colocó el vehículo (Matrigel 10µl) de los grupos experimentales.

Grupo 4, Péptido (experimental): ratas que recibieron un implante (en el espacio creado en la zona de lesión medular desbridada) del péptido sintético bioactivo derivado de HACD1/CAP (AVIFM) en una concentración de 100 µg/10µl, usando Matrigel como vehículo.

Grupo 5, Hidrazida (experimental): ratas implantadas (como antes señalado) con Hidrazida del ácido 4 paraminobenzoico en una concentración de 100 µM/10 µl.

Grupo 6, Péptido + Hidrazida (experimental): ratas implantadas con una mezcla del péptido e Hidrazida con las concentraciones antes señaladas.

- **Método de anestesia**

Para desarrollar el modelo de lesión medular, se anestesió a las ratas por medio de infiltración intramuscular con una mezcla de Ketamina (100 µg) más Xilacina (7.5µg) por gramo de peso. Se determinó que el animal se encontraba inducido en plano anestésico si se presentaron los siguientes parámetros:

- 1) Pérdida visible de consciencia.
- 2) Ausencia de movimientos, exceptuando los movimientos de respiración.
- 3) Ritmo respiratorio regular, sin apnea respiratoria.

- 4) Color de mucosas rosado.
- 5) Ausencia de vocalización a estímulos dolorosos.
- 6) Ausencia de reflejo.

- **Entrenamiento microquirúrgico**

El entrenamiento para desarrollar la habilidad manual necesaria para realizar movimientos delicados bajo visión microscópica, se llevó a cabo por medio de prácticas de microcirugía bajo visión microscópica. Los ejercicios consistieron en el desarrollo de la habilidad manual realizando la eliminación del estroma de las hojas de limonero, el desarmado y armado de cigarrillos y prácticas de micro sutura (**Figura 9**).

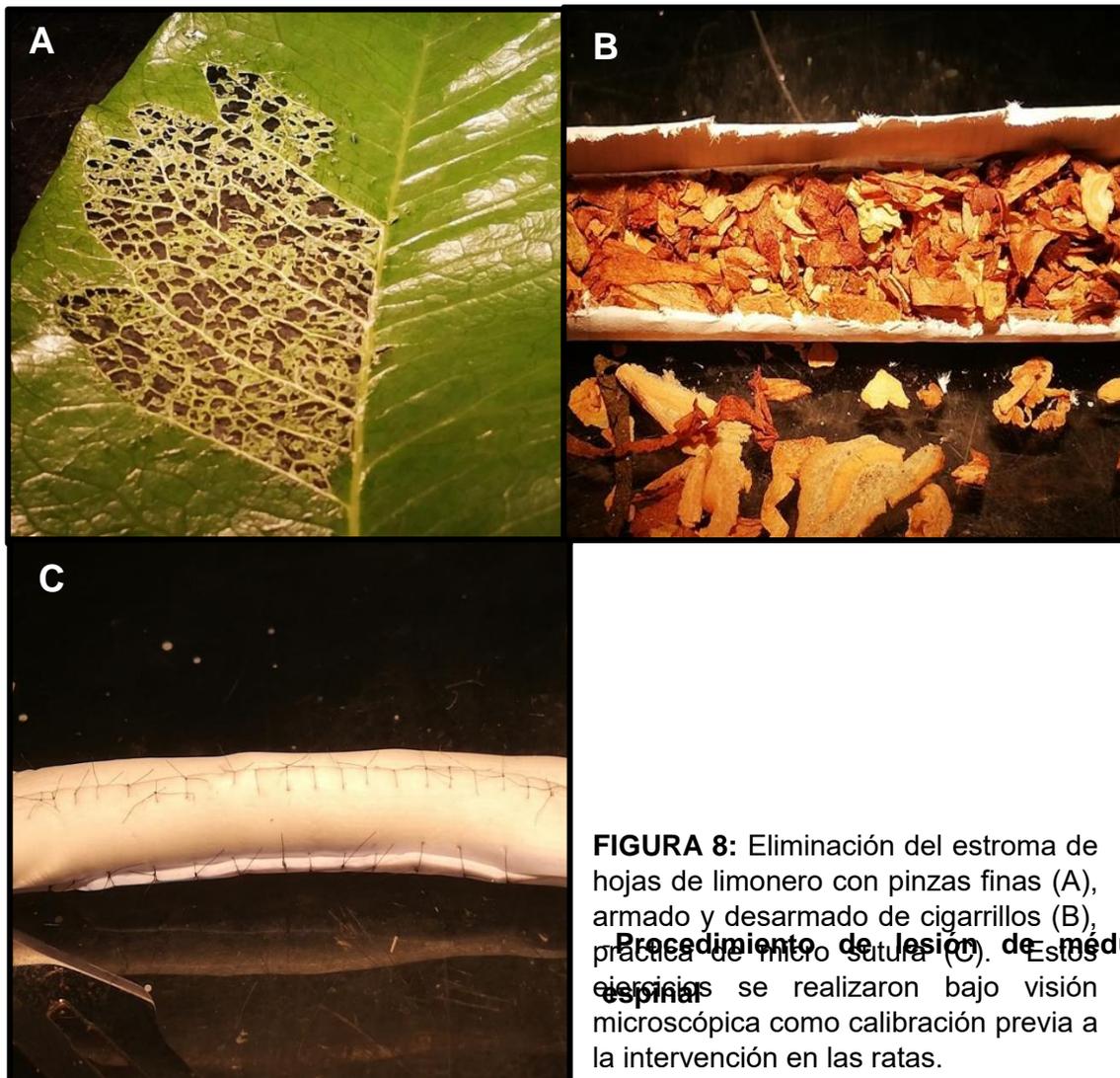


FIGURA 8: Eliminación del estroma de hojas de limonero con pinzas finas (A), armado y desarmado de cigarrillos (B), práctica de micro sutura (C). Estos ejercicios se realizaron bajo visión microscópica como calibración previa a la intervención en las ratas.

Una vez que la rata se indujo en plano quirúrgico de anestesia, se realizó una incisión de 2.5 cm en la línea media dorsal, para acceder a la región de la vértebra T9. Luego se procedió a extirpar la apófisis espinosa y las láminas de dicha vertebra (laminectomía), evitando lastimar las meninges al momento de retirar el bloque de hueso (**Figura 10**).

Para producir la lesión medular por contusión, se colocó al animal en el impactador diseñado por la Universidad de New York, donde se produjo una contusión controlada dejando caer un pistón de 10 gramos de una altura de 25 mm (para lesión moderada) sobre la médula expuesta con las meninges íntegras (**Figura 11**). Se descartaron animales lesionados con errores en altura del pistón y velocidad del impacto superiores a 3%. Finalmente, la incisión quirúrgica se suturó por planos, el tejido muscular se suturó con nylon 4-0 y por último la epidermis con nylon 3-0.

Por último, se colocó a la rata en una jaula aislada con aserrín estéril para su recuperación. Se le proporcionó alimento e hidratación a libre demanda.



FIGURA 9: Laminectomía de la vértebra T9 y exposición de la médula espinal previo a la lesión.



FIGURA 10: Procedimiento de lesión moderada de médula espinal, se realiza mediante la liberación de un pistón de 10gr colocado a 25mm de altura.

- **Cuidados post lesión**

Se administró Paracetamol por vía oral (Tempra®, RB salute) a dosis de 32 µg / g de peso cada 12 h, durante 1 semana para control del dolor y para evitar autofagia. Como profiláctico para infecciones postoperatorias, se administró por vía subcutánea Enrofloxacino (Piroflox®, Pisa) a dosis de 8 µg / g de peso cada 12 horas, durante 1 semana. El intestino y la vejiga se manejaron con presión manual 2 veces por día hasta la recuperación del automatismo (aproximadamente a las 2 semanas post lesión) para ayudar a la rata a excretar los desechos metabólicos.

- **Desbridamiento de la lesión**

Se realizó 24 horas post lesión. Las ratas lesionadas fueron divididas de manera aleatoria en los grupos correspondientes. Bajo anestesia general inhalada (Sevoflurano, solución 3%, Baxter®), se utilizó el abordaje en la herida quirúrgica inicial. Se realizó una micro incisión en la porción dorsal del saco dural. Se ubicó la zona de la médula con mayor daño, que presentó un color violeta o marrón y se realizó una punción con una aguja de calibre 33 y una jeringa Neuros (Hamilton). La punción se realizó a una profundidad de 1.5mm, con movimientos en sentido rostro-caudal con la finalidad de desprender el tejido necrótico y hemático del epicentro de la lesión. Se hicieron lavados de la cavidad creada con líquido cefalorraquídeo artificial. Como último paso se realizó la síntesis de la zona quirúrgica con nylon 10-0 para las meninges, nylon 4-0 para el tejido muscular y nylon 3-0 para la epidermis respectivamente (**Figura 13**).

- **Elaboración y colocación de los implantes**

Como vehículo para las biomoléculas que se implantaron, se utilizó Matrigel® (Corning). Este es un material desarrollado en el año de 1984, compuesto por matriz extracelular de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm, que produce grandes cantidades de matriz extracelular compuesta principalmente por fibras de colágena tipo IV, Laminina y Entactina. El Matrigel provee un medio ideal para su uso en estudios de cultivo y diferenciación celular y explantes celulares, además, de su uso como vehículo para la administración de diversos fármacos con enfoque regenerativo, en el caso del sistema nervioso central, el Matrigel provee sitios para la adhesión de células precursoras neuronales, la posterior reconexión axonal y la liberación paulatina de los fármacos o moléculas bioactivas⁵⁷.

El péptido sintético de HACD1/CAP fue resuspendido a concentraciones de 50 y 100 μ g /10 μ l en Matrigel.

La Hidrazida del ácido 4-aminobenzoico (Sigma Aldrich) fue preparada a concentraciones de 50 y 100 μ M/10 μ l de Matrigel.

La combinación del péptido de HACD1/CAP e Hidrazida del ácido 4-aminobenzoico se realizó en concentraciones de 100 μ g/10 μ l y 100 μ M/10 μ l respectivamente en Matrigel.

Se infiltraron vía subdural 10 ml del Matrigel® con la(s) biomoléculas correspondientes de acuerdo con el grupo, en el espacio intramedular creado al realizar el desbride del tejido desvitalizado. Los implantes con la menor concentración fueron colocados en las ratas utilizadas en la prueba piloto, mientras que el resto de los implantes se colocó en los animales utilizados en el estudio preclínico.

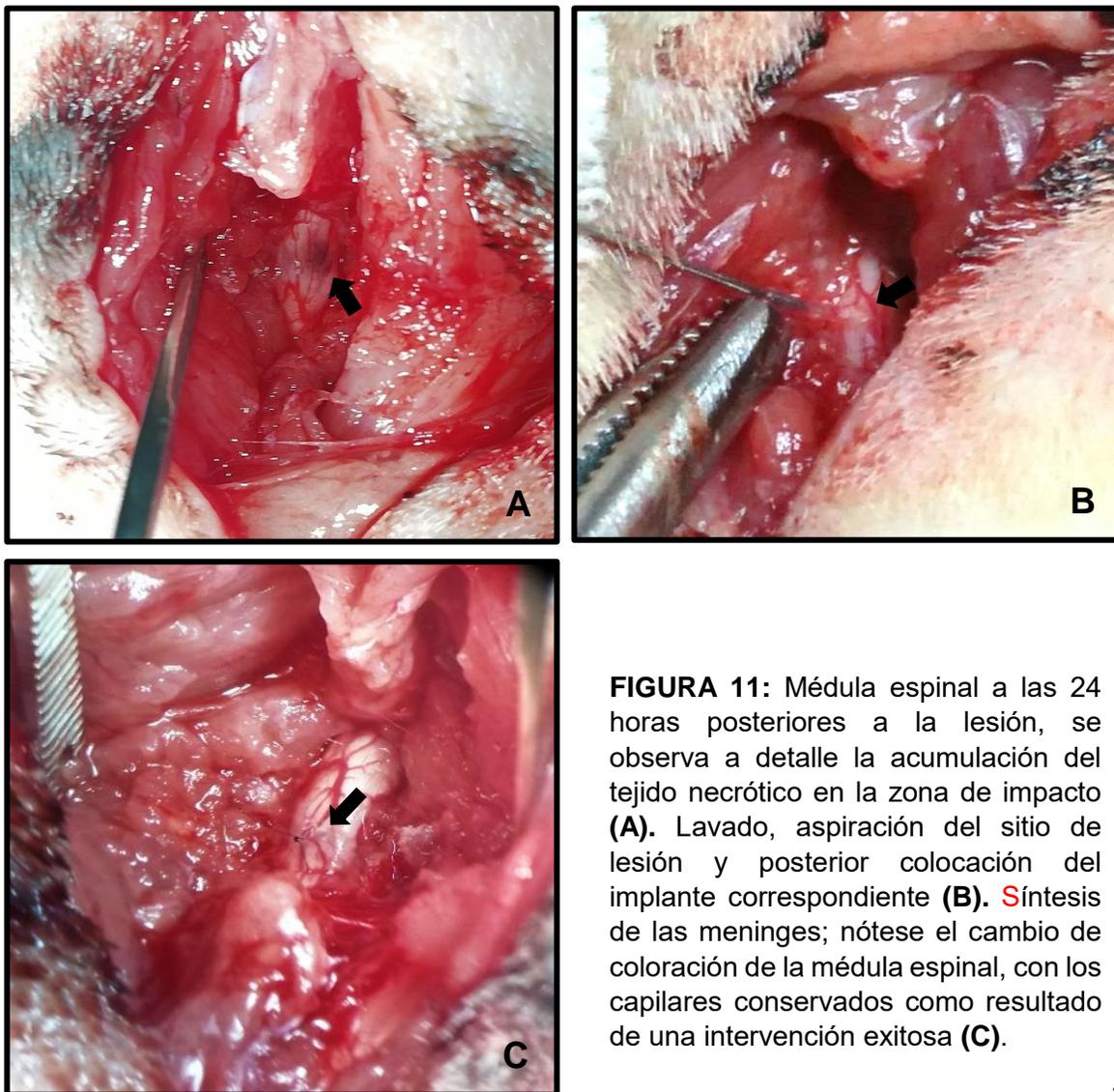


FIGURA 11: Médula espinal a las 24 horas posteriores a la lesión, se observa a detalle la acumulación del tejido necrótico en la zona de impacto (A). Lavado, aspiración del sitio de lesión y posterior colocación del implante correspondiente (B). Síntesis de las meninges; nótese el cambio de coloración de la médula espinal, con los capilares conservados como resultado de una intervención exitosa (C).

Durante la primera fase del trabajo de investigación se realizó el sacrificio de las ratas a las 4 semanas después de producida la lesión por medio de perfusión intracardiaca de solución de NaCl al 0.9% y formol al 10% con bomba peristáltica. Una vez fijadas, se realizó la toma de la médula espinal por medio de laminectomía con una extensión desde la vértebra T3 hasta la vértebra L2 para el procesamiento histológico con tinción de Hematoxilina y Eosina.

- **Ensayos de inmunohistoquímica**

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para analizar la expresión del marcador para Neurofilamento (NF-H), en el área de la lesión medular, con el fin de identificar la población axonal en la zona de lesión. Los cortes fueron tratados con albumina de suero bovino (BSA) al 2% en amortiguador de fosfatos salinos (PBS) e incubados con los anticuerpos primarios por 12h a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y con Tween 20 al 0.1% dos veces y un lavado con PBS por 5min cada uno. Posteriormente los cortes fueron incubados con los anticuerpos secundarios durante 2hrs a temperatura ambiente. Los controles negativos se obtuvieron al omitir el anticuerpo primario. Las muestras se evaluaron utilizando un microscopio para fluorescencia (Axioskope 2, Carl Zeiss, Germany) por un observador independiente, que no participó en ninguno de los procedimientos anteriores. Posteriormente se realizó la descripción cualitativa de las características del tejido.

- **Evaluación funcional por medio de la escala Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)**

Las ratas de todos los grupos fueron colocadas en una pasarela (ratódromo) de 1.20m de longitud por 20cm de alto por 10cm de ancho como se representa en la **FIGURA 12**, en donde dos observadores ciegos al experimento realizaron la evaluación de las extremidades posteriores de cada una de las ratas mediante la escala BBB. Esta escala va del grado 0 (parálisis flácida total) hasta grado 21 (marcha normal) y considera la amplitud de movimiento de tobillo, rodilla y cadera, colocación plantar y soporte de peso de la pelvis, frecuencia de pasos y coordinación entre patas traseras y delanteras, alineación de la pata al dar el paso, separación de los dedos y posición de la cola. El procedimiento de evaluación se registró en video con una cámara Nikon Coolpix L320. La tabla completa para la evaluación BBB se muestra en el **ANEXO 2**

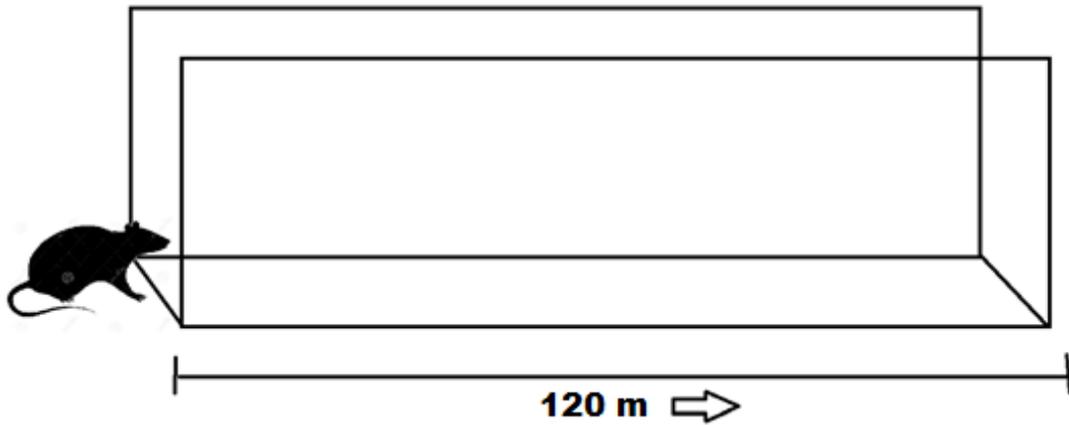


FIGURA 12: Diagrama del tatodromo diseñado en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología, UNAM.

- **Análisis estadístico.**

Para realizar el análisis de supervivencia de los animales se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier. Los resultados de la evaluación funcional se analizan mediante la prueba T, comparando en cada semana, cada grupo VS. solo lesión. Para analizar capacidad para levantar la cola de manera sostenida, así como las lesiones cutáneas tardías en los flancos, se hicieron tablas de contingencia que se analizaron con la prueba de Chi-cuadrada. Se utilizó el programa PRISMA® versión 6 (GraphPad). Se consideró significativa una $p < 0.05$

- **Análisis de Kaplan-Meier.**

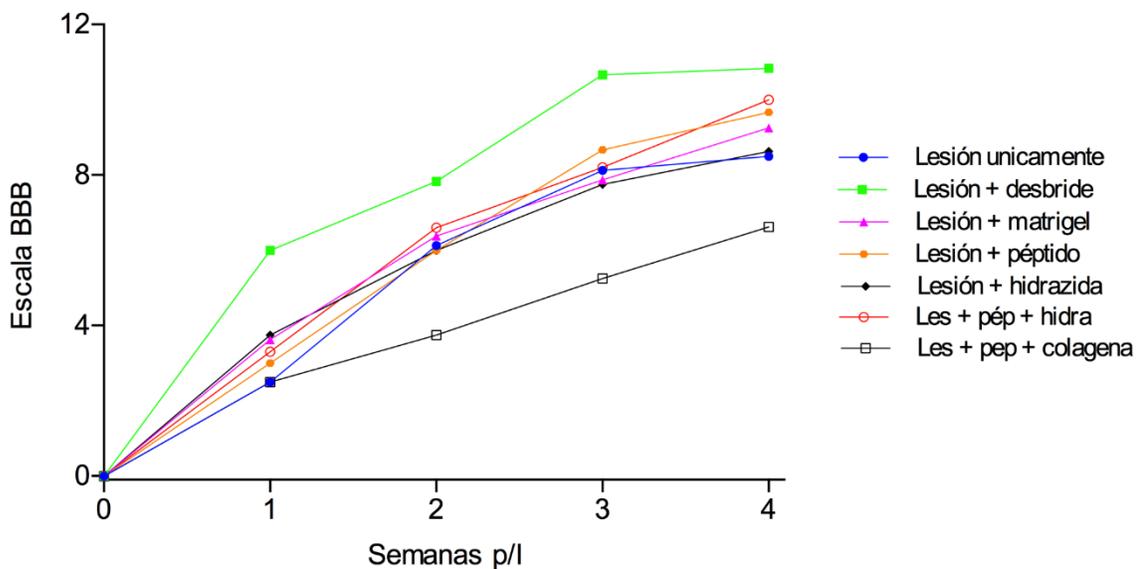
Para realizar el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se utilizó el programa bioestadístico PRISMA® (GraphPad), los datos se tomaron en cuenta desde la fecha de lesión, hasta la fecha de término de la evaluación funcional a las 8 semanas.

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO

- Evaluación de la función motora

Todos los animales mostraron actividad locomotora normal antes de comenzar el estudio. En la evaluación realizada al recuperarse de la anestesia de la cirugía de lesión medular, todos los animales, independientemente del tratamiento, mostraron parálisis flácida completa bilateral de las extremidades traseras. El movimiento de las extremidades posteriores mejoró gradualmente a partir de entonces y hasta el final del estudio, al cumplir 4 semanas pos-lesión. En la **GRÁFICA 1** se muestra la puntuación BBB promedio. La dispersión de los datos fue muy extensa y el tamaño de muestra pequeño. No se muestran medidas de dispersión ya que la sobreposición de éstas dificulta observar las tendencias en la gráfica. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar los grupos con las diferentes intervenciones contra el grupo que solo recibió lesión.



GRÁFICA 1: Efecto de los diferentes enfoques terapéuticos sobre la función locomotora. La gráfica muestra el promedio de las puntuaciones de la función motora de las extremidades traseras de acuerdo con la escala BBB (Basso-Beattie-Bresnahan), durante un período de 4 semanas después de la intervención. Los datos expresan la media (n = 4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

- **Resultados de evaluación histológica e inmunohistoquímica.**

Con el objetivo de identificar las características básicas a evaluar en este tipo de experimento, se realizó la evaluación de los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina (**Figura 13**), así como cortes inmunoteñidos con un neurofilamento. Los cortes se obtuvieron de los animales que completaron el estudio, de todos los grupos utilizados.

Los parámetros y criterios arbitrarios que se consideraron para la evaluación fueron los siguientes:

a) Destrucción tisular: 0 (no hay); 1 (destrucción en la mitad del campo o menos); 2 (más de la mitad a tres cuartos); 3 (más de tres cuartos o transversa completa).

b) Microquistes: 0 (no hay o hay muy pocos); 1 (pequeños y en áreas limitadas); 2 (más grandes y en mayor área); 3 (en toda o casi toda la sustancia blanca del campo).

c) Tejido de neoformación: 0 (no se observa); 1 (poco); 2 (regular); 3 (mucho).

d) Tamaño de implante: 0 (no se observa); 1 (pequeño); 2 (cerca de la mitad del campo); 3 (más de la mitad del campo).

e) Infiltrado mononuclear: 0 (no se observa); 1 (poco); 2 (regular); 3 (mucho).

En la inmunohistoquímica con neurofilamento, además de observar fácilmente los axones preservados, también fue posible observar axones aparentemente regenerados (**Figuras 14 y 15**).

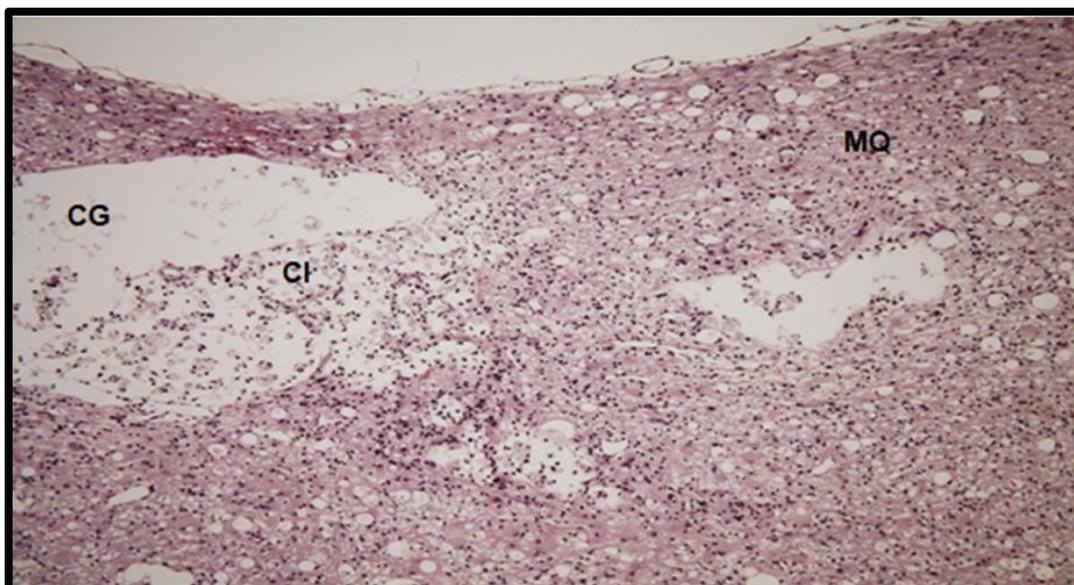


FIGURA 13: Microfotografía de la médula espinal 10X, puede distinguirse una reducción significativa de la cicatriz glial (**CG**), a los extremos de la lesión se aprecian los microquistes (**MQ**).

- Evaluación de la expresión del marcador para NF-H

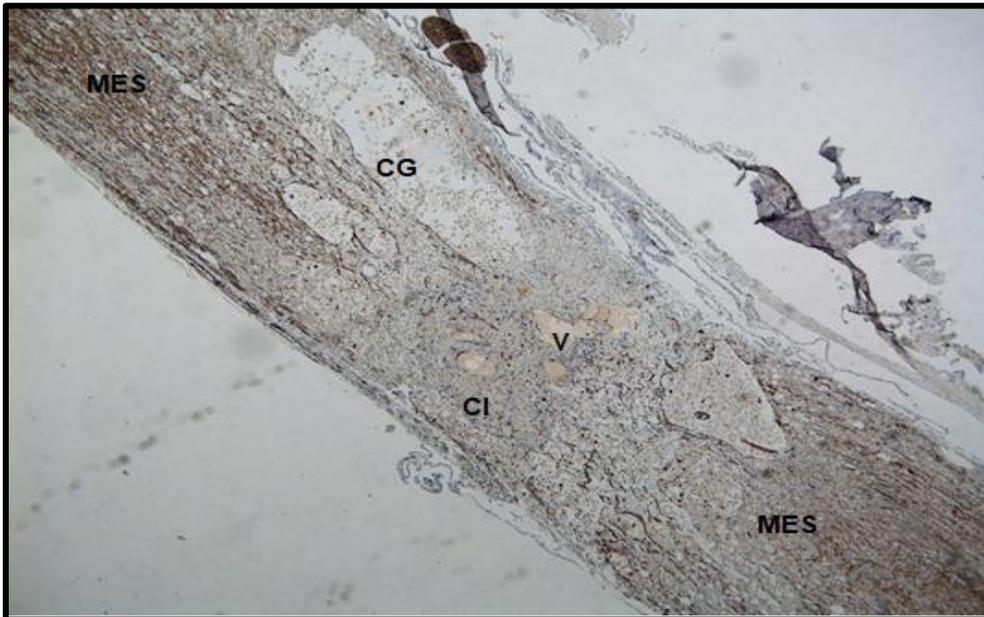


FIGURA 14: Inmunohistoquímica de la médula espinal, **grupo lesión + desbride + vehículo**; las zonas positivas al marcador corresponden a la médula espinal sana (**MES**) que no fue afectada por el traumatismo.

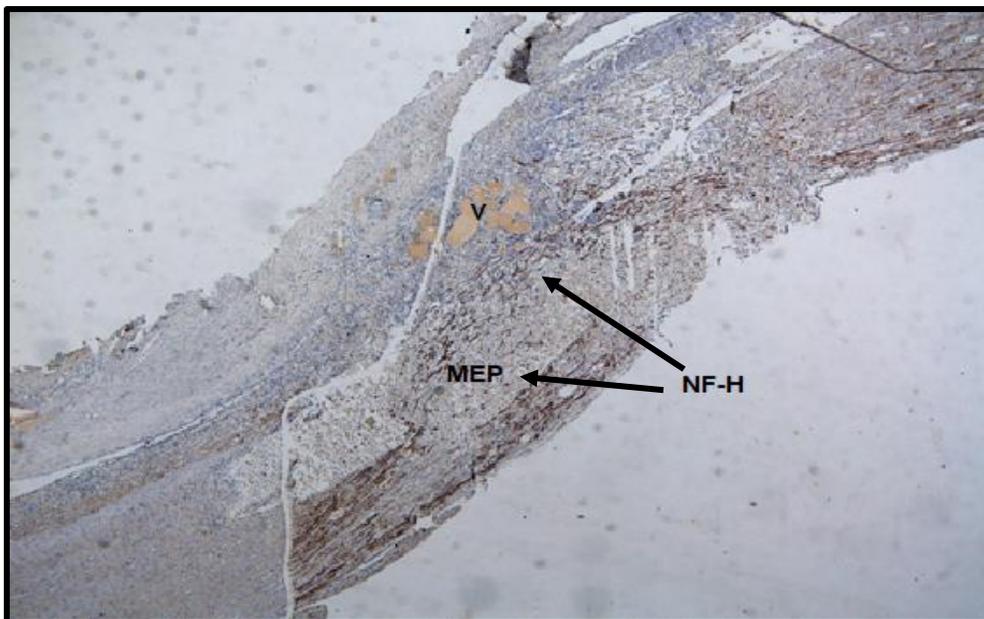
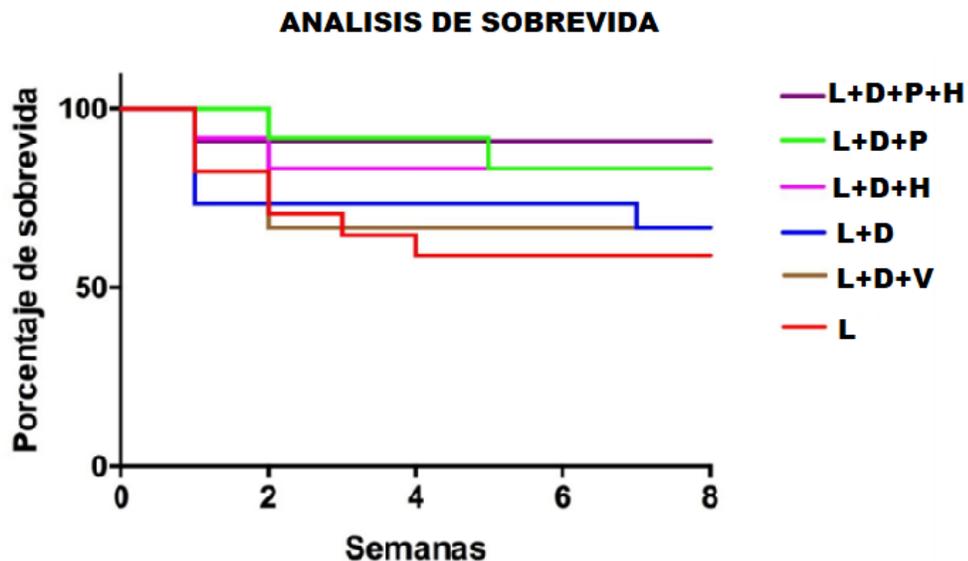


FIGURA 15: Inmunohistoquímica de la médula espinal, **grupo lesión + desbride + péptido + Hidrazida**; las zonas positivas al marcador corresponden a la médula espinal corresponden a la zona de reconexión axonal (**MEP**) ubicada inferior al sitio de impacto.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO

- Análisis de sobrevida.

Para evaluar el efecto de los diferentes enfoques terapéuticos sobre la supervivencia se utilizó el Índice de sobrevida de Kaplan y Meier (**GRÁFICA 2**). Los animales que fueron sometidos a la lesión de médula espinal sin tratamiento presentaron un mayor número de complicaciones propias de la parálisis; infecciones de vías urinarias altas, ulceraciones, autofagia y auto mutilación, esto se vio reflejado en el índice de supervivencia el cual alcanzó el 58% de los animales. Los otros dos grupos de animales control (desbride y vehículo) tuvieron ambos un 67% de supervivencia. En cuanto a los grupos experimentales, las ratas tratadas con el Péptido AVIFM o con la Hidrazida presentaron menos complicaciones graves, lo que resultó en una supervivencia del 83% para cada grupo. El grupo que fue tratado con el Péptido combinado con la Hidrazida presentó el mejor porcentaje de supervivencia (91 %), esto se relaciona directamente con la menor incidencia de complicaciones y la mejora funcional.



GRÁFICA 2: Efecto de los diferentes enfoques terapéuticos sobre la supervivencia. La gráfica muestra las curvas de sobrevida de Kaplan y Meier a lo largo del estudio; las ratas sometidas solo a lesión sin tratamiento presentaron un índice de sobrevida del 58%, mientras que, los tres grupos experimentales alcanzaron más del 80% de supervivencia.

L=Lesión, L+D=Lesión+Desbride, L+D+V=Lesión+Desbride+Vehículo, L+D+H=Lesión+Desbride+Hidrazida, L+D+P=Lesión+Desbride+Péptido, L+D+P+H=Lesión+Desbride+Péptido+Hidrazida

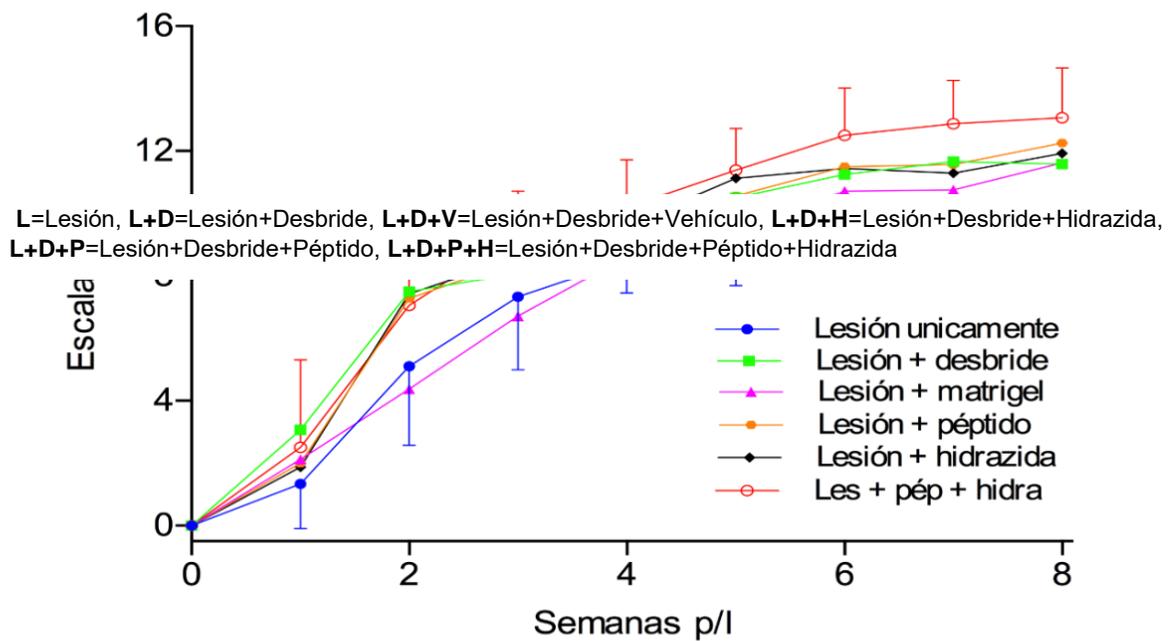
- **Evaluación funcional.**

Al igual que lo reportado para la prueba piloto, todos los animales mostraron locomoción normal antes de comenzar el estudio, mientras que, al recuperarse de la anestesia de la cirugía de lesión, mostraron parálisis completa del tren posterior. Con el paso de las semanas, la función motora mejoró gradualmente hasta el final del estudio. En la **GRÁFICA 3** se muestra la puntuación obtenida en la escala BBB durante las 8 semanas que del estudio. El grupo con el tratamiento combinado (Péptido + Hidrazida) mostró el mejor desempeño global, mientras que el grupo con peor desempeño fue el grupo con solo lesión. En la **GRAFICA 4** se muestra el comportamiento de cada grupo, durante cada semana; ahí se señalan las diferencias entre los grupos con significancia estadística. Es importante mencionar que en los cinco grupos donde se practicó desbride tuvieron 1 caso que mostró deterioro funcional extenso y permanente, un comportamiento distinto al del resto de los animales pertenecientes a su grupo.

A éste se le consideró fracaso atribuible al riesgo latente de lesión a estructuras anatómicas cuando se realiza la técnica de desbride. Para evitar un posible sesgo por estos casos, el peor caso de cada grupo (inclusive del grupo de solo lesión) fue removido de la evaluación.

Al realizar las evaluaciones funcionales semanales se hicieron observaciones adicionales de fenómenos que llamaron la atención, dos en particular: 1) cola levantada frecuente o constantemente, aun cuando las características de los pasos o la posición de las patas y los dedos no permitían dar calificación de 20 en la escala BBB (**FIGURA 16**) y 2) lesiones cutáneas tardías en los flancos, hechas por exceso de rascado con las patas traseras (**FIGURA 17 y 18**). Para evaluar estadísticamente estos dos fenómenos se hicieron tablas de contingencia que se analizaron con la prueba de Chi-cuadrada. Los grupos que presentaron más sujetos con este tipo de fenómenos (**GRÁFICAS 5 Y 6**) coinciden parcialmente con los que mostraron mejor desempeño en la escala BBB. La evaluación estadística no mostró diferencias significativas.

EFFECTO DE LOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS



GRÁFICA 3: Efecto de los diferentes enfoques terapéuticos sobre la función locomotora. La gráfica muestra el promedio de las puntuaciones de la función motora de las extremidades traseras de acuerdo con la escala BBB (Basso-Beattie-Bresnahan), durante un período de 8 semanas después de la intervención. Los datos expresan la media \pm la desviación estándar de los grupos que tuvieron el mejor y el peor desempeño ($n = 9$). No se graficó la dispersión del resto de grupos para evitar sobreposición excesiva.

EFECTO DE LOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS (POR SEMANA)

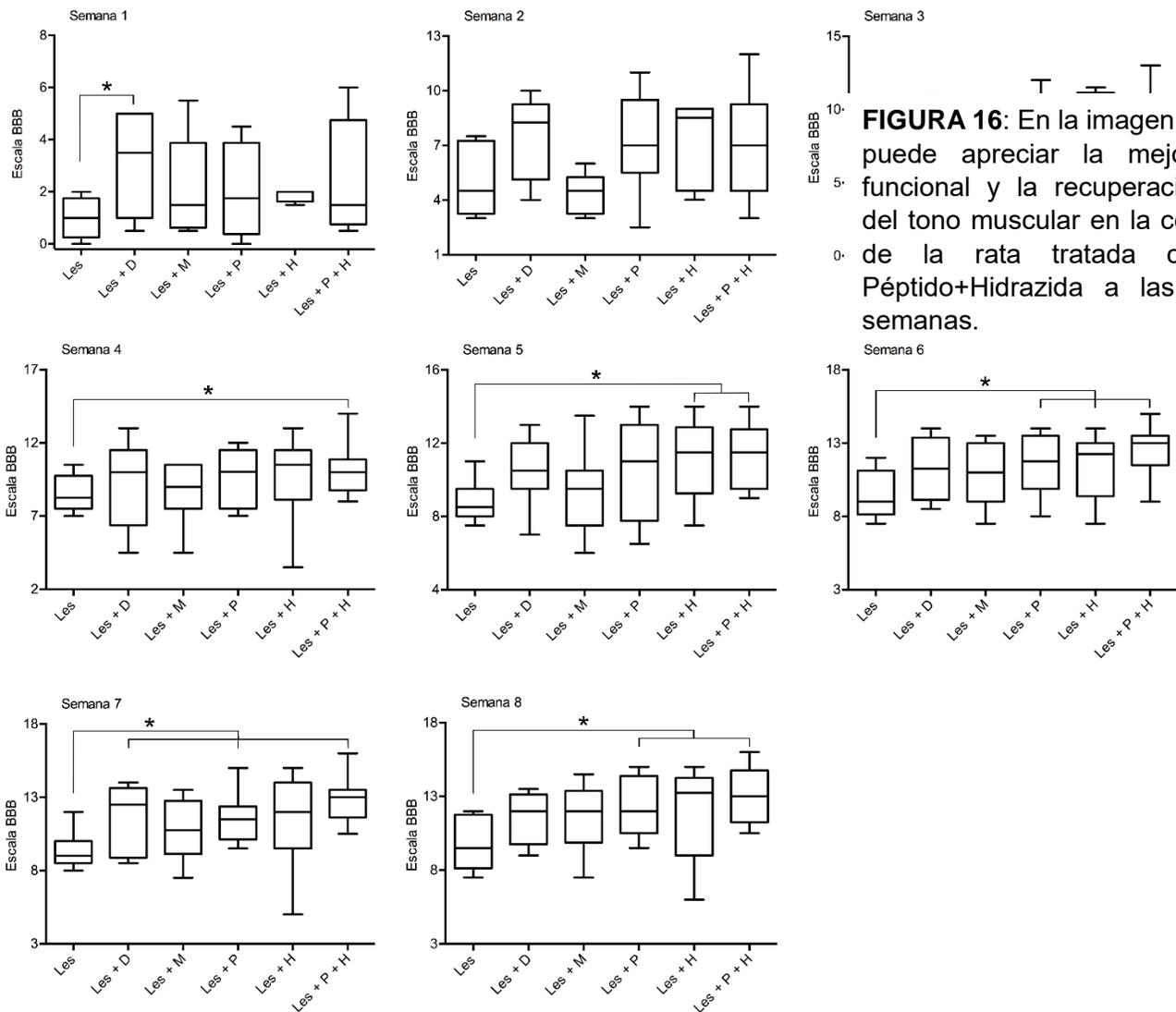


FIGURA 16: En la imagen se puede apreciar la mejora funcional y la recuperación del tono muscular en la cola de la rata tratada con Péptido+Hidrazida a las 8 semanas.

terapéuticos sobre la función locomotora. La grupo y semana de la función motora de las BBB. Los datos se expresan en gráficas de caja (percentil 25 al 75; la línea dentro de la caja es el promedio de cada grupo. Análisis estadístico: prueba de hipótesis de la lesión. *, $p < 0,05$.

Les+D=Lesión+Desbride, Les+D+H=Lesión+Desbride+Hidrazida, Les+M=Lesión+Mielina, Les+M+H=Lesión+Mielina+Hidrazida, Les+P=Lesión+Péptido, Les+P+H=Lesión+Péptido+Hidrazida

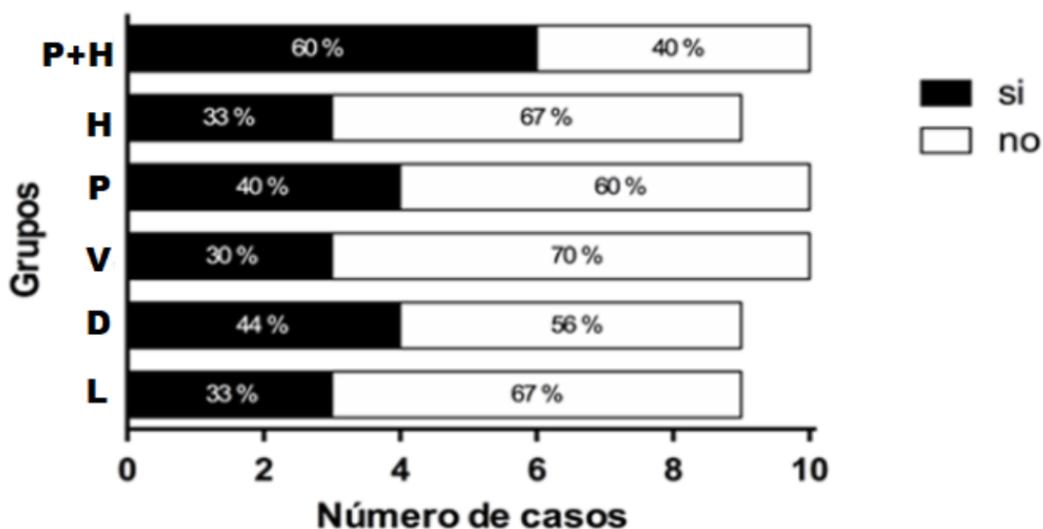


FIGURA 17: En la fotografía se aprecia la irritación severa causada por el exceso de rascado con las patas traseras en las ratas tratadas con Hidrazida, esto puede relacionarse con la mejora funcional a las 6 semanas de evaluación funcional.



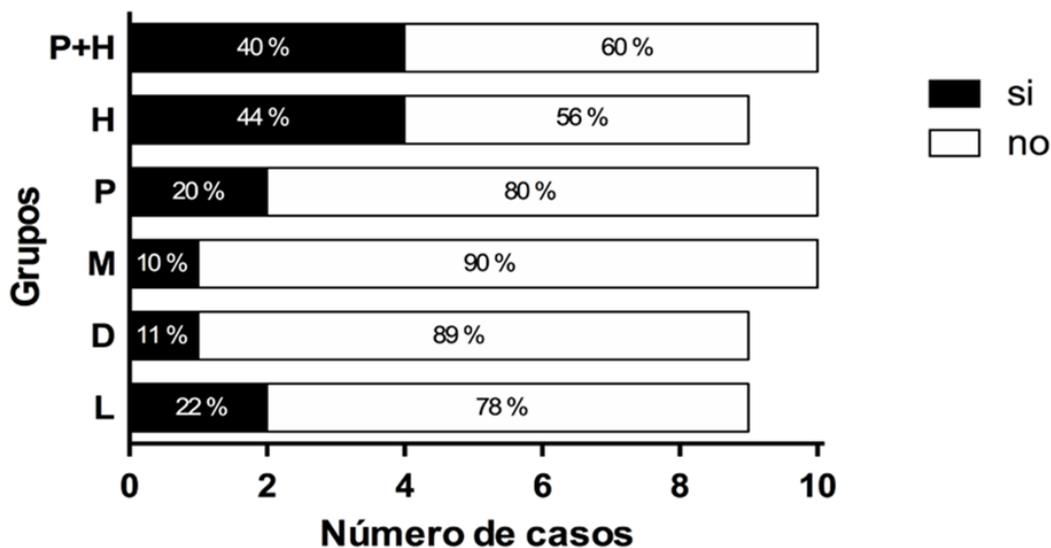
FIGURA 18: En esta fotografía también se observa la mejora funcional de las ratas con Péptido+Hidrazida, así como, las lesiones en los costados relacionadas con la recuperación de la función sensitiva a las 6 semanas de evaluación.

RECUPERACIÓN DEL TONO MUSCULAR DE LA COLA



GRÁFICA 5: En la gráfica se muestra el número y porcentaje de animales por grupo, capaces de levantar la cola frecuente o constantemente al menos durante la última semana de evaluación. Prueba estadística: Chi-cuadrada. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Lesiones cutáneas por rascado



GRÁFICA 6: La gráfica muestra el número y porcentaje de animales por grupo que presentaron lesiones cutáneas en flanco(s) por rascado excesivo con las patas traseras, observadas al menos durante la última semana de evaluación. Prueba estadística: Chi-cuadrada. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Los avances en el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la lesión de la médula espinal han permitido desarrollar diferentes propuestas de tratamiento. En muchos casos las estrategias terapéuticas están enfocadas en la implantación de células troncales mesenquimales, células precursoras neurales o células neuronales diferenciadas en los sitios dañados. Sin embargo, recientemente se ha reportado el uso de moléculas bioactivas que promueven la restauración estructural y funcional del tejido afectado⁵⁷.

La literatura ha hecho mención del uso de péptidos o secuencias peptídicas que inducen el crecimiento y la reconexión axonal, tal es el caso del péptido IKVAV (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina) derivado de la Laminina o el péptido A91 derivado de la Proteína Básica de Mielina cuya aplicación sistémica ha demostrado funcionar como agente neuro protector⁵⁸⁻⁶³.

Esta información nos permitió proponer el uso del péptido AVIFM derivado de HACD1/CAP como una alternativa terapéutica enfocada en la regeneración del tejido nervioso dañado por traumatismo. Este péptido mostró en investigaciones anteriores que promueve la proliferación, adhesión y diferenciación de las células troncales mesenquimales¹¹. No obstante, solo ha sido aplicado en la regeneración de tejidos mineralizados, principalmente en defectos óseos donde se obtuvieron resultados positivos. Con la finalidad de ahondar más en sus posibles aplicaciones, aunado a que no existen reportes en la literatura del uso de péptidos derivados de proteínas cemento específicas como terapia para la regeneración del tejido nervioso, en la presente investigación utilizamos el péptido AVIFM, solo y en combinación con Hidrazida como una estrategia terapéutica novedosa enfocada en la regeneración de la médula espinal¹¹⁻¹⁴.

Como vehículo para la administración intralesional del péptido se seleccionó el Matrigel® del que se han reportado múltiples estudios relacionados con su aplicación en terapias regenerativas del SNC, donde describen sus características físicas y biológicas, principalmente cuando se utiliza como andamio para implantación de células o como matriz para la liberación prologada de moléculas promotoras del crecimiento axonal. La literatura lo ha descrito como un material biosintético, no tóxico, inmunológicamente inerte, de fácil manipulación y reabsorbible, que permite la migración celular, además de funcionar como un medio para la liberación de diferentes moléculas, pero, como se mencionó anteriormente, el microambiente de la médula espinal sufre cambios que promueven la necrosis de los tejidos que no fueron dañados por el impacto, estas alteraciones han sido uno de los principales obstáculos en el desarrollo de tratamientos regenerativos, por esta razón incluimos en nuestro estudio el uso de Hidrazida como agente neuro protector^{48,57}.

La Hidrazida es el inhibidor más potente y selectivo de la mieloperoxidasa. En neutrófilos activados inhibe irreversiblemente la producción de ácido hipocloroso, pero no inhibe la actividad de otras enzimas antioxidantes, ni afecta la desgranulación de neutrófilos. La Hidrazida se vuelve más potente en condiciones inflamatorias donde el oxígeno se consume rápidamente para generar peróxido de hidrógeno. La Hidrazida ha mostrado efectos benéficos en modelos de enfermedades del SNC donde la mieloperoxidasa participa en el proceso fisiopatológico. En condiciones de neuro-inflamación, protege contra la disfunción de la barrera hemato-encefálica. En encefalomiелitis alérgica experimental, disminuye el volumen de lesión, reduce la gravedad de los síntomas y mejora la supervivencia^{50-53,64,65}.

Para desarrollar el estudio utilizamos ratas hembra de la cepa Long-Evans debido a su resistencia física y su pelaje característico que permite la identificación de cada uno de los animales. Se eligió el modelo de lesión traumática por contusión debido a que es la condición más parecida a lo ocurrido en personas con lesión medular, a diferencia del modelo de sección completa, que ocurre rara vez en la práctica clínica³³⁻³⁵.

El principal objetivo de este estudio consistió en determinar el efecto del péptido solo o combinado con Hidrazida en su capacidad para promover la regeneración neuronal y restablecer las funciones perdidas por la lesión de médula espinal.

Para cumplir con el objetivo, la investigación fue dividida en dos fases la primera o prueba piloto permitió estandarizar y familiarizarse con los diferentes procedimientos experimentales y de evaluación, tanto funcional como histológica. Los resultados en esta fase no permitieron concluir sobre el efecto de las intervenciones, sobre todo por el tamaño pequeño de la muestra y la dispersión de los datos. Sin embargo, fue un estudio de gran utilidad para iniciar el experimento preclínico con nuevas habilidades y algunos datos reveladores. Con el estudio histológico de la prueba piloto (hematoxilina y eosina), así como con la inmunohistoquímica para neurofilamento se hicieron observaciones generales que nos permitieron proponer nuevos marcadores para el estudio definitivo como son; Proteína Ácida Fibrilar Glial, Proteína Básica de Mielina, Neurofilamento y Nestina. Fue posible identificar, entre otros aspectos, la presencia de los implantes, su proximidad al tejido del hospedero y la presencia de axones aparentemente regenerados (esto último basado en el análisis inmunohistoquímico cuando se usó neurofilamento).

Una vez que se observó la factibilidad y aparente “aceptación” de los implantes dentro de la lesión se inició con la prueba preclínica que consistió en la evaluación funcional a largo plazo

y con una muestra mayor de los grupos control y experimentales en un lapso de 8 semanas, por medio de la escala de BBB^{66,67}.

Durante la primera semana solo mejoraron de manera significativa las ratas sometidas solamente a desbride, posiblemente por la disminución en el edema y factores tóxicos que conllevan el tejido necrótico-hemático. Al paso de las semanas, la tendencia observada en la mejoría funcional de los grupos control lesión + desbride y lesión + desbride + vehículo, no alcanzó significancia estadística, mientras que los tres grupos experimentales, más notablemente en donde se combinó el péptido AVIFM y la Hidrazida, se observó mejora significativa en la función motora a partir de la cuarta semana, lo que sugiere que se requiere de más de 3 semanas para que los mecanismos reparativos inducidos por el tratamiento se expresen funcionalmente. Es importante mencionar que en todos los grupos tratados existió al menos un caso de fracaso terapéutico. Dicho comportamiento se atribuye al riesgo implicado en la manipulación y daño a los tejidos a causa del procedimiento quirúrgico, previsto por Guizar Sahagún y cols. durante el desarrollo de la técnica de desbride^{68,69}.

Debido a la severidad de esta condición física, en ocasiones las ratas empleadas en el estudio presentaron complicaciones secundarias a la parálisis, en su mayoría automutilación derivada del dolor crónico, ulceraciones causadas por la postura o infecciones de vías urinarias altas. La literatura menciona que los individuos con daño a la médula espinal presentan diversas complicaciones relacionadas con el nivel donde se haya producido el traumatismo. Otro de los objetivos propuestos fue la comparación del impacto en el pronóstico de las ratas tratadas con los implantes comparadas con las ratas de los grupos control, para esto utilizamos el análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer, la ventaja de este estimador bioestadístico es que permite tomar en cuenta a todos los animales utilizados en el estudio hasta el punto de su muerte y compararlos con los pacientes que se mantienen vivos durante el estudio. Así, se puede dividir el tiempo que duró la rata en el estudio en intervalos y se calcula el porcentaje de supervivencia. Los resultados obtenidos en el estudio preclínico mostraron que los grupos control presentaron una mayor cantidad de complicaciones, que se vieron reflejadas en un índice de supervivencia menor al 60% para el grupo que solo fue lesionado, mientras que los grupos correspondientes al desbride y el desbride + vehículo no superaron el 70% de supervivencia. Para el caso de los grupos de péptido e Hidrazida el índice de supervivencia alcanzado fue mayor al 80%, así mismo el grupo donde se combinaron ambas moléculas obtuvo un porcentaje de supervivencia del 91%, confirmando que el efecto del péptido, la Hidrazida

o ambos tiene gran impacto en la menor incidencia de complicaciones, reduciendo su gravedad y mejorando el pronóstico de los animales lesionados^{70,73}.

- **Limitaciones de la investigación**

Los resultados que obtuvimos en ambos estudios representan una base sólida para la formulación de nuevas hipótesis en cuanto al tratamiento de la lesión medular traumática con una estrategia que combine el péptido y la Hidrazida que probamos aquí. Sin embargo, hace falta completar los estudios morfológicos del experimento preclínico, lo cual sin duda aportará al conocimiento posibles mecanismos involucrados en la mejoría que observamos en el estado general, sobrevida y mejoría funcional en los animales tratados.

Otra limitación del presente estudio es que solo se utilizaron animales sometidos a lesión medular de intensidad moderada. Es muy importante que en un futuro se evalúe también el efecto de nuestra propuesta en animales sometidos a lesión de intensidad severa.

En la nueva línea de investigación terapéutica que estamos iniciando, es deseable que también se investigue a futuro otros aspectos preclínicos relevantes como establecimiento de la ventana terapéutica e implementación de métodos de evaluación adicionales, incluyendo entre otros, estudios de imagen de alta resolución y estudios electrofisiológicos.

CONCLUSIONES.

El tratamiento propuesto en esta investigación busca cubrir los diferentes blancos terapéuticos mencionados en la literatura: el desbride elimina los restos celulares y moléculas proinflamatorias liberadas como interleucinas y especies reactivas del oxígeno por el traumatismo preservando el tejido que no fue alcanzado por el impacto, la Hidrazida inhibe selectivamente la mieloperoxidasa impidiendo la extensión del daño sin interferir en la actividad fagocítica de los polimorfonucleares, con lo que desempeñan un papel neuro protector; el Matrigel® provee un medio de liberación prolongada para el péptido y permite la adhesión de las células atraídas al sitio de lesión, por último, teorizamos que el péptido AVIFM actúa como un regulador positivo de la proliferación, adhesión y diferenciación de las células precursoras neuronales remanentes, con lo que cubre la actividad regeneradora, restableciendo la función perdida por el traumatismo.

La realización del desbride o la implantación del Matrigel solo, no marcó diferencia significativa en la recuperación de las ratas a largo plazo; tampoco aumentó la severidad de la disfunción motriz.

Las ratas a las que se les implantó el péptido solo o combinado con Hidrazida no mostraron formación de tejidos ajenos a la médula espinal.

El uso del péptido AVIFM en la lesión de médula espinal mostró efectos positivos en la recuperación de las ratas tratadas con los implantes, esto es un parteaguas en el desarrollo de tratamientos novedosos enfocados en la regeneración del sistema nervioso central y rompe el paradigma de que la aplicación de los péptidos derivados de proteínas cemento específicas se limita únicamente a su aplicación en tejidos mineralizados.

Los resultados mostrados en este estudio abren la posibilidad de utilizar el péptido AVIFM en modelos crónicos de lesión traumática de médula espinal, escalar su aplicación a diferentes modelos animales o distintos modelos de lesión, que permitan a futuro el desarrollo de terapéuticas efectivas y mínimamente invasivas que mejoren el pronóstico y restablezcan la función normal de los pacientes que sufren distintos tipos de parálisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Orhan Bican, Alireza Minagar, Amy A. Pruitt, The Spinal Cord: A Review of Functional Neuroanatomy, *Neurologic Clinics*, Volume 31, Issue 1, 2013, Pages 1-18
2. Adel K. Afifi, Ronald A. Bergman. *Neuroanatomía estructural y funcional, texto y atlas*. Mc Graw-Hill Interamericana. 2000
3. Escobar A, Gomez B. Barrera hematoencefálica, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*, septiembre-octubre, 2008;9(5): 395-405
4. Mehdar K M. Mahjri A A. Al Rashah A A. Alyazidi A. (2019). Epidemiology of Spinal Cord Injuries and their Outcomes: A Retrospective Study at the King Khalid Hospital. *Cureus*, 11(12), e6511.
5. Kornhaber R. Mclean L. Betihavas V. Cleary M. (2017). Resilience and the rehabilitation of adult spinal cord injury survivors: A qualitative systematic review. *Journal of Advanced Nursing*, 74(1), 23–33.
6. Novellino F. Saccà V. Donato A. Zaffino P. Spadea MF. Vismara M. Arcidiacono B. Malara N. Presta I. Donato G. Innate Immunity: A Common Denominator between Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1115
7. Christopher S. Ahuja, MD, Satoshi Nori, MD, Lindsay Tetreault, MD, Jefferson Wilson, MD, Brian Kwon, MD, PhD, James Harrop, MD, David Choi, MD, PhD, Michael G. Fehlings, MD, PhD, *Traumatic Spinal Cord Injury—Repair and Regeneration*, *Neurosurgery*, Volume 80, Issue 3S, March 2017, Pages S9–S22
8. Barbierato M., Skaper S.D., Facci L. (2018) Oligodendrocyte Progenitor Cell Cultures: A Model to Screen Neurotrophic Compounds for Myelin Repair. In: Skaper S. (eds) *Neurotrophic Factors*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1727. Humana Press, New York, NY
9. Phuong Tran A, Warren P M, Silver J. The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury. *Physiol Rev* 98: 881–917, 201
10. Hastar, N., Arslan, E., Guler, M. O., & Tekinay, A. B. (2017). Peptide-Based Materials for Cartilage Tissue Regeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 155–166. doi:10.1007/978-3-319-66095-0_7
11. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, Velázquez U, Mercado G, Arzate H. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*. 2014 Dec; 69:154-64.
12. Salgado Chavarría, Fabiola. Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis. Universidad Nacional Autónoma de México. 2017
13. Correa Prado, Rodrigo. Nucleación y/o inhibición del proceso de mineralización in vitro a partir de péptidos derivados de proteínas del cemento / 2016

14. Salgado Chavarria . Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptico novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). Universidad Nacional Autónoma de México, agosto, 2014. 2014.
15. Duane E. Haines. PRINCIPIOS DE NEUROCIENCIA, Aplicaciones básicas y clínicas. Cuarta edición. Elsevier, España 2014
16. Netter. Atlas de neurociencia, 3.^a ed. de David L. Felten, M. Kerry O'Banion y Mary Summo Maida. 2017 Elsevier España; 2.^a edición. 2010 Elsevier España.
17. Rouviere H, Delmas A. Anatomía humana: Descriptiva, Topográfica y Funcional, Tomo 4. 11va. Ed. 2005, Elsevier, España.
18. Reyes Alva Horacio José: Cambios histopatológicos y de permeabilidad en el espacio subaracnoideo espinal en función de la intensidad y el tiempo transcurrido después de lesión traumática de médula espinal. Tesis. UNAM, México D.F. 2013.
19. Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D. et al. Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3291–3310 (2016).
20. Loch-Neckel G, Koepf J. La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol* 2010;51 (03):165-174
21. Fang B, Li X, -Q, Bi B, Tan W, -F, Liu G, Zhang Y, Ma H: Dexmedetomidine Attenuates Blood-Spinal Cord Barrier Disruption Induced by Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36:373-383. doi: 10.1159/000430107
22. Sano Y, Kanda T. Blood- neural barrier: Overview and latest progress. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4 (2013) 220-227
23. Christopher D. Witiw, MD and Michael G. Fehlings, Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech* Volume 28, Number 6, July 2015
24. Meadows R (2010) Healing Spinal Cord Injuries. *PLoS Biol* 8(6): e1000400. doi: 10.1371/journal.pbio.1000400
25. Albadawi, H., Chen, J. W., Oklu, R., Wu, Y., Wojtkiewicz, G., Pulli, B., Milner, J. D., Cambria, R. P., & Watkins, M. T. (2017). Spinal Cord Inflammation: Molecular Imaging after Thoracic Aortic Ischemia Reperfusion Injury. *Radiology*, 282(1), 202–211.
26. Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26(24 Suppl): S2-12.
27. Chacón, Sara & Nieto-Sampedro, Manuel. (2005). Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura Pathophysiology of spinal cord injury. A review
28. Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology*, 10, 282.
29. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol* 2001 Sep-Oct; 24(5): 254-64.

30. Estrada-Mondaca, Sandino, Carreón-Rodríguez, Alfonso, Parra-Cid, María del Carmen, León, Clemente Ibarra-Ponce de, Velasquillo-Martínez, Cristina, Vacanti, Charles A., & Belkind-Gerson, Jaime. (2007). Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*, 49(6), 437-444
31. Wang, H., Song, G., Chuang, H., Chiu, C., Abdelmaksoud, A., Ye, Y., & Zhao, L. (2018). Portrait of glial scar in neurological diseases. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 31, 2058738418801406.
32. Bradbury E, Burnside E. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature Communications*, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>.
33. Nardone, Raffaele, Florea, Cristina, H"oller, Yvonne, Brigo, Francesco, Versace, Viviana, Lochner, Piergiorgio, Golaszewski, Stefan, Trinkka, Eugen, Rodent, large animal and non-human Primate models of spinal cord injury. *Zoology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.zool.2017.06.004>
34. Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1125–1137.
35. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*. (2000) 17:1–17. 10.1089/neu.2000.17.
36. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, et al. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*. (2014) 52:588–95. 10.1038/sc.2014.91
37. Acevedo J C, Varón L F, Berbeo E, Feo Lee O, Díaz R. Avances fisiopatológicos para el entendimiento de la lesion medular traumática. Revisión bibliográfica. *Revista colombiana de ortopedia y traumatología*. Volumen 22- no.4 Diciembre 2008. Pp 272-281
38. Cibeira J, Consideraciones históricas sobre los pacientes con lesiones medulares. *Boletín del Departamento de Docencia e Investigación del Instituto de Rehabilitación Psicofísica*. No.1 vol.8. Julio 2004. Argentina.
39. Moreno S, Trauma Raquimedular, Aporte estudiantil. *Morfología- vol.7, número 1, 2015*
40. E. García Vicente, M. A. (Agosto de 2007). Trauma Raquimedular. *MEDICRIT. Revista de medicina interna y crítica*, 4(3).
41. Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26(24 Suppl): S39-46.
42. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; (3): 1-30.
43. Kamano S. Are steroids really ineffective for severely head injured patients? *Neurosurg Focus* 2000; 8(1): 1-10.
44. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg*. 1998 Nov; 89(5): 699-706.
45. Springer H. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 2004; 1(1): 80-100

46. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: preliminary report. *JAMA*. 1911; 57: 878–880
47. Ganz J, Shor E, Guo S, Sheinin A, Arie I, Michaelevski I, Pitaru S, Offen D and Levenberg S (2017) Implantation of 3D Constructs Embedded with Oral Mucosa-Derived Cells Induces Functional Recovery in Rats with Complete Spinal Cord Transection. *Front. Neurosci*.
48. Wang, J., Chu, R., Ni, N., & Nan, G. (2020). The effect of Matrigel as scaffold material for neural stem cell transplantation for treating spinal cord injury. *Scientific reports*, 10(1), 2576.
49. Guizar-Sahagun G, Martinez-Cruz A, Franco-Bourland RE, Cruz-García E, Corona-Juarez A, Diaz-Ruiz A, Grijalva I, Reyes-Alva HJ, Madrazo I. Creation of an intramedullary cavity by hemorrhagic necrosis removal 24 h after spinal cord contusion in rats for eventual intralesional implantation of restorative materials. *PLoS ONE*. 2017; 12(4): e017610524. Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5), 378–386.
50. Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem J* 1997; 321:503-508.
51. Huang, J., Smith, F., & Panizzi, P. (2014). Ordered cleavage of myeloperoxidase ester bonds releases active site heme leading to inactivation of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazide analogs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 548, 74–85.
52. Kettle, A. J., Gedye, C. A., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (1995). Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. *The Biochemical journal*, 308 (Pt 2) (Pt 2), 559–56345. Allen AR. Remarks in histopathological changes in spinal cord due to impact: an experimental study. *J Nerv Ment Dis*. 1914; 41: 141–147.
53. Burner U, Obinger C, Paumann M, Furtmüller P, Kettle A, Transient and Steady-state of the oxidation of substituted benzoic acid Hydrazides by Myeloperoxidase, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no.14, April 1999.
54. Pitaru S, Narayanan S A, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res*. 1995;30(5):360-8
55. Valdés De Hoyos A, Hoz-Rodríguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. *J Dent Res*. 2012 Feb;91(2):203-9. doi: 10.1177/0022034511428155. Epub 2011 Nov7.
56. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Munoz F, Arzate H, Villalobos C, et al. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontal Res*. 2012;47(1):33-44
57. Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2007). Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 325–338.
58. X. Li, X. Liu, B. Josey, C.J. Chou, Y. Tan, N. Zhang, X. Wen Short laminin peptide for improved neural stem cell growth *Stem Cells Transl. Med.*, 3 (5) (2014), pp. 662-670
59. Patel, R., Santhosh, M., Dash, J. K., Karpoormath, R., Jha, A., Kwak, J., ... Kim, J. H. (2018). Ile-Lys-Val-ala-Val (IKVAV) peptide for neuronal tissue engineering. *Polymers for Advanced Technologies*. doi:10.1002/pat.4442

60. W. Sun, T. Incitti, C. Migliaresi, A. Quattrone, S. Casarosa, A. Motta Viability and neuronal differentiation of neural stem cells encapsulated in silk fibroin hydrogel functionalized with an IKVAV peptide *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 11 (5) (2017), pp. 1532-1541
61. Ibarra, A., Sosa M. García E., Flores A., Cruz Y. Mes-tre H., Martiñón S. Pineda-Rodríguez B.A. y Gutiérrez-Ospina G. (2013). Prophylactic neuroprotection with A91 improves the outcome of spinal cord injured rats. *Neurosci Lett.* 554, 59-63
62. García, E., Silva-García, R., Mestre, H., Flores, N., Martiñón, S., Calderón-Aranda, E.S., e Ibarra, A. (2012). Immunization with A91 peptide or Copolymer-1 reduces the production of Nitric Oxide and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression after Spinal Cord Injury. *J Neurosci Res.* 90, 656-663.
63. R. Lozano, L. Stevens, B.C. Thompson, K.J. Gilmore, R. Gorkin 3rd, E.M. Stewart, M. Inhet Panhuis, M. Romero-Ortega, G.G. Wallace 3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates *Biomaterials*, 67 (2015), pp. 264-273
64. Li A, Wu Y, Pulli B, et al. Myeloperoxidase Molecular MRI Reveals Synergistic Combination Therapy in Murine Experimental Autoimmune Neuroinflammation. *Radiology*. 2019;293(1):158-165. doi:10.1148/radiol.2019182492
65. Zhang Y, Dong H, Seeburg DP, et al. Multimodal Molecular Imaging Demonstrates Myeloperoxidase Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity in Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019;56(2):954-962. doi:10.1007/s12035-018-1137-2
66. Barros Filho, Tarcisio Eloy Pessoa de, & Molina, Alessandra Eira Iague Sleiman. (2008). Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in wistar rats. *Clinics*, 63(1), 103-108.
67. Burke D.A., Magnuson D.S.K. (2012) Basso, Beattie, and Bresnahan Scale Locomotor Assessment Following Spinal Cord Injury and Its Utility as a Criterion for Other Assessments. In: Chen J., Xu XM., Xu Z., Zhang J. (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries II*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press
68. Molina Alessandra Iague, Cristante Alexandre Fogaça, Barros Filho Tarcisio Eloy Pessoa de. Análise comparativa da avaliação funcional realizada na lesão medular em animais. *Acta ortop. bras.* 2004 ,12(1): 48-56.
69. M.I. Günther, N. Weidner, R. Müller, A. Blesch Cell-seeded alginate hydrogel scaffolds promote directed linear axonal regeneration in the injured rat spinal cord *Acta Biomater.*, 27 (2015), pp. 140-150
70. Boido, M., Ghibaudi, M., Gentile, P., Favaro, E., Fusaro, R., & Tonda-Turo, C. (2019). Chitosan-based hydrogel to support the paracrine activity of mesenchymal stem cells in spinal cord injury treatment. *Scientific Reports*, 9(April), 1–16.
69. Gu X. Progress and perspectives of neural tissue engineering. *FrontMed*. 2015;9(4):401-411.
71. Falavigna Asdrubal, Finger Guilherme, Sebben Cesar, Silva Pedro Guarise da, Conzati Lucas Piccoli, Peletti-Figueiro Manuela. Motor and histological findings in a model of sci: comparison between posterior and lateral clips. *Coluna/ 2014 Dec ; 13(4): 318-321*

72. Matamala F, Cornejo R, Paredes M, Farfán E, Garrido O, Alves N. Análisis Comparativo del Número de Neurofilamentos en Nervios Isquiáticos de Rata Sometidos a Neuropraxia Tratadas con Láser de Baja Intensidad y Ultrasonido Terapéutico. Int. J. Morphol.

73. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Amer Statist Assn 1958; 53 (282):457-481

74. ARRIBALZAGA, EDUARDO B. (2007). Interpretation of survival curves. Revista chilena de cirugía, 59(1), 75-83

REFERENCIAS DE LAS IMÁGENES:

- 1) Figura 1. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/798946>
- 2) Figura 2. <https://quizlet.com/235590297/medula-espinal-estructura-interna-diagram/>
- 3) Figura 3. <https://www.pinterest.com.mx/pin/363243526175090405/>
- 4) Figura 4. Ortega M C, Papel del receptor Megalina en la biología de los precursores de oligodendrocitos durante el desarrollo y en patologías desmielinizantes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2012
- 5) Figura 5. <https://fundaciongaem.org/remielinizacion-esclerosis-multiple/>
- 6) Figura 6. <https://es.wikipedia.org/wiki/Agrecano>
- 7) Figura 7. Fuente propia
- 8) Figura 8. Fuente propia
- 9) Figura 9. Fuente propia
- 10) Figura 10. Fuente propia
- 11) Figura 11. Fuente propia
- 12) Figura 12. Fuente propia
- 13) Figura 13. Fuente propia
- 14) Figura 14. Fuente propia
- 15) Figura 15. Fuente propia
- 16) Figura 16. Fuente propia
- 17) Figura 17. Fuente propia
- 18) Figura 18. Fuente propia

ANEXOS

Anexo 1. Composición química del Líquido Cefalorraquídeo artificial. Para 1L de solución.

SUSTANCIA	CANTIDAD
NaCl	125 mM
KCl	3mM
CaCl ₂	2.5mM
MgSO ₄	1.3mM
NaH ₂ PO ₄	1.25mM
NaHCO ₃	26mM
Glucosa	13mM

Anexo 2. Escala de evaluación funcional BBB (Basso, Beattie y Bresnahan)

0. Sin movimiento de las patas traseras.
1. Movimiento leve de una o dos articulaciones usualmente la cadera o la rodilla.
2. Movimiento extenso de una articulación o movimiento extenso de una articulación con movimiento leve de cualquier otra articulación.
3. Movimiento extenso de dos articulaciones.
4. Movimiento leve de todas las articulaciones de las patas traseras.
5. Movimiento leve de dos articulaciones y movimiento extenso de una tercera.
6. Movimiento extenso de dos articulaciones y movimiento leve de una tercera.
7. Movimiento extenso de las tres articulaciones de las patas traseras
8. Arrastre de la extremidad sin soporte del peso o colocación plantar de la pata sin soporte del peso.
9. Colocación plantar de la pata con soporte del peso sin movimiento o soporte dorsal del peso ocasional, frecuente o consistente sin paso plantar.
10. Soporte del peso ocasional en las plantas, pero sin coordinación entre las patas delanteras y traseras.
11. Soporte del peso plantar de frecuente a consistente en los pasos, pero sin coordinación entre las patas traseras y delanteras.
12. Pasos con soporte del peso plantar de frecuente a consistente y coordinación ocasional entre las patas traseras y delanteras.
13. Pasos con soporte del peso plantar de frecuente a consistente con coordinación frecuente entre las patas traseras y delanteras.
14. Pasos con soporte del peso plantar, coordinación consistente entre patas traseras y delanteras y posición predominante de la pata girada (interna o externa) cuando hace contacto con la superficie justo antes de levantarse o al final de la postura o con escalonamiento plantar frecuente, coordinación de las patas delanteras y traseras constante y escalonado dorsal ocasional.
15. Pasos plantares constantes y coordinación entre patas traseras y delanteras constante sin espacio libre para los dedos de los pies o con espacio ocasional, la posición predominante de las patas es paralela al cuerpo durante el contacto inicial.
16. Pasos plantares constantes, coordinación constante entre las patas, espacio claro en los dedos de las patas frecuente durante el desplazamiento, posición predominante de las patas paralela al cuerpo.
17. Pasos constantes y coordinados, espacio de los dedos conservado durante el desplazamiento, posición paralela de las patas con respecto al cuerpo de manera predominante.
18. Escalonamiento plantar consistente y coordinación coherente de las patas traseras y delanteras durante la marcha; y el despeje del pie se produce de manera consistente durante el avance de la extremidad anterior; la posición predominante de la pata es paralela en el contacto inicial y girada en la elevación
19. Pasos constantes y coordinados con las patas delanteras, espacio claro de los dedos durante el avance hacia adelante posición de las patas paralelas al cuerpo al contacto inicial y al levantarlas con la cola caída parte del tiempo o todo el tiempo
20. Pasos y coordinación constante con movimiento claro de los dedos y conservado durante el avance, posición paralela de las patas con respecto al cuerpo, cola constantemente levantada con inestabilidad del tronco.
21. Pasos y coordinación constante, estabilidad del tronco y cola levantada (función normal).