

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P DE MEDICINA HUMANA

**Aplicación de Pancreatina en modelo de lesión
medular experimental como medio de regeneración
neuronal**

TESIS

para optar el título de Médico Cirujano

AUTOR

Roberto Jesús Chávez Asmat

ASESOR

Pablo Humberto Effio Iman

Lima Perú

2011

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente investigación.

A mis asesores, al Dr. Pablo Humberto Effio Imán, por brindarme su respaldo cuando la idea de investigación parecía una locura, por el perfeccionamiento del proyecto, por las tantas veces que me lo corrigió, por enseñarme a ser cada día mejor y mantener un sentimiento de superación.

Al Dr. Roger Ramos Aliaga por todas esas tardes que me dedicó, desde que surgió la idea, cuando se modificó en el tiempo, hasta la presentación final, por enseñarme a ver más allá de lo evidente, por ser un investigador a carta cabal.

Al Dr. Diego Díaz Coahila por guiar mis manos durante las intervenciones quirúrgicas, por no dejarme desfallecer, por dedicarme su tiempo hasta horas inimaginables, puedo admitir que entre el día y la noche no había mucha diferencia, por vivir intensamente esta investigación como yo lo he vivido.

A la Dra. Diana Rivas Franchini, la licenciada Frechia Astocondor Villapoma, técnica María Jesús Guevara Salcedo y el técnico Robert Prado Rivera, que me acogieron como un hijo desde la primera vez, por su apoyo integral a la presente investigación, por compartir la emoción de ver los resultados y recuerdo aquella frase que la doctora decía “Roberto, eres un pionero”

Al Dr. Rafael Díaz Rudas desde Francia, amigo sanfernandino, quien me brindó luces y orientación cuando más lo necesitaba, es y será mi ejemplo a seguir.

Al curso de Patología y específicamente Patología Experimental, al Dr. Ernesto Ráez, al Dr. David Díaz Leyva y Mg. Nancy Rojas, porque fue este curso que inoculó en mí eso “algo” que le llaman amor a la investigación y que se fortaleció los años en que apoyé a promociones menores, siendo si cabe el término “ayudante”.

A mis amigos sanfernandinos sobre todo a la promoción MH 2003 por lo que simbolizó “el retablo de los recuerdos” en mi tesis, a todos los miembros de ADIECS (**Asociación para el desarrollo de la investigación estudiantil en ciencias de la salud**), institución de la que fui miembro fundador y vi crecer a nuevos estudiantes muy interesados en investigación, siendo justamente ellos los que me apoyaron a pesar de sus horarios de clases tan estrechos.

DEDICATORIA

A los estudiantes de medicina humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de los años menores y a toda la familia adecsiana porque ellos fueron el gran motor para no derrumbarme en el camino a pesar de las adversidades, porque espero que este trabajo no sea una tesis más, sino que sirva de ejemplo y motivación para que mayor cantidad de estudiantes también se gradúe por tesis y para realizar investigación extracurricular.

“Para una voluntad firme, no existe fácil, ni difícil, fácil es lo que hemos aprendido hacer, difícil es lo que aún no hemos aprendido a hacer bien” Bernardo Houssay

RESUMEN

Objetivo: Determinar la degradación de cicatriz glial y presencia de regeneración neuronal en conejos con lesión medular experimental que recibieron aplicación de pancreatina. **Diseño:** Experimental. **Institución:** Facultad de Medicina-UNMSM; Clínica de animales menores-UNMSM; Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”; Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas; Centro de resonancia magnética-DIPSAC, Lima. **Materiales biológicos:** Conejos *Nueva Zelandia* (n=12) **Métodos:** Investigación dividida en dos fases, la primera con un método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina y la segunda con un método in vivo, donde se reproduce el modelo de lesión medular de Hashimoto, luego de dos meses se procede a la conformación de 2 grupos de manera aleatoria, un grupo enzima (recibe 5mg de pancreatina en 100 μ L tampón fosfato 0,1M y pH 6,7 vía intratecal) y un grupo control (recibe 100 μ L tampón fosfato 0,1M y pH 6,7 vía intratecal) ambos por un periodo de 21 días. Los animales de experimentación fueron evaluados antes, después de la lesión y durante la administración de la enzima con las pruebas clínicas BBB (Basso, Beattie y Bresnahan), de TARLOV, de campo abierto, de plano inclinado y del cilindro. Se compararon los puntajes obtenidos en las pruebas clínicas así como los resultados histopatológicos a través del test no paramétrico Wilcoxon y Mann – Whitney. Se consideró para el estudio un nivel de confiabilidad de 95%. **Resultados:** Las evaluaciones clínicas realizadas de manera periódica en los días 0, 7, 14 y 21 de aplicación de pancreatina (grupo enzima) y tampón fosfato (grupo control), no demostraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Se obtuvo en el grupo enzima una menor área de cavidades expresada en mm^2 y porcentaje con respecto al control siendo esta una diferencia significativa ($p=0.008$ y $p=0.042$ respectivamente). No se obtuvo entre el grupo enzima y control una diferencia significativa en el contenido de tejido conectivo, la presencia de astrocitos y área mielinizada ($p=0.222$, $p=0.421$ y $p=1.000$ respectivamente). En el grupo control no se presenta axonogénesis o es muy escasa a comparación del grupo enzima que presenta mayores dimensiones de axonogénesis e incluso con evidencia de neuromas de amputación. **Conclusión:** La pancreatina

aplicada en la lesión medular experimental promueve la disminución de cavidades intramedulares y la regeneración neuronal del tipo axonogénesis.

Palabras clave: **Lesión medular, modelo experimental, regeneración neuronal y pancreatina**

ABSTRACT

Objective: To determine the degradation of glial scar and the presence of neuronal regeneration in rabbits with experimental spinal cord injury who received application of pancreatin. **Design:** Experimental. **Institution:** Faculty of Medicine-San Marcos, Small Animal Clinic-San Marcos University, Institute of Pharmaceutical Sciences and Natural Resources "Juan de Dios Guevara", National Institute of Neurological Sciences, Centre for Magnetic Resonance-DIPSAC, Lima. **Biological materials:** New Zealand rabbits (n = 12) **Methods:** We divided into two phases, first with a biochemical method for the determination of glial scar degradation effect by pancreatin and the second with an in vivo method, which reproduces the model Hashimoto spinal cord injury after two months, made the formation of 2 groups at random, an enzyme group (receiving 5 mg of pancreatin in 100 μ L 0.1 M phosphate buffer pH 6.7 intrathecally) and a control group (received 100 μ L 0.1 M phosphate buffer pH 6.7 intrathecally) both for a period of 21 days. The experimental animals were evaluated before, after injury and during the administration of the enzyme with the clinical trials BBB (Basso, Beattie and Bresnahan), Tarlov, open-field activity, inclined plane and cylinder. Scores were compared in clinical trials as well as histopathological findings through non-parametric Wilcoxon and Mann-Whitney test. For the study was considered a confidence level of 95%. **Results:** Clinical evaluations performed at regular intervals on days 0, 7, 14 and 21 for the application of pancreatin (enzyme group) and phosphate buffer (control group) showed no statistically significant difference between groups. Was obtained in the enzyme group lower cavity area expressed in mm^2 and percentage with respect to control this being a significant difference ($p = 0.008$ and $p = 0.042$ respectively). There was obtained between the enzyme and control group a significant difference in connective tissue content, the presence of astrocytes and myelinated area ($p = 0.222$, $p = 0.421$ and $p = 1,000$ respectively). In the control group does not appear axonogenesis or very little in comparison of the enzyme group that has more dimensions of axonogenesis and even evidence of amputation neuromas. **Conclusion:** The pancreatin applied in experimental spinal cord injury promotes the reduction of intramedullary cavities and axonogenesis type neuronal regeneration.

Keywords: Spinal cord injury, experimental model, neuronal regeneration and pancreatin

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

I. 1 PERCEPCIÓN, IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA:	1
I. 2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA:	3
I.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:	3
I.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:	
I.4.1 Justificación legal:	3
I.4.2 Justificación teórica – científica:	4
I.4.3 Justificación práctica:	4
I.5 OBJETIVOS:	
I.5.1 Objetivo general:	5
I.5.2 Objetivos específicos:	5
Objetivos de la etapa de estandarización “pilotó”:	5
Objetivos fisiológicos y clínicos:	5
Objetivos bioquímicos:	5
Objetivos radiológicos:	5
Objetivos histopatológicos:	6
Objetivos de razonamiento:	6
I.6 PROPÓSITO DEL ESTUDIO:	6
I.7 MARCO TEÓRICO	
I.7.1 BASE TEÓRICA	
I.7.1.1 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR	
EPIDEMIOLOGÍA:	8
I.7.1.2 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR	
ETIOLOGÍA:	8
I.7.1.3 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR	
FISIOPATOLOGIA:	9
LESIÓN PRIMARIA:	9
LESIÓN SECUNDARIA:	9
Alteraciones vasculares:	10
Radicales libres y peroxidación lipídica:	10

Excitotoxicidad y desequilibrios electrolíticos:	11
Muerte neuronal por apoptosis y necrosis:	11
Respuesta inflamatoria e inmunológica:	12

I.7.1.4 MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LESIÓN MEDULAR

IN VIVO:	13
PRODUCTOS QUÍMICOS:	13
Epinefrina:	13
Noradrenalina:	13
Cloruro de calcio:	13
Neurotoxinas adrenérgicas y serotoninérgicas:	14
MEDIOS FÍSICOS:	14
Modelos compresivos y/o de contusión:	14
Modelos de transección y/o sección parcial:	16
Modelos vasculares:	17
IN VITRO:	17

I.7.1.5 ¿POR QUÉ LA MÉDULA ESPINAL DESPUÉS DE UNA LESIÓN NO TIENE O TIENE POCA CAPACIDAD REGENERADORA?

Cicatriz glial:	18
Moléculas inhibitorias de mielina:	19
Moléculas derivadas de la matriz extracelular:	19

I.7.1.6 ¿POR QUÉ LOS ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DE LESIÓN MEDULAR EN ANIMALES NO DA LOS MISMOS RESULTADOS EN HUMANOS?

Diferencias del tamaño:	20
Neuroanatomía comparada:	20

I.8 ANTECEDENTES:	21
--------------------------------	----

I.9 HIPOTESIS:	23
-----------------------------	----

CAPITULO II: MATERIAL Y MÉTODO

II.1 TIPO DE ESTUDIO:	24
II.2 MATERIAL BIOLÓGICO:	24
II.3 MATERIAL FARMACOLÓGICO, QUÍMICO Y/O DE INSTRUMENTACIÓN:	27
II.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:	29
II.4.1 Primera etapa:	
Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina:	29
II.4.2 Segunda etapa:	
Grupos experimentales:	31
Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):	32
Método radiológico para colocación de tornillo:	32
Método de colocación de catéter para aplicación de pancreatina en lesión medular:	33
Cuidados postoperatorio:	33
Fisioterapia:	34
Evaluación de lesión medular:	
Evaluación clínica:	34
Evaluación radiológica para aplicación de enzima:	39
Evaluación histopatológica:	40
II.5 PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS:	41
II.6 ÉTICA:	41

CAPITULO III: RESULTADOS

III.1 PRIMERA ETAPA:	
Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina:	42
III.2 SEGUNDA ETAPA:	
A) Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):	43

B) Formación de grupos:	44
C) Evaluación de regeneración neuronal	
Clínica:	45
Histopatología:	46
Formación de cavidades:	46
Contenido de tejido conectivo:	46
Área mielinizada:	47
Presencia de astrocitos:	47
Presencia de regeneración neuronal:	47

CAPITULO IV: DISCUSIONES

IV.1 PRIMERA ETAPA:

Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina:	48
--	----

IV.2 SEGUNDA ETAPA:

A) Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):	50
B) Formación de grupos:	50
C) Evaluación de regeneración neuronal	
Clínica:	51
Histopatología:	52
Formación de cavidades:	52
Contenido de tejido conectivo:	52
Área mielinizada:	53
Presencia de astrocitos:	53
Presencia de regeneración neuronal:	53

CAPITULO V: CONCLUSIONES	54
---------------------------------------	----

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	55
---	----

CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA	56
---	----

ANEXOS	77
---------------------	----

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

I. 1 PERCEPCIÓN, IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA:

La Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) tiene como fin, formar humanistas, científicos y profesionales del más alto nivel de acuerdo con las necesidades prioritarias del país, así como realizar investigación en humanidades, ciencia y tecnología ¹ ; en esta línea se orientan los planes curriculares, siendo en la escuela académico profesional de medicina humana donde se asegura una sólida formación básica, científica, ética y humanística , buscando un fomento de la investigación en los campos de las ciencias básicas, clínicas y gestión de servicios de salud. ²

La investigación es el único camino para descubrir nuevos horizontes de la medicina ³ , la investigación científica parte con la percepción de que el acervo de conocimiento disponible es insuficiente para manejar determinados problemas, **“solo quienes ven pueden darse cuenta que falta algo”**. ⁴

La enseñanza universitaria brinda las pautas del método científico que permite formular y descubrir problemas a partir del reconocimiento de hechos ⁵ , algunos cuestionamientos que me he formulado aún no han sido resueltos sobre todo lo referente al funcionamiento del sistema nervioso central, por lo que la presente investigación busca esclarecerlos.

En la prácticas clínica se observa pacientes con lesiones medulares por múltiples causas, desde niños hasta adultos, quienes se encuentran afectados en todas las esferas (física, social y psicológica) ⁵ , afectados en si su calidad de vida ⁶ . Cuando preguntaba ¿Qué se puede hacer en estos casos?, la respuesta era **“iniciar terapia física y rehabilitación, el daño establecido no puede revertirse”**, pero ¿Los pacientes con lesión medular completa por ejemplo estarán postrados toda su vida? ¿Podrían volver a caminar? o ¿No?, las investigaciones al respecto ¿Que han logrado? ¿Existe regeneración en el sistema nervioso central? ¿La neurona puede realizar mitosis?

Desde fines del siglo XIX se vivió bajo un paradigma establecido por la figuras más imponentes de ese tiempo, Koelliker, Hiss y Cajal, el paradigma que ***“la estructura del cerebro permanece constante posterior a su nacimiento en el humano como en otros mamíferos”***⁷, era inconcebible la idea de mitosis neuronal. Para inicios del siglo XX surgen trabajos esporádicos donde muestran neurogénesis postnatal en mamíferos, siendo estos criticados por Ramón y Cajal cuando dice: ***“Desafortunadamente, sin embargo, ningunos de los métodos usados por estos investigadores son capaces de distinguir absolutamente una célula de neuroglia que se multiplica de una pequeña neurona mitótica”***⁸, para aquel entonces no se contaba con microscopía electrónica. Esta idea se mantuvo por mucho tiempo hasta que Josehp Altman en los años 60 publica investigaciones en Science, en Journal of Comparative Neurology y en Journal of Neuroscience, donde muestra nuevas neuronas en neocortex, gyrus dentado y bulbo olfatorio⁹⁻¹⁴, investigaciones no tomadas en cuenta para su época, fue un investigador que se atrevió a romper el paradigma, un adelantado para su época, ya después con la microscopía electrónica se demostró que Altman tenía razón, si existe la mitosis neuronal.

Entonces, si hay neurogénesis en el sistema nervioso central ¿Por qué no se da una regeneración posterior a la lesión medular?, en la actualidad se conoce que hay una regeneración posterior a la lesión medular que no es del todo efectiva ya que presenta limitantes intrínsecas como la expresión de genes asociados a la regeneración así como las barreras extrínsecas que son los factores inhibitorios específicos de mielina, la misma cicatriz glial, los componentes inflamatorios entre otros.

La naturaleza inhibitoria de la cicatriz glial se conoce desde hace años, Ramón y Cajal describió el colapso y retracción de los brotes axonales al no poderla atravesar⁸, por ello pensar en la acción de enzimas que la puedan degradar y favorezca la plasticidad neuronal ha sido desarrollada con tripsina, hialuronidasa, elastasa, desoxirribonucleasas, plasmina y condritinasa ABC (ChABC) todos han llevado a resultados prometedores dentro el campo del trauma de la médula espinal¹⁵⁻¹⁹, en la presente investigación, se pretende utilizar la pancreatina, que incluye a varias de las enzimas estudiadas anteriormente, asociado a ello las enzimas con acción de

carbohidrasa y lipolítica podrían tener un mayor espectro de acción sobre los sustratos que componen la cicatriz glial favoreciendo de esta manera la reconexión axonal, en la actualidad no hay estudios publicados al respecto.

I.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA:

El presente estudio enfocado en regeneración de la lesión medular, para su delimitación se llevó al campo experimental, respetando los códigos de ética para el manejo de animales de experimentación, así como la “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”²⁰, brindando los ambientes adecuados para su realización (bioterio), con recursos humanos disponibles, con un tiempo de ejecución del proyecto de 4 meses, con la necesidad social y científica de buscar una posibilidad de regeneración neuronal es que se inició este desafío.

I.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿La aplicación de pancreatina en un modelo de lesión medular experimental puede degradar la cicatriz glial y promover la regeneración neuronal?

I.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:

I.4.1 Justificación legal:

La Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) ha establecido políticas y estrategias de investigación del 2007 al 2011, con la política 10: “Promover a nivel de pregrado la aplicación de la investigación como herramienta metodológica de la formación profesional, poniendo en práctica una actitud positiva frente al pensamiento científico y creativo” y su estrategia 10.1: “ Establecer medidas que promuevan la participación de los alumnos en grupos y en proyectos de investigación, motivando el desarrollo de tesis en este contexto”²¹, es así que se llevó a cabo el presente estudio.

I.4.2 Justificación teórica –científica:

Mientras los animales inferiores solo están en el mundo, el hombre trata de entenderlo; y sobre la base de su inteligencia imperfecta pero perfectible del mundo, el hombre intenta enseñorearse de él para hacerlo más confortable. Por medio de la investigación científica, el hombre ha alcanzado una reconstrucción conceptual del mundo que, es cada vez más amplia profunda y exacta.⁵

La necesidad de buscar una nueva terapia para las lesiones medulares, generó que en el mundo, innumerables investigadores plantearan diversas estrategias en animales de experimentación, que van desde el potencial uso de las células de vástago, antagonistas de proteínas inhibitorias de mielina, polietileno glicol, varias formas de trasplante (células de Schwann, células envolventes de bulbo olfatorio, nervios periféricos, tejido espinal fetal, etc.)²²⁻²⁷ hasta el uso de sustancias enzimáticas como la tripsina, elastasa, desoxirribonucleasas, fibrinolisisina y condritinasa ABC (ChABC)¹⁵⁻¹⁹ todos han llevado a resultados prometedores dentro el campo del trauma de la médula espinal, sin embargo es cuestionable la metodología utilizada en los mismos, ya que la aplicación en los humanos no ha dado los mismo resultados.

En esta misma necesidad, se busca plantear una nueva estrategia de regeneración medular, teniendo presente las críticas más contundentes de las investigaciones previas²⁸⁻³⁸, enfocado en la degradación de la cicatriz glial a través de enzimas, en este caso la pancreatina, sería una contribución de orden científico ya que actualmente no hay publicaciones al respecto.

I.4.3 Justificación práctica:

El presente trabajo de investigación bajo los objetivos claramente definidos plantea demostrar una nueva estrategia de regeneración medular, el cual sería un aporte a los estudios pre-clínicos, buscando que en conjunto con mayores investigaciones que brinden evidencia científica en este tema, tener una posterior aplicación en ensayos clínicos randomizados y controlados (Nivel de evidencia I).

I.5 OBJETIVOS:

I.5.1 Objetivo general:

- Determinar la degradación de cicatriz glial y presencia de regeneración neuronal en conejos con lesión medular experimental que recibieron aplicación de pancreatina.

I.5.2 Objetivos específicos:

Objetivos de la etapa de estandarización “piloto”:

- Estandarizar el modelo compresivo de *Hashimoto* como modelo de lesión medular para conejos.
- Estandarizar el método bioquímico para la acción enzimática de la pancreatina.

Objetivos fisiológicos y clínicos:

- Determinar las características del conejo como animal de experimentación adecuado para el estudio de lesión medular.
- Aplicar pruebas clínicas en los conejos antes y después de generada la lesión medular, así como durante la aplicación de la pancreatina.

Objetivos bioquímicos:

- Determinar por método bioquímico estándar de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina.

Objetivos radiológicos:

- Determinar a través de imágenes radiográficas la distribución de vértebras tóraco-lumbares en conejos antes de inducir la lesión medular.

- Determinar a través de imágenes radiográficas la localización del tornillo de acero inoxidable en médula espinal de conejos según técnica de *Hashimoto*.
- Determinar a través de resonancia magnética la magnitud de la lesión medular en los conejos, expresado en volumen de cicatriz glial a través de la inclusión de las imágenes en el Software J MicroVision 1.2.7.

Objetivos histopatológicos:

- Determinar la formación de cavidades, el contenido de tejido conectivo, el área mielinizada y presencia de astrocitos con tinciones de Hematoxilina y eosina (H&E), Reumont, Tricrómico de Gomori, Luxol fast blue e inmunohistoquímica GPAF, a través de la inclusión de las imágenes en el Software J MicroVision 1.2.7.
- Determinar la presencia de regeneración neuronal.

Objetivos de razonamiento:

- Comparar la degradación de cicatriz glial y presencia de regeneración neuronal entre el grupo de lesión medular que recibió aplicación de pancreatina con su respectivo grupo control.

I.6 PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

La lesión traumática de la médula espinal en las 2 últimas décadas evidencia una alta tasa de mortalidad en los países en vías de desarrollo (hasta 17x millón considerando una incidencia de 29.7 x millón), los accidentes de tránsito son la causa principal de lesión en países desarrollados, mientras que las caídas son la causa principal en países en vías de desarrollo.³⁹

No solo es la alta tasa de mortalidad sino también el compromiso del sistema autonómico que se presenta posterior al daño y que en muchos casos persiste toda la vida, como la falta de control urinario, vejiga atónica⁴⁰, se ha reportado en pacientes con más de 10 años de producida la lesión la incontinencia urinaria hasta en el 46% de

los casos, que van desde una presentación diaria hasta una vez por semana ⁴¹, en ese mismo tiempo también se evidencia la presencia de pielonefritis (34.1% de los casos) y cálculos renales (24.6% de los casos), siendo el reflujo vésico-ureteral de alto riesgo para pielonefritis y deterioro de las vías urinaria altas.⁴²

A nivel gastrointestinal, el íleo paralítico en las primeras semanas post lesión medular, la ulcera gástrica, la incontinencia anal ⁴⁰, hemorroides, grietas y prolapso rectal ⁴³, siendo necesario en el manejo digestivo el uso de laxantes orales y evacuación manual de manera indefinida.⁴⁴

La persona tiene que aprender a adaptarse a su nuevo cuerpo, adquirir confianza sexual, actualmente es vista como una de las primeras en prioridad de recuperar funcionalmente⁴⁵, la disfunción eréctil en varones amerita como uso rentable el sildenafil ⁴⁶ así mismo modernos métodos de colección de esperma para fertilidad ⁴⁷, en las mujeres que fueron capaces de superar las restricciones físicas y los obstáculos mentales debido a la lesión, fue posible recuperar una vida sexual activa y positiva junto a su pareja.⁴⁸

La depresión mayor ha sido identificado en pacientes con lesión medular alcanzando un 11.4% al año de producida la misma ⁴⁹ y en un seguimiento de 6 años hasta de 28.9%, siendo un riesgo mayor los que tenían historia de depresión antes de la lesión.⁵⁰

En si, la calidad de vida de la persona se ve afectada, siendo el sexo masculino, el desempleo, la falta de movilidad, la perdida de la autonomía, la falta de ajuste en su entorno social los factores asociados a menor nivel de calidad de vida en pacientes con lesión medular.⁵¹

Si se pudiera ofrecer mejorar la calidad de vida de estos pacientes así como todas las consecuencias de la lesión medular *per se*, a través de una intervención quirúrgicas con el objetivo de una regeneración neuronal, se debería de intentar, para ello es necesario primero de estudios pre-clínicos, en animales de experimentación, como es el presente.

I.7 MARCO TEÓRICO

I.7.1 BASE TEÓRICA

I.7.1.1 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR

EPIDEMIOLOGÍA:

Una revisión de estudios epidemiológicos globales de lesión traumática de la médula espinal en las 2 últimas décadas evidencia una alta tasa de mortalidad en los países en vías de desarrollo (hasta 17x millón considerando una incidencia de 29.7 x millón), el sexo masculino y la edad entre 30 a 50 años son factores de riesgo.³⁹

La incidencia de lesiones cervicales se ha incrementado a través del tiempo mucho más que las lesiones torácicas y lumbares, hasta un 56.5% de los casos entre 2000 y 2003, las personas con tetraplejía incompleta conformaron el número más elevado (34.5%), seguido por la paraplejía completa (23.1%), tetraplejía completa (18.4%), y paraplejía incompleta (17.5%)⁵²

I.7.1.2 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR

ETIOLOGÍA:

Impresionaba un cambio en la etiología de la lesión medular entre el año 2000 al 2003 con respecto a los años 1973 y 1979 donde comúnmente la causa eran los accidentes en vehículos motorizados, viéndose posteriormente un aumento en las causadas por caídas, quedando en tercer y cuarto lugar por deporte y violencia respectivamente⁵², sin embargo en una última revisión se determinó que los accidentes de tránsito son la causa principal de lesión en países desarrollados observándose en 35 a 53.8 % de los casos, mientras que las caídas son la causa principal en países en vías de desarrollo, alcanzando hasta el 77.4% de los casos.³⁹

I.7.1.3 LESIÓN TRAUMÁTICA MEDULAR

FISIOPATOLOGÍA:

Entender la fisiopatología de la lesión medular, es entender la fases por la que transcurre el proceso de lesión desde la naturaleza de la agresión tisular misma hasta los procesos bioquímicos que se desencadenan de manera secundaria aumentando la afectación tisular y funcional, de allí que se habla del lesiones primarias y secundarias ⁵³⁻⁵⁴

LESIÓN PRIMARIA:

La lesión medular primaria resulta de una variedad de formas de aplicación o tensión mecánica sobre la médula espinal, siendo estas por ubicación: a) lesiones de las estructuras circundantes a la médula espinal (traumatismos de la columna vertebral), b) lesiones de la vascularización arterial o venosa c) trauma aislado directo a la médula espinal. ⁵⁵

Las lesiones primarias se presentan por fuerzas como la de flexión, extensión, carga axial, rotación y distracción ⁵⁶ conllevando a una forma leve de contusión medular con déficits neurológicos transitorios, con o sin daño vertebral y sin cambios patológicos demostrables, gran parte se recuperan dentro de las primeras 24 a 48 horas ⁵⁷⁻⁵⁸ y en su forma más severa causan una completa y permanente parálisis.

También tener presente que en las lesiones primarias la velocidad de la contusión tiene un efecto directo sobre la magnitud de lesión en la sustancia blanca y en la cantidad de daño neuronal en la sustancia gris. ⁵⁹

LESIÓN SECUNDARIA:

Es un conjunto de procesos correlacionados que se presentan secundarios a la lesión de la médula espinal ^{55, 56, 60, 61} como son las alteraciones en la perfusión microvascular, generación de radicales libres y peroxidación lipídica,

muerte celular por necrosis y apoptosis y alteraciones en la homeóstasis iónica.⁵⁵ Todos estos mecanismos pueden exacerbar el daño primario limitando el proceso de restauración, contribuyendo en conjunto a la morbi-mortalidad.⁶²

Alteraciones vasculares: Con diversos sistemas angiográficos se ha determinado los efectos vasculares sistémicos y locales de la lesión medular, los efectos sistémicos incluyen la hipotensión y reducción del gasto cardiaco; los efectos locales incluyen la pérdida de autorregulación en el segmento dañado de la médula espinal, una marcada reducción de la microcirculación en la sustancia gris y blanca, especialmente en regiones hemorrágicas y en zonas adyacentes.⁵³

Tator C.⁶³ plantea que los efectos vasculares locales y sistémicos son la principal causa que lleva a la isquemia y por consecuencia infarto post-traumático de la medula espinal.

Se ha determinado una mayor sensibilidad de la sustancia gris a la isquemia a comparación de la sustancia blanca, esto es debido al sistema arterial sulcal (central) cuya irrigación es centrífuga suministrando de esta manera mayor irrigación a toda la materia gris anterior, la mitad anterior de la materia gris posterior, aproximadamente la mitad interna de las columnas blancas anteriores y laterales, y la mitad anterior de las columnas blancas posteriores.⁶⁴

Radicales libres y peroxidación lipídica: La formación de radicales oxígeno (superóxido, radicales en hidroxilo y el óxido nítrico) y la peroxidación lipídica son procesos bioquímicos que aparecen subsecuente al traumatismo del sistema nervioso central, muy ligados a la hipoperfusión, edema, falla en la conducción axonal, falla en el metabolismo energético y la degeneración anterógrada (Wallerina)⁶⁵ El ambiente de una célula isquémica favorece la generación de radicales de oxígeno y la catálisis de las reacciones de peroxidación lipídica⁶⁶

Un oxidante importante es el peroxinitrito, formado por la combinación de óxido nítrico y radical superóxido⁶⁷, su descomposición da origen al dióxido

de nitrógeno, al radical hidroxilo y al radical carbonato, que son altamente reactivos, pueden oxidar proteínas, nitrato de residuos de tirosina⁶⁸, inducen la peroxidación lipídica de la membrana celular⁶⁹ y las roturas del DNA de una sola cadena⁷⁰. El peroxinitrito disrumpe la respiración mitocondrial la cual altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular contribuyendo a la degradación de las proteínas del citoesqueleto axonal por enzimas como las calpainas.⁷¹⁻⁷²

El uso de antioxidantes farmacológicos interrumpe la degeneración secundaria del tejido nervioso, lo que muestra un aporte significativo de los radicales libres y la peroxidación lipídica en la fisiopatología de este traumatismo⁷³

Excitotoxicidad y desequilibrios electrolíticos: La Excitotoxicidad se refiere al efecto dañino celular por exceso de estimulación de receptores del glutamato⁷⁴, este último alcanza niveles tóxicos 15 minutos después de producida la lesión en modelos experimentales⁷⁵. La activación del receptor ionotrópico N-metil- D-aspartato (NMDA) permite que el calcio extracelular (y el sodio) se desplacen contra-gradiente conllevando a una concentración masiva en la célula, donde están las concentraciones citosólicas del calcio normalmente bajas y bien controladas, pudiendo accionar la salida del calcio intracelular almacenado en el compartimiento citoplásmico⁷⁶. La elevada concentración del calcio dentro del citosol y de las mitocondrias puede accionar una multiplicidad de procesos calcio-dependientes que resulta mortal⁷⁷⁻⁷⁸. Éstos procesos incluyen la activación de enzimas líticas, como la calpaina, fosfolipasa A2 y lipooxigenasa; la generación de radicales libres y de la disrupción de la fosforilación oxidativa mitocondrial que lleva a la muerte apoptótica de la célula.

Muerte neuronal por apoptosis y necrosis: La muerte neuronal por necrosis y apoptosis son dos procesos que se presentan después de la lesión medular, mientras la apoptosis es la muerte celular programada, donde se desarrolla un sistema dependiente de energía por el cual la misma célula activa enzimas como la caspasa que actúa sobre las proteínas del citoesqueleto y las

nucleares, en cambio la muerte por necrosis es producto de la pérdida de mecanismos homeostáticos de la célula, llevando al daño de la membrana y organelos, con pérdida de producción del ATP.^{56,79-80}

Los oligodendrocitos particularmente son vulnerables a la muerte celular apoptótica y después de ello puede incluso comenzar a expresar receptores tales como fas y p75, que cuando están estimulados inician el proceso apoptótico⁸¹, la muerte de estos oligodendrocitos puede dar lugar a la desmielinización de axones, contribuyendo a la pérdida distal de la función neurológica.

Respuesta inflamatoria e inmunológica: La respuesta inflamatoria e inmunológica posterior a la lesión medular implica componentes celulares, tales como neutrófilos, macrófagos y células T así como componentes no celulares, tales como citoquinas, prostaglandinas, etc.⁵⁶

Al dañarse la barrera hemato-encefálica, hay infiltración de neutrófilos que secretan enzimas líticas y citoquinas,⁸² así como monocitos/macrófagos y microglías activadas que fagocitan el tejido dañado.⁸³ Las citoquinas pueden inducir la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX 2) que actúa sobre el ácido araquidónico produciendo prostanoideos proinflamatorios (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) que median permeabilidad/resistencia vascular y agregación /adherencia plaquetaria.⁸⁴⁻⁸⁵

La prostaciclina I2 (PGI2) tiene características vasodilatadoras que promueven la permeabilidad vascular y edema en los sitios de la inflamación, mientras que el tromboxano A2 tiende a agravar la trombosis venosa y la isquemia al promover la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.⁵⁶ El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en diversos estudios experimentales ha demostrado efectos neurotóxicos⁸⁶⁻⁸⁷ y neuroprotectores.⁸⁸⁻⁸⁹

La interleukina-10 (IL-10) producido por leucocitos, macrófagos, astrocitos y la microglia ha demostrado tener un efecto neuroprotector después

de la lesión experimental de la médula espinal, posiblemente induciendo genes antiapoptóticos.⁹⁰⁻⁹¹

I.7.1.4 MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LESIÓN MEDULAR

Existen numerosas maneras de inducir lesión experimental de la médula espinal, básicamente tales lesiones se pueden clasificar en dos categorías amplias: in vivo e in vitro⁹², dentro del primero lo dividiríamos en los generados por productos químicos y por medios físicos⁹³

IN VIVO:

PRODUCTOS QUÍMICOS: Lesiones químicas incluyen la administración de sustancias por vía sistémica o por la inyección local en la médula espinal. Las lesiones químicas inducen un daño del tejido nervioso similar o idéntico al trauma físico.⁹³

Epinefrina: Bergman y Murray utilizaron una dosis de 0.3-0.75 mg inyectados en la región sacrolumbar de un conejo induciendo daño neuronal específico, esto consiste en cromatolisis con la fragmentación de gránulos de Nissl, contracción de las neuronas del cuerno posterior y anterior así como degeneración de la mielina en las columnas posteriores.⁹⁴

Noradrenalina: Osterholm et al⁹⁵ utilizaron una dosis de 35 µg de noradrenalina (NA) en un volumen 10 µl inyectado en la sustancia gris de gatos induciendo hemorragia central en dos horas acompañado de edema de la sustancia blanca y gris. Kakari et al⁹⁶ utilizaron la misma concentración de NA inyectado en la médula espinal en gatos produciendo hinchazón axonal acompañada de edema y necrosis hemorrágica en la sustancia gris y blanca dando por resultado déficits neurológicos significativo.

Cloruro de calcio: Balentine et al ⁹⁷ utilizaron 1 ml del cloruro de calcio (CaCl₂) en una solución al 10% con el pH ajustado a 7.4, induce una mielopatía en ratas. Al examen histológico de la médula espinal a las 4-8 horas de la exposición al CaCl₂ se presenta edema extracelular en la parte dorsal y posterior de las columnas laterales con espongirosis y necrosis del tejido local en el área dorsal del cuerno posterior de la sustancia gris. Después de 24 horas, el espongirosis se había extendido en la columna postero lateral y anterior de la sustancia blanca mientras que el área de necrosis se extiende de los cuernos posteriores al área antero-laterales del cuerno ventral de la sustancia gris y en algunos casos, la materia gris entera. Las alteraciones quísticas fueron observadas en el final de una semana en presencia de una gran cantidad de macrófagos aunque la gliosis fue mínima. El mecanismo exacto que induce esta mielopatía química estaría relacionado con la activación de este ión a fosfolipasas o a un efecto tóxico específico sobre la membrana celular o de las mitocondrias.

Neurotoxinas adrenérgicas y serotoninérgicas: Nygrm et al ⁹⁸ y Nobin et al ⁹⁹ utilizaron la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) respectivamente, en cantidades de 50-200 µg mostrando una predilección para destruir las neuronas y axones adrenérgicos y serotoninérgicos cuando está inyectado en la médula espinal. Estas sustancias pueden inducir la axotomía química selectiva, que es útil porque proporciona la información en un sistema particular de transmisión distinguiéndolo del daño de otros trayectos vecinos.

MEDIOS FÍSICOS: Diversas investigación han planteado modelos de lesión medular usando medios físicos que se han mejorado en el tiempo, como son los siguientes:

Modelos compresivos y/o de contusión: En estos modelos actúan la fuerza cinética y dinámica proporcionando una contusión y compresión rápida

en un tiempo limitado, así como la fuerza estática si la compresión de la médula se da en horas o días.⁹²

Allen R.¹⁰⁰ en 1911 describió por primera vez el modelo de lesión medular por contusión, donde dejó caer un peso sobre la medula espinal de un perro, expuesta por laminectomía. Albin et al.¹⁰¹⁻¹⁰³ y White et al.¹⁰⁴ utilizaron el modelo de contusión en primates para determinar la terapia hipotérmica en la lesión medular, a través de este modelo Goodman et al.¹⁰⁵ y Bresnahan et al.¹⁰⁶, describen los cambios histopatológicos, Ducker et al.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ y Tator y Deecke¹⁰⁹ la patología vascular, Koblinc et al.¹¹⁰⁻¹¹⁴ y Tator et al.^{109,115} el flujo de sangre, Singer et al.¹¹⁶, los potenciales evocados, Daniell et al.¹¹⁷ utilizaron transductores de fuerza para cuantificar el impacto sobre la médula espinal de un primate, entre otros múltiples investigadores.

Gruner JA. et al.¹¹⁸ modificó el método de Allen adaptándolo a roedores, siendo posteriormente éste utilizado en múltiples estudios. La universidad de Nueva York propuso el “NYU Impactor” posteriormente toma el nombre de NYU/ MASCIS, debido a que National Institutes of Health (NIH) en el año 1993 financió el Estudio Multicéntrico de Lesión Medular en Animales (MASCIS) en un grupo de ocho laboratorios de lesión espinal, con el objetivo de validar y para estandarizar el modelo “impactor”.¹¹⁹

También se desarrollaron otros modelos de compresión a través del uso de objetos como parafina inyectada en el espacio epidural por Ayer JB.¹²⁰, introducción de un dedo por Mcveigh, J.F.¹²¹, con mango del escalpelo por Thompson J.E.¹²², con cera del hueso por Craig W.M.¹²³, clampaje con Kocher por Fontaine et al.¹²⁴ y fórceps del pulgar por Harvey y Srebnik¹²⁵.

Rivlin y Tator¹²⁶ describieron un modelo agudo de lesión medular en ratas usando un clip de aneurisma modificado. Este modelo fue adoptado por varios investigadores por ser confiable y económico como Khan y Griebel¹²⁷ y Guha et al.¹²⁸

Tarlov et al ¹²⁹ introducen la técnica del balón insuflable de compresión extradural en perros, la duración de la compresión podía estar exactamente controlada y regulada, posteriormente Hansebout et al ¹³⁰ utilizaron un balón que tenía una localización más exacta. Este método simula compresión de la médula espinal humana por una dislocación no reducida o una fractura-dislocación de la espina dorsal. En el pasado, esta técnica requirió el uso de animales grandes, el reciente desarrollo de balones insuflables más pequeños ha permitido estudiar animales más pequeños que son más fácilmente disponibles.¹³¹ Martin y Bloedel ¹³² utilizaron un balón de Fogarty para producir la lesión medular en gatos y evaluar la lesión espinal por potenciales evocados corticales. Khan y Griebel ¹³³ reproducen con éxito el trauma medular en ratas usando un catéter arterial de embolectomía de Fogarty modelo 12-062-2F, el cuál se podría insuflar con una cantidad conocida de gas y permitía la compresión de la medula de forma controlada y regulada. Baydin A. et al ¹³⁴ establece un modelo experimental en conejos con la insuflación epidural de un microbalón, usando un dispositivo volumen-controlado de la presión y la insuflación; los potenciales evocados espinales (SEPT) fueron registrados en todos los conejos pre-lesión y post-lesión, demostrando la caída al nivel básico en la ultima medición, además se acompañó de paraplejía permanente de los animales.

Sant'Anna da Costa et al ¹³⁵ establecen un nuevo modelo de lesión medular usando un dispositivo "SC-STRAPPER" este dispositivo consiste en una correa de la medula espinal, promoviendo una lesión gradual y controlada. Se analizaron los cambios histopatológicos, la inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrosa glial (GFAP). Las lesiones de la medula espinal fueron asociadas a déficits motor y a un aumento local de GFAP proporcional a la severidad de la compresión.

Modelos de transección y/o sección parcial: Mientras que los modelos de la contusión y/o compresión de la medula espinal pueden ofrecer similar características con la patología vista en los pacientes humanos, los modelos experimentales de la transección y/o sección parcial carecen mucho de esas

semejanzas. Desafortunadamente los estudios realizados de esta manera no son aplicables a las condiciones humanas.⁹²

Modelos vasculares: Estos modelos surgen en vista de que pacientes post-operados de aorta presentan obstrucción de las ramas descendentes de aorta torácica, llevando a los diversos grados de paraplejía acompañado por la espasticidad y rigidez. En modelos de ratas como Lu, K. et al.¹³⁶ y Cizkova, D. et al.¹³⁷ se utilizó el catéter de Fogarty, el que se inserta por la aorta torácica descendente a nivel de la arteria subclavia. La presión arterial se monitoriza a través de una cánula insertada en la arteria de la cola y el daño isquémico se inicia con el balón insuflado por 10 minutos. La hipovolemia concurrente es inducida por retiro de un volumen significativo de sangre. Posterior a la isquemia, el volumen de la sangre es reinfundido, se manifiesta la paraplejía y espasticidad.

Benton, R.L. et al.¹³⁸ y Hughes, P.M. et al.¹³⁹ utilizan otro modelo de lesión isquémica de la médula espinal como es la endothelin-1, un vasoconstrictor.

IN VITRO: Los estudios in vitro surgieron en vista de la dificultad de investigar los aspectos específicos de la fisiopatología de lesión medular in vivo, al darse este en un proceso altamente dinámico y complejo. Los modelos in vitro basados en cultivos de oligodendrocitos, astrocitos o microglías pueden reducir esta complejidad, investigando las actividades e interacciones de célula-célula, muy importante en la comprensión de la lesión secundaria.⁹²

Krassioukov et al.¹⁴⁰ desarrolló un modelo in vitro de neurotrauma usando cultivo organotípico de una porción de médula espinal de ratones adultos. Modificaron los métodos previamente descritos en médula espinal murina. La viabilidad de cultivos organotípicos fue determinada observando el crecimiento de neuritas y usando la tinción tetrazolium (MTT) para células vivas. La integridad morfológica general de los cultivos fue examinada histológicamente por hematoxilina eosina (H& E) y con Luxol fast blue (LFB) para la mielina.

Los marcadores neuronales y glial fueron utilizados para identificar las neuronas, astrocitos y oligodendroglías. Lesión primaria fue generado con un peso de 0.2 g. La muerte celular después de lesión primaria fue cuantificada a las 24, 48 y 72 horas post-lesión usando microscopio con focal y un software de análisis de imagen.

I.7.1.5 ¿POR QUÉ LA MÉDULA ESPINAL DESPUÉS DE UNA LESIÓN NO TIENE O TIENE POCA CAPACIDAD REGENERADORA?

Para desarrollar las estrategias de tratamiento en lesión medular, es obviamente importante aclarar los mecanismos subyacentes en cuanto a por qué la médula espinal después de una lesión no tiene o tiene poca capacidad regeneradora. Estos mecanismos podrían resultar en la cicatriz glial, las moléculas inhibitorias de mielina y los factores derivados de la matriz extracelular.¹⁴¹

Cicatriz glial: La cicatriz glial consiste predominantemente en astrocitos reactivos, microglia/macrófagos y moléculas extracelulares de la matriz, especialmente proteoglicanos condroitina sulfato (CSPGs).¹⁴²⁻¹⁴⁴ CSPGs es una familia compleja de macromoléculas que consisten en una base proteína y uno o más enlaces covalentes de cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Éstas cadenas de polisacáridos pueden variar en su el número y la composición, experimentando modificaciones extensas que modulan su actividad biológica. CSPGs se conoce principalmente por sus efectos de inhibir el crecimiento, el mismo es secretado por casi todos los tipos celulares en sitio de lesión (especialmente astrocitos).¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ La inhibición del crecimiento por parte de la cicatriz glial se considera el mayor obstáculo para la regeneración

Actualmente se ha planteado que la cicatriz glial cumple un doble efecto, tanto perjudicial como beneficio debido a su acción en diferentes fases de la fisiopatología de lesión medular.¹⁴⁷ Los CSPGs han demostrado inducir la retracción de las neuritas y el colapso del cono de crecimiento in vitro.¹⁴⁸ Los astrocitos reactivos, producen NG2 (también conocido como CSPG4) en la

cicatriz glial, inhibiendo el crecimiento axonal.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ Los astrocitos también controlan el exceso de glutamato, de potasio y otros iones. Las CSPGs secretados en el área de lesión, crea una barrera de difusión para las moléculas que son potencialmente dañinas para el tejido¹⁵¹ de tal modo que atenúa la extensión de neurotoxicidad.¹⁵² Los astrocitos proporcionan soporte trófico en el tejido dañado.¹⁵³⁻¹⁵⁴ Algunos estudios sugieren que las células de vástago de los nervios son realmente un tipo especializado de astrocitos.¹⁵⁵⁻¹⁵⁶ Varios proteoglicanos, especialmente CSPGs, se conoce que afecta a las células vástago de los nervios¹⁵⁷, en su supervivencia y maduración.¹⁵⁸

Moléculas inhibitorias de mielina: El primer inhibidor del crecimiento de neuritas del CNS descubierto fue una fracción de proteína inhibitoria de mielina¹⁵⁹, ahora conocida como Nogo-A. El Nogo-A inhibe el crecimiento de neuritas *in vitro*.¹⁶⁰⁻¹⁶² Aunque hay estudios en ratones que generan controversias¹⁶³, existe una abundante evidencia que esta molécula es un potente inhibidor crecimiento de neuritas¹⁶⁴⁻¹⁶⁵ Otros inhibidores asociados a mielina identificados incluyen el MAG¹⁶⁶ (glicoproteína asociada a mielina) y OMgp (glicoproteína de mielina del oligodendrocito).¹⁶⁷

Moléculas derivadas de la matriz extracelular: Existen otras moléculas que contribuyen al retardo del crecimiento axonal, como es la proteína semaforina 3 (SEMA3), que actúa como quimiorepelente directo, tiene alta afinidad por el receptor neuropilin 1.¹⁶⁸ Después de una lesión en la médula espinal¹⁶⁹⁻¹⁷¹, se incrementa la expresión de SEMA3 en los fibroblastos que penetran profundamente en la lesión y hay un incremento de la expresión de neuropilin 1 en neuronas que se proyectan al sitio de lesión. La regeneración axonal fue excluido en las áreas dañadas que contenían SEMA3, esencialmente en el centro de la lesión. Estos resultados indican que las semaforinas impiden la penetración de las neuritas de regeneración más allá del centro de la lesión que contiene fibroblasto.

La ephrin-B2¹⁷² y su receptor EPHB2 están implicados en inhibición de la regeneración después de la transección de la médula espinal. Durante el

desarrollo normal, esta unión ligando-receptor tiene papel en la migración celular y dirección del axón. La interacción de estos dos llega a ser importante después de lesión, cuando se incrementa la expresión de ephrin-B2 en astrocitos y se incrementa la expresión EPHB2 en fibroblastos, creando bandas de fibroblastos y astrocitos, la estructura celular de cicatriz glial/mesenquimal.

Las proteínas Slit, son reguladores importantes de la migración celular y dirección axonal¹⁷³, se incrementan junto a los receptores glipican1¹⁷⁴, en astrocitos reactivos después de injuria.¹⁷⁵ Los trabajos de investigación al respecto han demostrado que las proteínas Slit están implicadas en falta de regeneración.

I.7.1.6 ¿POR QUÉ LOS ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DE LESIÓN MEDULAR EN ANIMALES NO DA LOS MISMOS RESULTADOS EN HUMANOS?

Este probablemente sea el cuestionamiento permanente de los investigadores, por lo que se abordará desde dos enfoques: la diferencia en el tamaño y la anatomía comparada.

Diferencias del tamaño: La importancia de la diferencia del tamaño entre modelos animales de lesión medular y seres humanos se refleja en las distancias sobre las cuales los axones son requerido regenerarse después de la lesión.²⁸ Esto puede afectar las comparaciones entre los estudios de la regeneración en roedores versus primates, especialmente con lesiones cervicales y las torácicas. La diferencia de las especies en peso, tamaño, anatomía, deambulación, podría afectar las redes del sistema nervioso y la musculatura asociada.²⁹ Además la locomoción en roedores es cuadrúpeda a diferencia de la bípeda en los primates, característica similar a los seres humanos.³⁰

Neuroanatomía comparada: La vía corticoespinal (CST) en humanos y primates no humanos ha experimentado cambios evolutivos importantes relacionados con desarrollo de las capacidades motoras, especialmente en la

musculatura distal.³¹⁻³³ El origen cortical de los axones de CST y su localización en la médula espinal varían entre las especies, con mayor énfasis en las proyecciones de las áreas cortical motoras del lóbulo frontal en primates.³⁴ En roedores, la mayoría de los axones del CST están localizados en la parte ventral del cordón posterior con proyecciones principalmente a las neuronas del cuerno posterior y circuitos espinales premotores.³⁵ Las proyecciones más complejas del CST en primates no humanos implican proyecciones directas e indirectas en redes en el cuerno ventral; sinapsis de algunos axones directamente en los motoneuronas que inervan los músculos de la mano³²⁻³³ una proyección aún más pronunciado en los seres humanos.³⁶⁻³⁷ Por tanto la respuesta motora al estímulo del CST entre los primates y los roedores es diferente³⁸, así como es diferente entre especies de primates.³⁴

I.8 ANTECEDENTES:

La lesión de la médula espinal tiene gran impacto físico y psíquico en los pacientes y sus familias. Es conocido el déficit motor y sensorial debajo del sitio de lesión y aunque los déficits pueden disminuir algo debido a los mecanismos reparativos incipientes, la mayoría de pacientes sigue teniendo los problemas neurológicos para el resto de sus vidas.

El progreso reciente en estrategias experimentales para reparar la médula espinal dañada ha vertido la nueva luz en los mecanismos posibles para mejorar el resultado después de la lesión medular. De hecho, el potencial uso de las células de vástago, antagonistas de proteínas inhibitorias de mielina, polietileno glicol y varias formas de trasplante (células de Schwann, células envoltantes de bulbo olfatorio, nervios periféricos, tejido espinal fetal, etc.)²²⁻²⁷ hasta el uso de sustancias enzimáticas como la tripsina, hialuronidasa, elastasa, desoxirribonucleasas, plasmina y condritinasa ABC (ChABC) todos han llevado a resultados prometedores dentro el campo del trauma de la médula espinal¹⁵⁻¹⁹.

Freeman LW¹⁵ en los años 60 demuestra la utilidad del uso de la tripsina, cuando es aplicada en el espacio subaracnoideo, de perros con lesión medular

completa y hemisección, resultando en 30 de los 42 perros estudiados una recuperación funcional buena a excelente, así mismo de los 4 perros que recibieron dosis adicional de tripsina modificada por vía intramuscular, 2 presentaron buena recuperación y uno excelente. Había una correlación entre la clínica y los hallazgos histopatológicos, en controles o animales tratados sin éxito, la cicatriz del conectivo-tejido era extensa y ocupaba la mayor parte de la circunferencia de la médula espinal, por el contrario, en animales tratados enzimáticamente con la buena función había poco tejido conectivo.

Perkins LC, Solow E y Freeman LW¹⁶ en 1970 publican el efecto de la aplicación subaracnoidea de la combinación de desoxirribonucleasas y fibrinolisisina en unguento, en perros hembra con lesión medular, demostrando una reducción en la formación de la cicatriz glial y las cavidades intraespinales.

Matinian L.A y Andreasian A.S.¹⁷ en mayo de 1976, en Ohio presentaron su estudio sobre efecto de tres enzimas hialuronidasa, tripsina y elastasa sobre la lesión medular. Las restitución funcional fueron encontradas en un alto porcentaje de las ratas espinales tratadas enzimáticamente, variando a partir de 33% en los de terapia con hialuronidasa a 80% en los que recibieron tripsina y 92.5% de los que recibieron tripsina seguido por elastasa. Los animales tratados enzimáticamente vivieron más tiempo que los no tratados; un máximo de 290 días en los de tripsina ; 340 días en elastasa y 448 días en tripsina seguido por elastasa, a comparación de 275 días para las ratas espinales no tratadas. Los experimentos electrofisiológicos demostraron la conducción del nervio impulsos a través del sitio de la lesión de ratas tratadas enzimáticamente en direcciones caudales y rostrales. Los estudios histológicos con tinciones de plata revelaron no solamente una reducción en la densidad de la cicatriz y pocas cavidades en la médula espinal tratado enzimáticamente sino también fibras nerviosas que atravesaron la región de transección.

En las últimas dos décadas ha existido interés en el uso de enzimas que actúen específicamente sobre el proteiglicano condroitina sulfato, favoreciendo la plasticidad neuronal, como es el caso de la condritinasa ABC (ChABC).¹⁸⁻¹⁹

El proteoglicano condroitina sulfato es sintetizado por las neuronas y las células gliales de la sustancia gris y blanca de la medula espinal ¹⁷⁶ y es el principal constituyente inhibitorio de la cicatriz glial que caracteriza las lesiones del sistema nervioso central (SNC). ¹⁷⁶⁻¹⁸¹ La aplicación in vivo de la ChABC en roedores con lesión medular ha demostrado regeneración axonal funcional ¹⁸²⁻¹⁸⁵, así como brotes axonales. ¹⁸⁶⁻¹⁸⁷

El presente estudio busca utilizar un conjunto de enzimas procedente de mamífero, como es la pancreatina (P3292-SIGMA ALDRICH), en cuyos componentes se incluye a varias de las enzimas estudiadas anteriormente, asociado a las enzimas con acción de carbohidrasa y lipolítica podrían tener un mayor espectro de acción sobre los sustratos que componen la cicatriz glial favoreciendo de esta manera la reconexión axonal, en la actualidad no hay estudios publicados al respecto.

I.9 HIPOTESIS:

H₀: La aplicación de pancreatina no puede degrada la cicatriz glial y promover la regeneración neuronal en lesión medular experimental.

H₁: La aplicación de pancreatina puede degradar la cicatriz glial y promover la regeneración neuronal en lesión medular experimental.

CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODO

II.1 TIPO DE ESTUDIO:

El presente trabajo es un estudio experimental, debido a que el investigador interviene a voluntad en una o algunas variables del fenómeno estudiado, dentro de una relación causa-defecto.²⁰⁷ Es del tipo experimental verdadero porque se aplicaran tres procedimientos como son: aleatorización, medición basal y grupo control.

II.2 MATERIAL BIOLÓGICO:

ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN:

Conejos Nueva Zelandia (n=12): Clasificación científica (**Reino:** Animalia, **Filo:** Chordata, **Subfilo:** Vertebrata , **Superclase:** Tetrapoda, **Clase:** Mammalia, **Subclase:** Theria, **Infraclase:** Placentalia, **Orden:** Lagomorpha, **Familia:** Leporidae, **Género:** Oryctolagus, **Especie:** O. cuniculus)

Fundamento: En el presente estudio se utilizó lagomorfos porque desde el punto de vista evolutivo la vía corticoespinal presenta un desarrollo diferente al de roedores, animales habituales para investigación, aproximándose más a la ubicación anatomía del segmento medular tóraco-lumbar del humano adquirido en la bipedestación.²⁹

Desde el punto de vista biomecánico, la deambulación de los conejos se centra en los miembros posteriores muy desarrollados muscularmente, de allí su uso para fabricar biomateriales ortopédicos²⁰⁸, esto es vital para este tipo de estudio ya que nos permite no confundir los desplazamientos como se dan en los roedores, gatos o perros utilizados en estudios experimentales, donde el desplazamiento puede ser por arrastre de los miembros anteriores.

El número de animales que se utilizó se determinó poniendo en prioridad los aspectos éticos y biológicos pasando a segundo plano los aspectos estadísticos; en los aspecto éticos utilizar el mínimo número necesario de

animales por grupo, en el aspecto biológico la fisiopatología de la lesión medular es semejante en el mismo reino *Animalia* de un *Oryctolagus cuniculus* que en un *Homo sapiens* y de allí la posibilidad de una extrapolación futura.

Sexo “Macho”:

Fundamento: Lo ideal es tratar de controlar las variables intervinientes en la neurogénesis. Hay estudios en los que se ha visto que el sexo hembra, por el estrógeno y la progesterona presentan efectos neuroprotectores²⁰⁹⁻²¹⁰, de allí que no es el sexo ideal para este tipo de estudio, sin embargo hay que reconocer que en otros estudios se cuestiona el efecto hormonal.²¹¹⁻²¹³

Edad de 8 -9 meses con peso aproximado 3500 - 4000 g:

Fundamento: Considerando que las lesiones medulares traumáticas se presentan entre los 30-50 años de edad³⁹, etapa en la vida en que se alcanza la plenitud del desarrollo biológico, se realizó la siguiente analogía: La edad promedio ideal del animal de experimentación para reproducir el modelo de lesión medular debía ser con desarrollo biológico pleno y por lo tanto neuronal. En los conejos machos la madures se alcanza +/- 7 meses de edad²¹⁴, etapa en la que se culmina la pubertad. El peso del animal de experimentación tiene una relación directa con su edad si se mantiene una alimentación balanceada, por ejemplo un conejo a los 6 años de edad podría llegar a los 15 kilos.

Sin enfermedad:

Fundamento: El animal de experimentación debe ser un animal en óptimas condiciones, en buen estado de salud, sin enfermedad, de lo contrario sería una variable interviniente que afectaría el resultado final del estudio. Fueron adquiridos en la Facultad de medicina veterinaria de la UNMSM, donde cumplen los criterios estándares de cuidado.

Ciclo luz /oscuridad 12 horas:

Fundamento: Se respetó el ciclo de luz y oscuridad de 12 horas durante todo el estudio²⁰⁸ considerando el ritmo circadiano del animal²¹⁵, para ello se

diseñó un temporizador de 12 horas (**Ver anexo 1**) que se adaptó al Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM.

La luz tenía una distancia de más de dos metros con respecto a los animal de experimentación teniendo en cuenta que los animales albinos de Nueva Zelanda pueden presentar degeneración retiniana si están muy cerca a la fuente a de luz.²¹⁵ Si durante la iluminación el animal de experimentación deseaba oscuridad podía aprovechar el ambiente enriquecido de la jaula.

Temperatura del microambiente “Promedio 18 °C”:

Fundamento: La temperatura recomendada para los conejos es un promedio 18 °C con un rango de 15-22 °C²⁰⁸ Se evitó rangos extremos como una temperatura mayor de 28 °C que genera efectos clínicos en el animal, incluso puede poner en riesgo su vida.²¹⁶ Este fin se logró a través de la diseñación de un termostato que reguló 4 calefactores (**Ver anexo 2**) , con prendido y apagado automático en caso de exceder la temperatura establecida dentro del rango, fue adaptado al Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM.

Ventilación del microambiente “extractor de aire”:

Fundamento: La ventilación es necesaria considerando la acumulación de amonio, de CO₂, los cambios de pelaje, etc.²⁰⁸ Para este fin se utilizó un extractor de aire (**Ver anexo 3**) adaptado en la parte superior del Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM, considerando el sentido del flujo de aire por densidad, así mismo los bordes del ambiente fueron adaptados de forma roma para este fin.

Alojamiento “Jaula + ambiente enriquecido”:

Fundamento: El alojamiento del conejo tuvo dimensiones respecto a su peso, en este caso por estar entre 3.5-4.0 Kg. se recomienda una área del piso por animal de 0.2787 m² con una altura de 35.56 cm²¹⁵, pero al añadir el ambiente enriquecido las dimensiones fueron mayores, en este caso de 0.7569 m² con altura de 78cm (**Ver anexo 4**), el ambiente enriquecido consistió de un estante, para que los conejos salten por encima o se oculten por debajo, de esta manera se reduce la intranquilidad, nerviosismo y timidez a la captura.²¹⁷ La jaula tuvo

un solo conejo varón adulto debido a que existe agresividad entre los machos de esta edad ²¹⁸, por otro lado el ambiente enriquecido (**Ver anexo 5**) compensó la falta de compañía del animal.²⁰⁸

El 25% de las caras laterales de la jaula fue constituido de una ventana con barras de hierro galvanizado, permitiendo observar el medio que los rodea. La ventana con barras de hierro fue pintada de color blanco, de forma que el color claro no estimula irritabilidad o tensión como lo hacen los colores oscuros.

La parte inferior de la jaula tuvo una malla de hierro galvanizado, permitiendo el paso de heces y orina para que los animales no tengan contacto con los mismos, evitando de esta forma la coprofagia.

La limpieza de las jaulas se realizó diariamente para mantener un alto nivel de higiene. Se ha descrito riesgo de infección por coccidios cuando no se realizar una limpieza constante.²⁰⁸

Alimentación y agua:

Fundamento: Los conejos son crepusculares, se alimentan durante la madrugada y en la noche. ²¹⁹ Recibieron alimentación balanceada en grasa, fibras, proteínas, minerales y vitaminas, conocido comercialmente como **Conejita R**, en peso de 100 - 150 g/día.²²⁰

El aporte de agua para la mayoría de estudios es *ad limitum*, pero es conocido que la necesidad del agua es 50-150 g /Kg peso, o por regla empírica que la necesidad de agua/24h es 10% del peso corporal ²²¹, criterios que fueron tomados en cuenta en el estudio.

II.3 MATERIAL FARMACOLÓGICO, QUÍMICO Y/O DE INSTRUMENTACIÓN:

El material farmacológico y/o químico que a continuación se menciona fue en función de las etapas que involucra el estudio.

Primera etapa:

1. **Pancreatina (Pancreatin from porcine páncreas, power 4 x USP specifications, SIGMA-ALDRICH, P3292):** Conjunto de enzimas pancreáticas como son la tripsina, la amilasa, la lipasa, la ribonucleasa y otras proteasas.¹⁸⁸

2. **Solución de Bradford:** Se preparó con 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250, disuelto en 50 ml de etanol del 95%. A esta solución fueron agregados 100 ml de ácido fosfórico del 85% (peso/volumen). La solución resultante fue diluida a un volumen final de 1 litro.²²²
3. **Proteína estándar:** Albúmina de suero bovino (BSA 0,1%)²²²
4. **Solvente para cromatografía de aminoácidos:** Butanol, ácido acético glacial y agua en la proporción: 4:1:5, por volumen.²²³
5. **Medio de revelado para cromatografía de aminoácidos:** Se utilizó solución de ninhidrina, se disolvió 200 mg de ninhidrina en 100 ml de acetona.
6. **Solvente para carbohidratos:** Butanol (40%), etanol (10%) y agua (50%)²²⁴
7. **Medio de revelado para cromatografía de carbohidratos:** Ftalato ácido de anilina en butanol 2,0 %²²⁵
8. **Solución estándar para carbohidratos:** Xilosa.
9. **Cromatoplaque silicagel G60 F254 (Merck) con medidas 20 x 20 cm**
10. **Papel Whatman N°1 de 28 x 10 cm.**
11. **Cubeta de cromatografía (frasco de vidrio)**
12. **Capilares**
13. **Estufa**
14. **Espectrofotómetro GENESYS 6, número de serie 2M6M040001**

Segunda etapa:

1. **Instrumento para inducción de lesión medular:** Tornillos de acero inoxidable de 3mm de diámetro y 4mm de longitud.
2. **Anestésicos y analgésicos:**
 - a) **Ketamina:** Ket-a-100.100mg / 1cc (Agrovet Market S.A.)
 - b) **Clorhidrato de xylazina:** Dormi-xyl ® 2. Solución al 2% de xylazina HCl (Agrovet Market S.A.)
 - c) **Metamizol sódico monohidratado:** Novalgina 1g / 2cc (Sanofi-Aventis del Perú S.A.)
3. **Antibióticos:**
 - a) **Enrofloxacino:** Enroflox 20 L.A. Solución inyectable (Agrovet Market S.A.)

4. Afeitadora eléctrica (GT 500, ALLOY)

II.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

El presente estudio se desarrolló en dos etapas: la primera, con una demostración de la acción degradativa de la cicatriz glial por la pancreatina a través de un método bioquímico y el segundo con la aplicación de la pancreatina en un modelo in vivo de lesión medular, evaluándose parámetros clínicos, radiológicos e histopatológicos.

II.4.1 Primera etapa:

Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina

Considerando la presencia de proteoglicanos en la composición de la cicatriz glial se realizó la determinación de la degradación de proteínas, la presencia de aminoácidos así como de azúcares (principalmente xilosa) después de la aplicación de pancreatina.

La determinación de proteínas se realizó a través del método espectrofotométrico de Bradford²²², la presencia de aminoácidos fue por cromatografía de capa fina en sílica gel²²³ y la determinación de azúcares específicamente xilosa fue a través de cromatografía en papel.^{224, 225}

Inducida la lesión medular experimental en conejos Nueva Zelanda (n=5) por método de Hashimoto²²⁸, descrito más adelante, se espera la formación de cicatriz glial (7 a 10 días). Se extrae la médula de manera rápida por abordaje posterior y se secciona la zona de cicatriz glial, una vez pesada esta, se realiza un homogenizado frío en 3,8 ml de tampón fosfato 0,1M pH 6,7. Se coloca en tubos de ensayo en baño de agua a 39+/-2 °C durante 5 minutos, se inicia la reacción agregando 5, 10 y 15 mg de pancreatina diluida en 1,2 ml de tampón fosfato 0,1M pH 6,7. A los tiempos 0, 30, 60, 120 y 240 minutos de iniciada la reacción enzimática se toma 100 µL (muestra experimental) para proceder al método de Bradford²²² para determinación de proteínas; al de cromatografía de capa fina en sílica gel para la presencia de aminoácidos²²³ y al de cromatografía en papel para la determinación de azúcares específicamente xilosa.^{224, 225} Se tuvo para cada uno de los tiempos una muestra control.

A) Método de Bradford para determinación de proteínas:²²²

Se elaboró una curva estándar o patrón con albúmina de suero bovino (BSA 0,1%) disuelta en tampón fosfato 0,1M pH 6,7. Se tomó con una micropipeta alícuotas de 12,5, 25, 50,75 y 100 μ L, con diferentes puntas de ependorff se completaron todos los volúmenes hasta 100 μ L con tampón fosfato 0,1M pH 6,7, se adicionaron a los tubos 5ml de solución de Bradford y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm. Se tomó 100 μ L de la muestra experimental y se adicionaron 5ml de solución de Bradford y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm. Se tubo para cada uno de los tiempos una muestra control y una muestra de pancreatina sola (este último valor fue un criterio desarrollado debido a que la pancreatina *per se* proporciona un ligero aumento en la medición de la concentración de proteínas) **(Ver anexo 6)**

B) Método cromatográfico de capa fina en silica gel para determinar la presencia de aminoácidos:

Se marcó en la placa de silica gel, la línea base con lápiz y los puntos donde se colocaron la muestra experimental, control y pancreatina sola, identificándolos con una marca. Se colocó en cada marca respectiva 100 μ L de cada uno, se secó con aire caliente. Previo a esta preparación, se colocó 30 ml del solvente (Butanol, ácido acético glacial y agua en la proporción: 4:1:5, por volumen) sobre la cuba de cromatografía y se dejó que se sature ésta con el disolvente. Una vez saturada se colocó la placa de silica gel dentro de la cuba y se dejó que se desarrolle el cromatograma. Una vez desarrollado se marcó el frente del solvente con lápiz. Se secó en una estufa sin sobrecalentar. Una vez seco la placa se asperjó con solución de ninhidrina y se calentó en una estufa para desarrollar color. Se localizó y comparó las manchas de color morado, que representan las posiciones de los aminoácidos que reaccionaron con la ninhidrina así como su intensidad. **(Ver anexo 7)**

C) Método cromatográfico en papel para la determinación de azúcares específicamente xilosa:

Se marcó en el papel, la línea base con lápiz y los puntos donde se colocaron la muestra experimental, control y estándar (xilosa), identificándolos con una marca. Se colocó en cada marca respectiva 100 μ L de cada uno, se secó con aire caliente. Previo a esta preparación, se colocó 30 ml del solvente (Butanol (40%), etanol (10%) y agua (50%)) sobre la cuba de cromatografía y se deja que se sature ésta con el disolvente. Una vez saturada se colocó el papel dentro de la cuba y se dejó que se desarrolle el cromatograma. Una vez desarrollado se marcó el frente del solvente con lápiz. Se secó en una estufa sin sobrecalentar. Una vez seco la placa se asperjó con solución de ftalato ácido de anilina en butanol 2,0 % y se calentó en una estufa para desarrollar color. Se localizó y comparó las manchas de color rojo, que representan la posición de las de pentosas (xilosa) que reaccionaron, así como su intensidad. **(Ver anexo 8)**

II.4.2 Segunda etapa:

Grupos experimentales: Una vez inducida la lesión medular por método de Hashimoto, los conejos *Nueva Zelandia* (n=12) fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos:

Grupo enzima (n=6): Los conejos *Nueva Zelandia* después de 2 meses de producida la lesión medular recibieron tratamiento enzimático con pancreatina en tampón fosfato 0,1M y pH 6,7 vía intratecal por 21 días. Se realizó un seguimiento clínico hasta finalizar el estudio.

Grupo control (n=6): Los conejos *Nueva Zelandia* después de 2 meses de producida la lesión medular no recibieron tratamiento enzimático con pancreatina, solo recibieron el mismo volumen de tampón fosfato 0,1M y pH 6,7 vía intratecal por 21 días. Se realizó un seguimiento clínico hasta finalizar el estudio.

Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):²²⁶

Los conejos fueron anestesiados con ketamina (35 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg). La mitad posterior inferior fue rasurada con afeitadora eléctrica (GT 500, ALLOY). Se administró una dosis preoperatoria de Enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo). El conejo fue ubicado en la mesa de operaciones sobre la parte ventral con leve flexión lumbar colocando una pequeña toalla debajo del abdomen. Se llegó a mantener una vía periférica permeable. La frecuencia cardíaca (RN: 130-320 lpm), frecuencia respiratoria (RN: 30-60 rpm) y la temperatura rectal (RN: 38.5-39.5 °C) fueron supervisadas. La temperatura fue mantenida entre 37-38 °C con un cojín de calefacción. El área toracolumbar fue limpiada con solución jabonosa y luego con solución de yodopovidona (Droyovet DROGAVET S.A.C.). El área quirúrgica se cubrió con campos quirúrgicos para mantener condiciones asépticas. El área quirúrgica se cubrió con gasas estériles. La cirugía se realizó con ayuda de una lupa de 10X. Una incisión de la piel por la línea media de T11a T13. La fascia fue cortada bilateralmente en el borde lateral de los procesos espinosos. Los músculos paraespinales fueron disecados subperiostealmente en el proceso espinoso y laminar de T12. Un pequeño agujero fue realizado en el centro de la superficie disecada de la vértebra. Un tornillo del acero inoxidable de diámetro 3 milímetros y 4 milímetros de longitud fue implantada en el agujero sobre la duramadre. Se tomó una radiografía de perfil o de incidencia lateral y postero anterior, para tener la certeza de haber ocupado el 90% del canal medular. El tornillo se retiró luego de 60 minutos y fue suturada la incisión. Una inyección intramuscular adicional de Enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo) se administró a las 24 horas postoperatorio. Metamizol a dosis de 10mg/k fue administrado en las patas delanteras cada 12 horas en los posteriores 3 días y se aumentó su frecuencia si el animal lo necesitó. **(Ver anexo 9)**

Método radiológico para colocación de tornillo: Colocado el tornillo de acero inoxidable se tomó una radiografía de perfil o de incidencia lateral y postero

anterior. Se consideró una colocación adecuada cuando el tornillo ocupó el 90% del canal medular, según la investigación de T. Hashimoto y N. Fukuda²²⁸ al ocuparse el 90% del canal se genera una lesión medular con puntaje neurológico moderado a severo. La técnica radiográfica fue de 48 kilovoltios y de 100 miliamperajes. **(Ver anexo 10)**

Método de colocación de catéter para aplicación de pancreatina en lesión medular:

Los conejos después de 2 meses de la primera operación fueron anestesiados con ketamina (35 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg). La mitad posterior inferior fue rasurada con afeitadora eléctrica (GT 500, ALLOY). Se administró una dosis preoperatoria de Enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo). El conejo fue ubicado en la mesa de operaciones sobre la parte ventral con leve flexión lumbar colocando una pequeña toalla debajo del abdomen. Se llegó a mantener una vía periférica permeable. La frecuencia cardiaca (RN: 130-320 lpm), frecuencia respiratoria (RN: 30-60 rpm) y la temperatura rectal (RN: 38.5-39.5 °C) fueron supervisadas. La temperatura fue mantenida entre 37-38°C con un cojín de calefacción. El área toracolumbar fue limpiada con solución jabonosa y luego con solución de yodopovidona (Droyovet DROGAVET S.A.C.). El área quirúrgica se cubrió con campos quirúrgicos para mantener condiciones asépticas. El área quirúrgica se cubrió con gasas estériles. La cirugía se realizó con ayuda de una lupa de 10X. Una incisión de la piel por la línea media de T10 a L1. Se retiró el tejido fibroso, se visualizó el agujero realizado en el centro de la superficie disecada de la vertebra. Identificada la cicatriz glial, se fijó un catéter en dicha zona lo que permitió la administración periódica de la pancreatina, luego se suturó la incisión. Una inyección intramuscular adicional de Enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo) se administró a las 24 horas postoperatorio. Metamizol a dosis de 10mg/k fue administrado en las patas delanteras cada 12 horas en los posteriores 3 días y se aumentó su frecuencia si el animal lo necesitó. **(Ver anexo 11)**

Cuidados postoperatorio:

Todos los conejos pasaron a una jaula de recuperación. Se realizó diariamente un vaciado manual de vejiga mediante presión, cada 8 horas hasta que se desarrolló reflejo de vaciado autónomo (10 días aproximadamente). El vaciado de vejiga se redujo paulatinamente hasta una vez al día y se mantuvo así hasta finalizado el estudio.²⁰¹ También se colocaron cojines en zonas de prominencia ósea para prevenir úlceras de presión (**Ver anexo 12**).²²⁷

Fisioterapia:²²⁸

Con el fin de retrasar la aparición de atrofia muscular, evitar deformaciones, mantener las articulaciones en buena forma, y prevenir contracturas en las mismas, se realizó masajes circulares suaves y lentos en todos los músculos situados por debajo del nivel de la lesión en todas los conejos (grupo control y grupo enzima) todos los días. Además, los masajes ayudaron a mantener la circulación sanguínea tanto en los músculos como en la piel, evitando así posibles atrofias. También se realizó movimientos diarios de flexión y extensión de los dedos, tobillos, rodillas y caderas, adducción y abducción de la cadera y movimientos circulares de la cadera y tobillo en las dos direcciones (treinta veces en cada articulación). Además de esto, se dejó a los conejos moverse libremente en un campo abierto sobre una malla durante 20 minutos cada día. (**Ver anexo 13**)

Evaluación de lesión medular:

Evaluación clínica: La evaluación clínica se llevó a cabo posterior a la inducción de la lesión medular así como cada semana durante la aplicación enzimática. Cada prueba clínica tuvo consideraciones para su adaptación en conejos (**Ver anexo 14**).

Escala BBB modificado:¹⁹¹⁻¹⁹²

Escala diseñado por Basso D, Beattie M y Bresnahan J. en 1995, esta escala de evaluación locomotora ofrece a los investigadores una mayor medida discriminatoria de los resultados del comportamiento para evaluar tratamientos después de la lesión medular. Se consideró las modificaciones del campo realizada por Yoshii S, Ito S, Shima M,

Taniguchi A y Akagi M en conejos, se evaluó por 4 minutos a través de tres observadores cegados (no conocen el grupo al que pertenece el animal a evaluar) y una cámara filmadora (4to observador). Antes de la prueba, se vació las vejigas puesto que el movimiento de las patas traseras a veces va acompañado de la contracción espontánea de la vejiga.

Clasificación de la escala locomotora BBB (21 puntos) y la definición operacional de categorías y atributos:

0. Movimientos no observables de la extremidad posterior (EP)
 1. Movimiento leve de 1 o 2 articulaciones, usualmente la cadera y/o rodilla.
 2. Movimiento extenso de 1 articulación o movimiento extenso de una articulación y movimiento leve de otra articulación.
 3. Movimiento extenso de 2 articulaciones.
 4. Movimiento leve de las tres articulaciones de la extremidad posterior.
 5. Movimiento leve de 2 articulaciones y movimiento extensión de la tercera.
 6. Movimiento extensión de 2 articulación y movimiento leve de la tercera.
 7. Movimiento extensión de las tres articulaciones de la extremidad posterior.
 8. Barrido sin soporte de peso o empleo plantar de la pata sin soporte de peso.
 9. Empleo plantar de la pata con soporte de peso en una única postura (ejemplo parado) o el peso ocasional, frecuente o constante soportado por dorsal stepping o no plantar stepping.
 10. Peso ocasionalmente soportado por pasos plantares, no coordinación por extremidad anterior (EA) – extremidad posterior (EP).
 11. Soporte frecuente de los pasos plantares con peso constante, sin coordinación EA – EP.

12. Frecuente soporte de los pasos plantares con el peso constante y ocasional coordinación EA- EP.
13. Frecuente soporte de los pasos plantares con el peso constante y frecuente coordinación EA – EP.
14. Peso constante soportado por pasos plantares, constante coordinación de la EA- EP y la posición predominante de la pata durante la locomoción es rotada (interna o externa) cuando se realiza el contacto inicial con la superficie así como justo antes de levantarla al final de la posición o frecuente plantar stepping, constante coordinación EA – EP y ocasional dorsal stepping.
15. Constante plantar stepping y constante coordinación de la EA – EP, y sin espacio(altura) de los dedos del pie u ocasional espacio(altura) de los dedos del pie durante el avance hacia adelante del miembro, predominantemente la posición de la pata es en paralelo al cuerpo al inicio del contacto
16. Constante plantar stepping y constante coordinación de la EA – EP durante la marcha y el espacio (altura) de los dedos del pie ocurre frecuentemente durante el avance hacia adelante del miembro, la posición de la pata es predominantemente en paralelo al inicio del contacto y rota al levantar
17. Constante plantar stepping y constante coordinación del EA – EP durante la marcha y el espacio (altura) de los dedos del pie ocurre frecuentemente durante el avance hacia adelante del miembro, la posición de la pata predominantemente es en paralelo al contacto inicial y al levantar
18. Constante plantar stepping y constante coordinación del EA – AP durante la marcha y el espacio (altura) de los dedos del pie ocurre durante el avance hacia adelante del miembro, predominantemente la posición pata esta en paralelo al inicio del contacto y rota al levantar.
19. Constante plantar stepping y coordinación constante del EA – EP durante la marcha, y constante espacio(altura) de los dedos del pie durante el avance hacia adelante del miembro y la cola esta abajo parte o todo el tiempo

20. Constante plantar stepping y marcha coordinada; espacio (altura) de los dedos del pie constante, posición predominante de la pata es en paralelo al contacto inicial y al levantar; constante cola arriba e inestabilidad del tronco.

21. Constante plantar stepping y marcha coordinada, espacio (altura) de los dedos del pie constante, la posición de la pata predominante es en paralelo a lo largo de la postura, la estabilidad del tronco es constante, la cola arriba constante.

Leve: Movimiento parcial de la articulación a través de menos de la mitad del rango del movimiento articular

Extensión: Movimiento a través de más de la mitad del rango del movimiento articular.

Barrido: Movimiento rítmico de extremidad posterior (EP) en las cuales las tres articulaciones están extendidas, a continuación, nuevamente se flexionan y extienden totalmente; usualmente el animal esta en decúbito lateral, la superficie plantar de la pata puede o no estar en contacto con el suelo; sin soporte de peso evidente en la EP.

Sin soporte de peso: Sin contracción de los músculos extensores de los EP durante el empleo plantar de la pata; o sin la elevación de la región posterior

Soporte de peso: Contracción de los músculos extensores de la EP durante el empleo plantar de la pata o la elevación de la región posterior.

Plantar stepping: La pata está en contacto plantar con soporte de peso entonces la EP avanza hacia adelante y el contacto plantar con apoyo del peso se reestablece

Dorsal stepping: El peso soportado a través de la superficie dorsal de la pata en algún punto del ciclo del paso.

Coordinación de la extremidad posterior y anterior: Por cada paso de la EA, un paso de la EP es tomado y la Extremidades posteriores se alternan.

Ocasional: Menor o igual de la mitad, $\leq 50\%$

Frecuente: Mas que la mitad pero no siempre 51-94%

Constante: Casi siempre o siempre 95-100%

Inestabilidad del tronco: Desplazamiento lateral del peso que causa contoneos de lado a lado o un colapso parcial del tronco.

Escala Tarlov modificado: ¹⁹³⁻¹⁹⁵

Esta escala considera 6 niveles, ha sido aplicada en conejos en las investigaciones de Shi E. et al, donde considera los siguientes niveles:

- 0: No movimiento
- 1: Movimiento leve
- 2: Se sientan con ayuda
- 3: Se sientan solo
- 4: Salto débil
- 5: Salto normal

Prueba de campo abierto: ¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

Esta prueba limita un área acorde al tamaño del animal de experimentación, rodeado de madera pintada de blanco, con la parte inferior subdividida por las líneas blancas, formando 25 campos. Se registró el número de campos cruzados por las patas delanteras, en un tiempo de 5 minutos por 3 días sucesivos. La prueba comenzaba colocando al conejo en el centro del área. El número de campos cruzado durante este intervalo fue registrado y no expresado en porcentajes como el trabajo original, sino más bien mantenidos para establecer la mínima diferencia existente en el tiempo de evaluación. Inmediatamente después de cada prueba, se limpió la parte inferior con gasas de algodón mojados con etanol al 96%. Se consideró dos observadores cegados (no conocen el grupo al que pertenece el animal a evaluar) y una cámara filmadora (3er observador).

Prueba de plano inclinado: ²⁰⁰⁻²⁰¹

El plano inclinado diseñado por Rivlin A.S. y Tator C.H. en 1977, consiste en dos tableros rectangulares de maderas contrachapadas conectadas en un extremo por una bisagra. Uno de los tableros sirve como la base y el otro como el plano inclinado movable. Dos paneles

laterales de madera contrachapada fija en la base con la marca de los grados. Una estera de caucho se fijó a la superficie del plano movable. Para la evaluación clínica los conejos fueron colocados en la posición que el eje del cuerpo sea perpendicular al eje del plano inclinado. Para mantenerse en el plano los animales utilizaron los miembros delanteros y traseros. La inclinación máxima del plano en que el conejo pudo mantenerse por 5 segundos se registró para representar la capacidad funcional. El ángulo fue aumentado en intervalos de 5° o disminuido en 5° hasta que el conejo pudo mantener su posición respecto al plano inclinado por 5 segundos sin caer.

Prueba de levantamiento (medida postural):²⁰²⁻²⁰³

El conejo fue colocado en un cilindro de vidrio de base hexagonal (modificado con respecto al cilindro de plexiglás original), el animal se alzaba espontáneamente sobre sus patas traseras y sus patas delanteras entraban en contacto con las paredes. El número y los tipos de alzamientos sobre las patas traseras fueron analizados durante un período de 3 minutos de observación. Diversos tipos de alzamientos se observaron, de manera progresiva hasta un nivel más alto: 1) Agachados: Los animales levantaban ambas patas delanteras de la tierra pero no extienden el tronco; 2) Trípode: Los animales levantaban ambas patas delanteras de la tierra y se apoyan con la cola; 3) Patas traseras: Los animales se alzaban y extendían el tronco con los miembros posteriores doblados y 4) De soporte: Los animales se alzaban con el tronco extendido y los miembros posteriores extendidos. Cuando el animal progresaba de vez en cuando en varios tipos de alzamientos antes de aterrizar, se contaba el nivel más alto. Los datos fueron expresados como número de alzamientos/minuto y porcentaje de alzamientos funcionales (número de alzamientos sobre patas traseras “3” y de soporte “4”/total de alzamientos).

Evaluación radiológica para aplicación de enzima:²⁰⁴

La imagen de resonancia magnética (MRI) fue realizada a los 2 meses de inducida la lesión medular, usando un scanner magnético a 0.2 Tesla. Se seleccionó aleatoriamente un conejo el cual fue colocado en posición ventral previa anestesia general. La mayor obtención de las imágenes fue a un intervalo de 5.0 milímetros con un grueso de corte de 5.0 milímetros. Las imágenes de la región espinal fueron obtenidas en los planos sagital y coronal. El tiempo de repetición (TR) y el tiempo de eco (TE) fueron ajustados según trabajo previos. La imagen potenciada en T1 (TR/TE = 540/26 milisegundo, T1W) e imagen potenciada en T2 (TR/TE = 380/90 milisegundo, T2W) fueron obtenidas. Estas imágenes fueron llevadas a un software analizador de imagen (J MicroVision Versión 1.2.7) con el cual se determinó el volumen de la cicatriz glial y consecuentemente los miligramos de cicatriz glial, dato necesario para precisar los miligramos de pancreatina a administrar. **(Ver anexo 15)**

Evaluación histopatológica: ²⁰⁵⁻²⁰⁶

Al final del estudio para determinar los cambios histopatológicos, los conejos fueron anestesiados con ketamina (35 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg), se les administró por vía transcardiaca solución de NaCl 0,9% en volumen de 500 ml seguido del fijador (15 % paraformaldehído en buffer fosfato 0.1 M) en volumen 500 ml a una presión de perfusión de 120 cm H₂O, hasta observar la rigidez corporal. Se extrajo la médula de manera rápida por abordaje posterior. **(Ver anexo 16)** Los tejidos fueron de manera rutinaria procesados, embebido y seccionados de 5 a 7 μ m, según tinción. Las secciones sagitales fueron preparadas en **Hematoxilina y eosina (H& E)** para determinar la formación de cavidades, tinción de **Reumond** para determinar proyecciones axonales y astrocitos, el **Luxol fast blue** para identificar la mielina, la tinción de **Tricrómico de Gomorri** para determinar tejido conectivo y también **inmunohistoquímica GPAF** para identificación de astrocitos. Las imágenes tomadas fueron llevadas al software analizador de imagen (J Micro Vision Versión 1.2.7), para precisar la formación de cavidades expresada en área (mm²) y porcentaje, el contenido de tejido conectivo expresado en porcentaje, área mielinizada expresada en porcentaje y presencia de astrocitos expresada en porcentaje. Las imágenes sobre presencia de neurogénesis no fueron sometidas

al software. Todos estos análisis fueron realizados en el epicentro de la médula espinal dañada. **(Ver anexo 17)**

II.5 PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS:

Los datos fueron ingresados a una hoja de cálculo en MS-EXCEL 2000 (Microsoft Corp. Seattle, WA), para ser procesados luego mediante el programa estadístico SPSS V18.0. Se empezó con un análisis descriptivo expresado en distribución de frecuencias, medidas de tendencia central, medidas de dispersión y variabilidad.

La determinación de la distribución normal de las variables cuantitativas se realizó aplicando el test de corrección Shapiro-Wilk, debido a que el número de conejos fue menor 50. Para la comparación de variables cuyas medias no presentaron una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon y Mann – Whitney. Se consideró para el estudio un nivel de confiabilidad de 95%.

II.6 ÉTICA:

En el aspecto ético, según la Ley Peruana N °27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio, en el Título IV, de la experimentación e investigación y la docencia, se permite la experimentación para el estudio y el avance de la ciencia, cuando el mismo resulte necesario para el tratamiento de enfermedades que afecte tanto al hombre como a los animales y siempre que no se afecte la naturaleza del experimento o investigación, se establecerán procedimientos para mitigar el sufrimiento del animal.²²⁹

Con respecto al manejo de los animales de experimentación desde alimentación, micro y macro ambiente, procedimientos quirúrgicos, manejo del dolor se ha considerado **“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”**.²⁰

El presente estudio consideró también las directrices de **“Guidelines on the use of animals for training interventional medical practitioners and demonstrating medical equipment and techniques, 2009”**, en los aspectos 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3 y 1.3.4, especificando el apoyo de un médico veterinario facultativo, la competencia en

anestesia y analgesia de animales así como las facilidades de la Clínica veterinaria UNMSM para procedimientos quirúrgicos.²³⁰

CAPITULO III: RESULTADOS

III.1 PRIMERA ETAPA:

Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina

Considerando la presencia de proteoglicanos en la composición de la cicatriz glial se realizó la determinación de la degradación de proteínas y la presencia de aminoácidos así como de azúcares (principalmente xilosa) después de la aplicación de pancreatina.

La determinación de proteínas se realizó a través del método espectrofotométrico de Bradford y la presencia de aminoácidos fue por cromatografía de capa fina en sílica gel; la determinación de azúcares específicamente xilosa fue a través de cromatografía en papel.

El método de Bradford nos muestra que en 40 mg. de cicatriz glial homogenizada tenemos 0,604 mg de proteínas/ ml de solución, este homogenizado al ser sometido a la acción de 5mg, 10mg y 15mg de pancreatina en un tiempo de 4 horas a temperatura de 39 ± 2 °C y a pH neutro, se obtiene 0,231 mg, 0,238mg y 0,269mg de proteínas/ml respectivamente, la mayor degradación se obtiene con 5mg de pancreatina, alcanzando una reducción de 61,75% con respecto a la concentración inicial, en el segundo caso fue de 60,59% y de 55,62% en el tercero. Además en el cromatograma se observa una mayor cantidad de bandas de aminoácidos en el que recibe pancreatina de 5mg con respecto a 10 y 15mg, este dato nos orientó hacia la utilización de 5mg de pancreatina para la presente investigación.

Con respecto a la determinación de azúcares por cromatografía, se enfatiza en la xilosa debido a su presencia en la cadena de proteoglicanos por ser uno de los componentes de importancia en la cicatriz glial. En el cromatograma se observa la presencia de xilosa color rojo cuya banda se encuentra al mismo nivel con respecto al estándar y que no se visualiza en el control. **(Ver anexo 6)**

III.2 SEGUNDA ETAPA:

A) Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):

Antes de la distribución aleatoria de los animales para la conformación de los grupos se realizó la evaluación clínica previa a la lesión y luego después de dos meses de la misma. Se consideró el pequeño número de animales y la no distribución normal de la variable de estudio para la aplicación de pruebas comparativas no paramétricas. **(Ver anexo 18)**

La prueba BBB inicial tuvo un puntaje: **20,05 +/- 1,42** y después de los 2 meses de inducida la lesión un puntaje: **8,10 +/- 5,38**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.005, T de Wilcoxon**).

La prueba de Tarlov inicial tuvo un puntaje: **4,87 +/- 0,21** y después de los 2 meses de inducida la lesión un puntaje: **2,80 +/- 1,03**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.005, T de Wilcoxon**).

La prueba de campo inicial tuvo un puntaje: **44,43 +/- 16,83** y después de los 2 meses de inducida la lesión un puntaje: **5,00 +/- 2,46**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.005, T de Wilcoxon**).

La prueba plano inclinado inicial tuvo un puntaje: **61,00 +/- 3,16** y después de los 2 meses de inducida la lesión un puntaje: **44,50 +/- 6,85**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.005, T de Wilcoxon**).

La prueba de levantamiento inicial tuvo un puntaje: **1,9 +/- 2,23** y después de los 2 meses de inducida la lesión un puntaje: **0,00 +/- 0,00**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.017, T de Wilcoxon**).

Así mismo un indicar de daño medular experimental moderado a severo es la variación en el peso de los conejos, siendo inicial de **3285,6 +/- 171,9 mg** y después de los 2 meses de inducida la lesión **2475,0 +/- 123,0 mg**; siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos (**p=0.005, T de Wilcoxon**).

B) Formación de grupos: Para la formación del grupo control (n=5) y enzima (n=5) se consideró solo 10 conejos, a pesar de que en un inicio se operaron 12, esto fue debido a que dos animales fallecieron a los 30 y 45 días posterior a inducir la lesión medular por causa obstructiva intestinal secundaria la daño per se.

Se realizó las pruebas clínicas a los 2 meses de inducida la lesión y se comparó entre ambos grupos. **(Ver anexo 19)**

La prueba BBB a los 2 meses de inducida la lesión en el grupo control tuvo un puntaje: **8,80 +/- 5,26** y el grupo enzima tuvo un puntaje: **7,40 +/- 6,02**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (**p=0.548, U de Mann - Whitney**).

La prueba de Tarlov a los 2 meses de inducida la lesión en el grupo control tuvo un puntaje: **2,80 +/- 1,09** y el grupo enzima tuvo un puntaje: **2,80 +/- 1,09**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (**p=1.000, U de Mann - Whitney**).

La prueba de campo a los 2 meses de inducida la lesión en el grupo control tuvo un puntaje: **4,90 +/- 2,41** y el grupo enzima tuvo un puntaje: **5,10 +/- 2,79**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (**p=0.841, U de Mann - Whitney**).

La prueba de plano inclinado a los 2 meses de inducida la lesión en el grupo control tuvo un puntaje: **43,00 +/- 7,58** y el grupo enzima tuvo un puntaje: **46,00 +/- 6,52**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (**p=0.548, U de Mann - Whitney**).

La prueba de levantamiento a los 2 meses de inducida la lesión en el grupo control tuvo un puntaje: **0,00 +/- 0,00** y el grupo enzima tuvo un puntaje: **0,00 +/- 0,00**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (**p=1.000, U de Mann - Whitney**).

C) Evaluación de regeneración neuronal

Clínica: Las evaluaciones clínicas se realizaron de manera periódica en el día 0 (basal), 7, 14 y 21 de aplicación de pancreatina (grupo enzima) o tampón fosfato (grupo control). (**Ver anexo 20**)

La prueba BBB en el grupo control a los 7 días de evaluación tubo un puntaje de: **8,60 +/- 5,50** , a los 14 días un puntaje de: **6,80 +/- 6,14** y a los 21 días un puntaje de: **4,90 +/- 5,20** , teniendo en el grupo enzima a los 7 días de evaluación un puntaje de: **7,20 +/- 5,76**, a los 14 días un puntaje de: **7,40 +/- 6,02** y a los 21 días un puntaje de: **6,40 +/- 5,32** ; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en los días 7,14 y 21 (**p=0.690, p=0.421 y p=0.548 respectivamente, U de Mann - Whitney**).

La prueba de Tarlov en el grupo control a los 7 días de evaluación tubo un puntaje de: **2,80 +/- 1,10** , a los 14 días un puntaje de: **2,80 +/- 1,10** y a los 21 días un puntaje de: **2,40 +/- 0,54** , teniendo en el grupo enzima a los 7 días de evaluación un puntaje de: **2,80 +/- 1,10**, a los 14 días un puntaje de: **2,80 +/- 1,10** y a los 21 días un puntaje de: **2,80 +/- 0,84** ; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a los días 7,14 y 21 (**p=1.000, p=1.000 y p=0.548 respectivamente, U de Mann - Whitney**).

La prueba de campo en el grupo control a los 7 días de evaluación tubo un puntaje de: **3,53 +/- 1,57**, a los 14 días un puntaje de: **3,53 +/- 1,50** y a los 21 días un puntaje de: **4,06 +/- 3,39**, teniendo en el grupo enzima a los 7 días de evaluación un puntaje de: **4,73 +/- 4,73**, a los 14 días un puntaje de: **3,92 +/- 3,95** y a los 21 días un puntaje de: **4,33 +/- 2,61** ; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a los días 7,14 y 21 (**p=1.000, p=0.841 y p=1.000 respectivamente, U de Mann - Whitney**).

La prueba de plano inclinado en el grupo control a los 7 días de evaluación tubo un puntaje de: **46,00+/-4,18**, a los 14 días un puntaje de: **40,00+/-6,12** y a los 21 días un puntaje de: **37,00+/-9,75** , teniendo en el grupo enzima a los 7 días de evaluación un puntaje de: **41,00+/-4,18**, a los 14 días un puntaje de: **40,00+/-6,12** y a los 21 días un puntaje de: **43,00+/-2,74** ; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a los días 7,14 y 21(**p=0.151, p=1.000 y p=0.421 respectivamente, U de Mann - Whitney**).

La prueba de levantamiento en el grupo control a los 7 días de evaluación tubo un puntaje de: **0,00+/-0,00**, a los 14 días un puntaje de: **0,00+/-0,00** y a los 21 días un puntaje de: **0,00+/-0,00**, teniendo en el grupo enzima a los 7 días de evaluación un puntaje de: **0,00+/-0,00**, a los 14 días un puntaje de: **0,00+/-0,00** y a los 21 días un puntaje de: **0,00+/-0,00**; no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a los días 7,14 y 21(**p=1.000, p=1.000 y p=0.1000 respectivamente, U de Mann - Whitney**). Esta última prueba no ha sido graficada considerando que el puntaje obtenido durante el tiempo de evaluación fue cero.

Histopatología: Los hallazgos histopatológicos se centran en la cicatriz glial, en la formación de cavidades expresada en área (mm²) y porcentaje, el contenido de tejido conectivo expresado en porcentaje, área mielinizada expresada en porcentaje, presencia de astrocitos expresada en porcentaje (**Ver anexo 21**) y presencia de regeneración neuronal. (**Ver anexo 22**)

Formación de cavidades: Se tomó en cuenta las láminas con tinción de Reumond y Hematoxilina y Eosina (H& E). Las imágenes fueron tomadas en aumento 3,2. Llevadas luego al Software J Micro Vision Versión 1.2.7, se consideró en la calibración **1pix= 0,03236 mm**.

En el grupo control las cavidades ocuparon 194,88 +/-86,83 mm², siendo el 20,05+/-10,25 % y en el grupo enzima las cavidades ocuparon 52,60+/-26,50 mm² siendo el 7,63+/-5,23%, habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**p=0.008 y p=0.042 respectivamente, U de Mann - Whitney**).

Contenido de tejido conectivo: Se tomó en cuenta las láminas con tinción de Tricrómico de Gomorri. Las imágenes fueron tomadas en aumento 12,5. Llevadas luego al Software J Micro Vision Versión 1.2.7, se consideró en la calibración **1pix= 0,00765 mm.**

En el grupo control el contenido de tejido conectivo fue 49,85+/-13,31 % y en el grupo enzima el contenido de tejido conectivo fue 41,53+/-16,51%, no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**p=0.222, U de Mann - Whitney**).

Área mielinizada: Se tomó en cuenta las láminas con tinción de Luxol fast blue. Las imágenes fueron tomadas en aumento 12,5. Llevadas luego al Software J Micro Vision Versión 1.2.7, se consideró en la calibración **1pix= 0,00765 mm.**

En el grupo control el área mielinizada fue 9,80+/-4,11 % y en el grupo enzima el área mielinizada fue 8,64+/-6,9%, no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**p=1.000, U de Mann - Whitney**).

Presencia de astrocitos: Se tomó en cuenta las láminas con inmunohistoquímica GPAF. Las imágenes fueron tomadas en aumento 12,5. Llevadas luego al Software J Micro Vision Versión 1.2.7, se consideró en la calibración **1pix= 0,00765 mm.**

En el grupo control la presencia de astrocitos fue 15,18+/-3,90 % y en el grupo enzima la presencia de astrocitos fue 17,63+/-4,33%, no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**p=0.421, U de Mann - Whitney**).

Presencia de regeneración neuronal: La renovación o reparación fisiológica del tejido nervioso dañado, puede ser sólo axonogénesis o axonogénesis y neurogénesis.¹⁹⁰

En el grupo control no se presenta axonogénesis o es muy escasa a comparación del grupo enzima que presenta mayores dimensiones de axonogénesis e incluso con evidencia de neuromas de amputación. En ninguno de los dos grupos hay evidencia de neurogénesis.

CAPITULO IV: DISCUSIONES

IV.1 PRIMERA ETAPA:

Método bioquímico para determinación de acción degradativa de cicatriz glial por pancreatina:

Después de producida la lesión medular se genera en dicha zona la cicatriz glial, dicha cicatriz consiste predominantemente en astrocitos reactivos, microglia/macrófagos y moléculas extracelulares de la matriz, especialmente proteoglicanos de condroitina sulfato (CSPGs).¹⁴²⁻¹⁴⁴ CSPGs es una familia compleja de macromoléculas que consisten en una base proteica unida a glicosaminoglicanos (GAGs) (**Figura 1A**) CSPGs se conoce principalmente por sus efectos de inhibir el crecimiento, el mismo es secretado por casi todos los tipos celulares en sitio de lesión (especialmente astrocitos).¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ La inhibición del crecimiento por parte de la cicatriz glial se considera el mayor obstáculo para la regeneración.

La aplicación de pancreatina como medio para degradar la cicatriz glial enfocado en su matriz de proteoglicanos de condroitina sulfato (CSPGs) principalmente, ha sido demostrada con el uso de 5mg de pancreatina sobre 40mg de cicatriz glial a temperatura de 39±2 °C y pH neutro dando una reducción de hasta 61,75% de su contenido proteico respecto al valor inicial (**Figura 1B, hidrólisis del enlace peptídico, ver flecha roja**), así mismo la presencia de xilosa por cromatografía nos hace referencia a la ruptura de las cadenas laterales de glicosaminoglicanos (**Figura 1B, ver flecha verde**). La pancreatina presenta dos zonas de hidrólisis a nivel del enlace peptídico y glucosídico, a diferencia de la Condrinasa ABC (ChABC), enzima bacteriana de mayor importancia en investigaciones de regeneración en lesión medular, que hiende las cadenas de glicosaminoglicanos (**Figura 1C**), quedando algunas cadenas de carbohidratos unidos al centro proteico²³¹ por lo tanto la pancreatina genera una mayor dimensión degradativa.

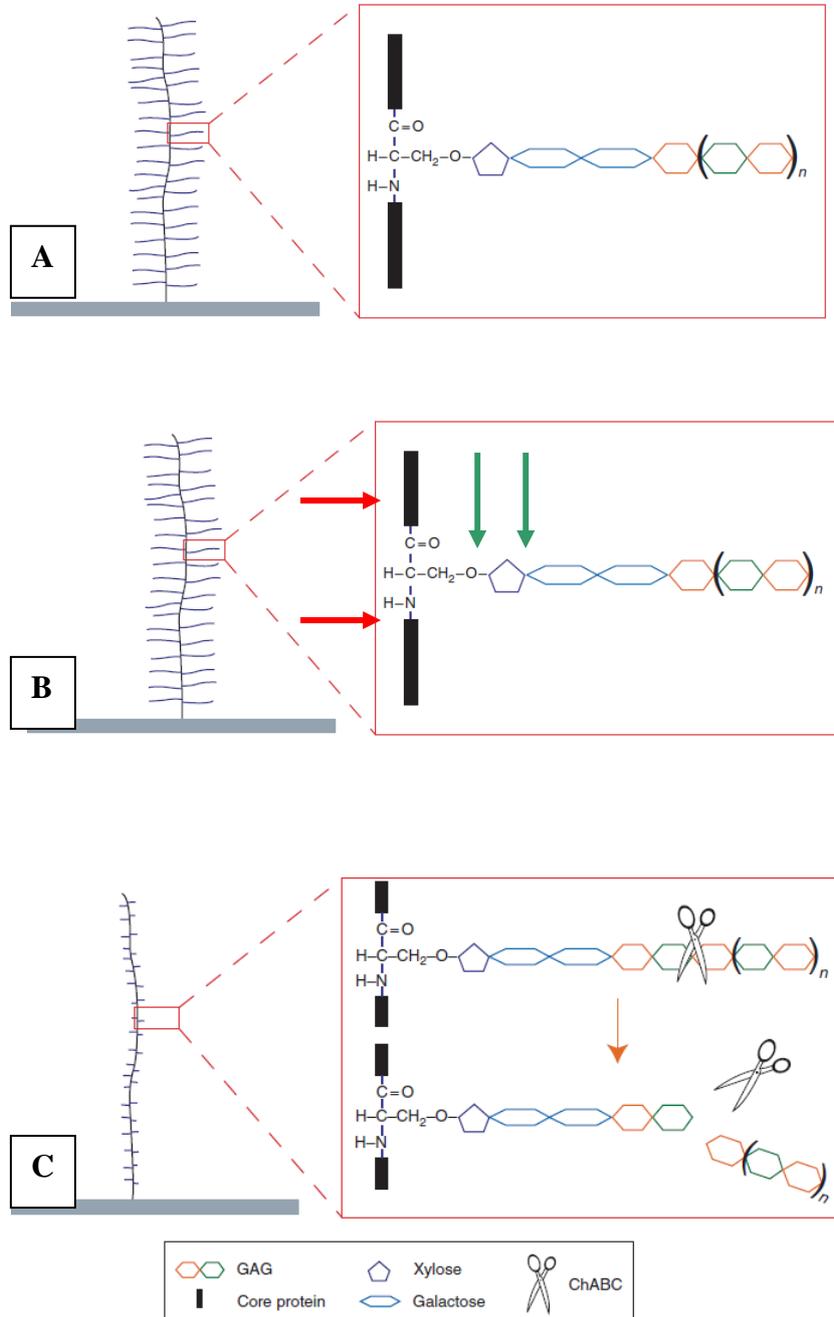


Figura 1. A) Composición del proteoglicanos de condroitina sulfato (CSPGs). CSPGs se anclan a las membranas celulares, al ácido hialurónico y otros componentes de la matriz extracelular (barra gris). B) La pancreatina hidroliza enlaces peptídico (flecha

roja) y glucosídico (flecha verde). C) Condrinitinasa ABC (ChABC), hiende las cadenas de glicosaminoglicanos.

IV.2 SEGUNDA ETAPA:

A) Método de inducción de lesión medular experimental (Método de Hashimoto):

El método de Hashimoto²²⁸ fue diseñado inicialmente en ratas, donde se introduce un tornillo de acero inoxidable de longitud variable (2.5, 2.8, 3.1, o 3.4 milímetros) por un tiempo de 60 minutos, considerando un diámetro del canal medular de 3.5mm en la rata. Se obtuvo un score neurológico severo (puntaje1 de 5) a partir de la introducción de 3.1mm del tornillo, durante los 21 días de seguimiento, lo que corresponde a ocupar el 88, 57 % del canal medular.

La presente investigación estandarizó el método de Hashimoto en conejos *Nueva Zelandia*, a través de tornillos de acero inoxidable introducidos en el canal medular hasta ocupar el 90% del espacio, para esta precisión se procedió a añadir una radiografía de incidencia lateral y postero anterior (modificación al estudio original). Las evaluaciones clínicas como: la prueba BBB, la prueba de TARLOV, la prueba de campo abierto, la prueba de plano inclinado y de levantamientos realizados antes de la lesión comparado con la realizada después de 2 meses de la lesión, muestran una diferencia estadísticamente significativa, correspondiendo un daño moderado a severo a los 2 meses, lo que coincide con el modelo planteado por Hashimoto.

La disminución del peso corporal es un indicador de la magnitud de la lesión medular, ha sido poco abordado en estudios de conejos, sin embargo Landry E. et al,²³² en un estudio de evaluación de cambio en el peso de ratones con lesión medular muestran una disminución del 24% del peso corporal a los 7 días de la lesión manteniéndose hasta los 28 días de seguimiento, estos datos son semejantes a lo encontrado en el presente estudio que fue de una reducción del 24.6% del peso corporal a los 2 meses de la lesión, cabe recalcar que existió una diferencia estadísticamente significativa del peso inicial y el medido a los 2 meses de la lesión.

B) Formación de grupos: El grupo control (n=5) y enzima (n=5) fueron evaluados clínicamente antes de la administración de sustancias (tampón fosfato o pancreatina) con la prueba BBB, la prueba de TARLOV, la prueba de campo abierto, la prueba de

plano inclinado y de levantamientos donde no se obtiene una diferencia estadísticamente significativa entre ambos, este hallazgo es de suma importancia para comprender la homogeneidad de los grupos y evitar sesgo en la consolidación de los mismos antes de la administración de sustancias.

C) Evaluación de regeneración neuronal

Clínica: Las evaluaciones clínicas se realizaron de manera periódica en el día 0 (basal), 7, 14 y 21 de aplicación de pancreatina (grupo enzima) y tampón fosfato (grupo control). Se comparó ambos grupos según día de evaluación no encontrándose diferencia estadísticamente significativa. La mayoría de trabajos publicados ha realizado un seguimiento mayor a un mes de haber iniciado la terapéutica enzimática.

Freeman LW¹⁵ demuestra la utilidad del uso de la tripsina, cuando es aplicada en el espacio subaracnoideo de perros con lesión medular completa y hemisección, resultando en un periodo de evaluación de 2, 3 y más meses que en 30 de los 42 perros estudiados hubo una recuperación funcional buena a excelente, así mismo de los 4 perros que recibieron dosis adicional de tripsina modificada por vía intramuscular, 2 presentaron buena recuperación y uno excelente. De manera similar Perkins LC, Solow E y Freeman LW¹⁶ publican el efecto de la aplicación subaracnoidea de la combinación de desoxirribonucleasas y fibrinolisisina en unguento, en perros hembra con lesión medular, con un seguimiento de 7 meses; Matinian L.A y Andreasian A.S.¹⁷ utilizando tres enzimas hialuronidasa, tripsina y elastasa sobre la lesión medular, logrando una restitución funcional en un alto porcentaje de las ratas espinales tratadas enzimáticamente, variando a partir de 33% en los de terapia con hialuronidasa a 80% en los que recibieron tripsina y 92.5% de los que recibieron tripsina seguido por elastasa. Los animales tratados enzimáticamente vivieron más tiempo que los no tratados; un máximo de 290 días en los de tripsina ; 340 días en elastasa y 448 días en tripsina seguido por elastasa, a comparación de 275 días para las ratas espinales no tratadas.

García-Alías G et al,²³³ demostraron que el tratamiento con Condrinasa ABC en lesión medular promueve la plasticidad de la médula espinal, habiendo una mejoría sustancial en tareas específicas como la recuperación de pelotas en la prueba de la escalera con respecto a su control, siendo estadísticamente significativo a partir del día 21 de seguimiento ($p < 0.05$) hasta el día 42 ($p < 0.001$) donde finaliza el mismo.

Se observa en múltiples estudios una mejoría clínica en meses y desde incluso el día 21 de administración de la enzima, esto es una orientación para determinar la falta de diferencia clínica hasta el momento de finalizar el estudio entre el grupo control y enzima, cabe enfatizar que los trabajos en mención son de lesión medular aguda a diferencia del presente que es en fase crónica (aplicación de enzima después de 2 meses de inducida la lesión) cuya fisiopatología es diferente y probablemente también sea diferente la expresión clínica en cuanto a forma y tiempo.

Histopatología: Los hallazgos histopatológicos se centran en la cicatriz glial, en la formación de cavidades expresada en área (mm²) y porcentaje, el contenido de tejido conectivo expresado en porcentaje, área mielinizada expresada en porcentaje, presencia de astrocitos expresada en porcentaje y presencia de regeneración neuronal.

Formación de cavidades: Se obtuvo en el grupo enzima una menor área de cavidades expresada en mm² y porcentaje con respecto al control siendo esta una diferencia estadísticamente significativa, estos resultados concuerdan con los de Perkins LC, Solow E y Freeman LW¹⁶, donde la cavitación es extremadamente mínima en los perros con lesión medular que recibieron desoxirribonucleasas y fibrinolisisina en unguento con respecto a su control; así también Matinian L.A y Andreasian A.S.¹⁷ utilizando tres enzimas hialuronidasa, tripsina y elastasa sobre la lesión medular de ratas encontraron menores cavidades intraespinales en comparación al grupo control. En fase crónica esta reducción de cavidades podría deberse a que estas fueron ocupadas por tejido conectivo degradado o parcialmente degradado y/o presencia de crecimiento axonal.

Contenido de tejido conectivo: Se obtuvo en el grupo enzima un menor contenido de tejido conectivo con respecto al control no siendo una diferencia estadísticamente significativa. Freeman LW¹⁵ demuestra la utilidad del uso de la tripsina, cuando es aplicada en el espacio subaracnoideo de perros con lesión medular completa y hemisección y encuentra menor cantidad de tejido conectivo en el grupo tripsina con respecto al control; Matthews MA et al²³⁴ encontraron en ratas Long-Evans con lesión medular T5 al aplicar tripsina tópica y sistémica una reducción del tejido fibroso en la cicatriz glial ($p < 0.01$) sin embargo se acompaña de una mayor cantidad de tejido

conectivo laxo. Si consideramos que ambos estudios fueron de varios meses de seguimiento probablemente esta pequeña diferencia no significativa de nuestro estudio sea el inicio de la acción degradativa del tejido conectivo in vivo.

Área mielinizada: Se obtuvo a partir de la zona circundante a la lesión, ya que no se evidenció en la cicatriz glial, entre el grupo control y enzima no hubo una diferencia estadísticamente significativa, esta hallazgo coincide con Matthews MA et al ²³⁴ quienes encontraron en ratas Long-Evans con lesión medular T5 al aplicar tripsina tópica y sistémica paquetes de fibras axonales no mielinizadas en la cicatriz glial.

Presencia de astrocitos: No se obtuvo entre el grupo enzima y control una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de astrocitos, lo que nos indica que la pancreatina no tiene algún efecto directo o indirecto sobre su expresión. Los astrocitos reactivos en el núcleo de la cicatriz glial debería ser abordado como otro foco de acción enzimática por ejemplo fosfolipasas ya que en fase crónica generan un efecto inhibitorio de crecimiento axonal, a diferencia de la fase aguda de lesión donde nutren a neuronas de la penumbra. ²³⁵

Presencia de regeneración neuronal: En el grupo control no se presenta axonogénesis o es muy escasa a comparación del grupo enzima que presenta mayores dimensiones de axonogénesis e incluso con evidencia de neuromas de amputación (El neuroma de amputación se refiere a la formación de neuromas por cada nervio seccionado, el tamaño y forma dependerá del crecimiento axonal y del tejido circundante, es un signo de regeneración). En ninguno de los dos grupos hay evidencia de neurogénesis. Hallazgos que no encontraron Perkins LC, Solow E y Freeman LW ¹⁶ con la aplicación subaracnoidea de la combinación de desoxirribonucleasas y fibrinolisisina en ungüento en perros hembra con lesión medular; Matinian L.A y Andreasian A.S. ¹⁷ en cambio utilizando tres enzimas hialuronidasa, tripsina y elastasa sobre la lesión medular de ratas encontraron fibras nerviosas que atraviesan la región de la sección transversal; Matthews MA et al ²³⁴ encontraron en ratas Long-Evans con lesión medular T5 al aplicar tripsina tópica y sistémica un elevado número de axones y paquetes de fibras axonales no mielinizadas no asociados a células de Schwann. Estos dos últimos estudios coinciden con nuestros resultados donde hay fibras nerviosas que atraviesan la zona de

lesión pero sin mielina, probablemente la pancreatina si bien favorece la axonogénesis degrade la mielina, tema que tendrá que ser evaluada en adelante.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. La aplicación de 5mg de pancreatina sobre 40mg de cicatriz glial a temperatura de 39+/-2°C y pH neutro genera una reducción de hasta 61,75% de su contenido proteico respecto al valor inicial, a través de la hidrólisis de los enlaces peptídico.
2. La aplicación de 5mg de pancreatina sobre 40mg de cicatriz glial a temperatura de 39+/-2°C y pH neutro genera la liberación de carbohidratos especialmente xilosa, a través de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos.
3. El modelo de lesión medular de Hashimoto con score neurológico moderado a severo en conejos *Nueva Zelandia*, se obtiene a través de la introducción del tornillo de acero inoxidable hasta ocupar el 90% del canal medular.
4. Las evaluaciones clínicas realizadas de manera periódica en los días 0 (basal), 7, 14 y 21 de aplicación de pancreatina (grupo enzima) y tampón fosfato (grupo control), no demostraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.
5. Se obtuvo en el grupo enzima una menor área de cavidades expresada en mm² y porcentaje con respecto al control siendo esta una diferencia estadísticamente significativa.
6. Se obtuvo en el grupo enzima un menor contenido de tejido conectivo con respecto al control no siendo una diferencia estadísticamente significativa.
7. No se obtuvo entre el grupo enzima y control una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de astrocitos y área mielinizada.

8. La pancreatina aplicada en la lesión medular experimental promueve la regeneración neuronal del tipo axonogénesis.

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

1. Profundizar en la cinética enzimática de la pancreatina sobre la cicatriz glial y de esa forma optimizar su capacidad degradativa in vivo.
2. Realizar mayores investigaciones que definan con claridad las fases adecuadas para la aplicación enzimática y el uso concomitante con otras estrategias terapéuticas como células madre.

CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima: UNMSM [consultado el 10 de abril de 2010]. Disponible en:
<http://www.unmsm.edu.pe/ogp/ARCHIVOS/ESTATUTO%20DE%20LA%20UNMSM.htm>
2. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Escuela Académico Profesional de Medicina Humana. Lima: UNMSM [consultado el 10 de abril de 2010]. Disponible en: <http://medicina.unmsm.edu.pe/eap/medicina/presentacion.asp>
3. Piña G E. La importancia de la investigación en la formación integral del médico. Rev Fac Med UNAM 1997; 40(2): 70-72
4. Bunge Mario. La investigación científica. México: Siglo XXI editores; 2000
5. Bunge Mario. La ciencia su método y su filosofía. Buenos Aires: Siglo XX editores;1972
6. Loureiro SC, Mancussi e Faro AC, Chaves EC. Quality of life from the viewpoint of patients with spinal cord lesions. Rev Esc Enferm USP.1997; 31(3): 347-67.
7. Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci. 2000: 67-73.
8. Ramón y Cajal S. (1913-1914) Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso, Madrid: Moya. English translation: Degeneration and Regeneration of the Nervous System (trans. and edited Raoul M. May), London: Oxford University Press, 1928. Reprinted and edited with additional translations by DeFelipe, J. and Jones, E. G.: *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, New York: Oxford University Press, 1991.
9. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962; 135: 1127–1128
10. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with

- implications for a morphological theory of memory. *Anat.Rec.* 1963; 145: 573–591
11. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 1965; 124:319–335
 12. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 1966; 126:337–390
 13. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 1966; 128:431–474
 14. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 1969;137: 433–458
 15. Freeman LW, MacDougall J, Turbes CC, Bowman DE. The treatment of experimental lesions of the spinal cord of dogs with trypsin. *J Neurosurg*, 1960; 17: 259–265.
 16. Perkins LC, Solow E, Freeman LW. The effect of enzymatic debridement on scar formation and cavitation in experimental spinal cord transection. *Neurology*, 1970; 20:1185-1187
 17. Pettegrew RK, Windle WF. Factors in Recovery from Spinal Cord Injury Summarized Transactions of a Conference Held May 24-25, 1976, in Granville, Ohio, under the Auspices of Denison University and Help Them Walk Again Foundation. *Experimental Neurology*, 1976; 53:815-829
 18. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2002; 298:1248 –1251.

19. Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:8517– 8522.
20. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press Washington, D.C. 1996
21. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Políticas y Estrategias de Investigación de la UNMSM 2007-2011. . Lima: UNMSM [consultado el 20 de abril de 2010]. Disponible en:
http://vriinvestigacion.unmsm.edu.pe/vicerrectorado/politicas_y_estrategias.pdf
22. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*.1995; 378: 498-501.
23. Cheng H, Cao YH, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*.1996; 273: 510-513.
24. Giovanini MA, Reier PJ, Eskin TA, Wirth E, Anderson D.K. Characteristics of human fetal spinal cord grafts in the adult rat spinal cord: influences of lesion and grafting conditions. *Exp. Neurol*. 1997; 148:523-543.
25. Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci.*, 1998; 18: 3803-3815.
26. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.*, 1999; 5: 1410-1412
27. Shi R, Borgens RB, Blight AR. Functional reconnection of severed mammalian spinal cord axons with polyethylene glycol. *J. Neurotrauma*, 1999; 16: 727-738.
28. Courtine G, Bunge MB, Fawcett JW, Grossman RG, Kaas JH, Lemon R, et al. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nature Medicine* 2007, 13(5), 561-566.
29. Hodgetts SI, Plant GW, Harvey AR. Chapter 14. Spinal Cord Injury: experimental animal models and relation to human therapy. En: Watson Ch, Paxinos G, Kayalioglu G, eds. *The Spinal Cord*. Elsevier; 2009. p 209-237

30. Nakajima K, Mori F, Takasu C, Mori M, Matsuyama K, Mori S Biomechanical constraints in hindlimb joints during the quadrupedal versus bipedal locomotion of *M. fuscata*. *Prog Brain Res* 2004; 143:183-190.
31. Bortoff GA, Strick PL. Corticospinal terminations in two new-world primates: further evidence that corticomotoneuronal connections provide part of the neural substrate for manual dexterity. *J Neurosci* 1993; 13: 5105-5118.
32. Rouiller EM, Moret V, Tanne J, Boussaoud D. Evidence for direct connections between the hand region of the supplementary motor area and cervical motoneurons in the macaque monkey. *Eur J Neurosci* 1996; 8, 1055-1059.
33. Lemon RN, Kirkwood PA, Maier MA, Nakajima K, Nathan P. Direct and indirect pathways for corticospinal control of upper limb motoneurons in the primate. *Prog Brain Res* 2004; 143, 263-279.
34. Nudo RJ, Frost SB. The evolution of motor cortex and motor systems. En: Krubitzer LA, Kaas JH, eds. *Evolution of Nervous Systems in Mammals*. Oxford, UK: Elsevier; 2006.
35. Tracey D. Ascending and descending tracts in the spinal cord. In: Paxinos G ed. *The Rat Nervous System*, 3 ed. Elsevier Academic Press, San Diego. 2004 p.149-64.
36. Kuypers HGJM. Anatomy of the descending pathways. En: Brooks VB, Brookhart JM, Mountcastle VB, eds. *Handbook of physiology*. Bethesda, MD: The American Physiological Society; 1981. p. 597-666.
37. Heffner RS, Masterton RB. The role of the corticospinal tract in the evolution of human digital dexterity. *Brain Behav Evol* 1983; 23, 165-183.
38. Lemon RN, Griffiths J. Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve* 2005; 32, 261-279.
39. Chiu Wen-Ta, Lin Hsiao-Chiao, Lam C, Chu Shu-Fen, Chiang Yung-Hsiao, Tsai Shin-Han. Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Comparisons Between Developed and Developing Countries. *Asia-Pacific Journal of Public Health*. 2010; 22(1): 9-18
40. Karlsson Ann-Katrin. Autonomic dysfunction in spinal cord injury: clinical presentation of symptoms and signs. *Progress in Brain Research*, 2006;152: 1-8

41. Hansen RB, Biering-Sørensen F, Kristensen JK. Urinary incontinence in spinal cord injured individuals 10–45 years after injury. *Spinal Cord*, 2010; 48: 27–33
42. Ku JH, Choi WJ, Lee JY, Jung TY, Lee JK, Park WH, Shim HB. Complications of the upper urinary tract in patients with spinal cord injury: a long-term follow-up study. *Urol Res* , 2005; 33: 435–439
43. Krogh K, Perikash I, Stiens SA, Biering-Sørensen F. International bowel function basic spinal cord injury data set. *Spinal Cord*, 2009; 47: 230–234
44. Coggrave MJ, Norton C. The need for manual evacuation and oral laxatives in the management of neurogenic bowel dysfunction after spinal cord injury: a randomized controlled trial of a stepwise protocol. *Spinal Cord* , 2009,1–7
45. Stacy L. Elliott. Problems of sexual function after spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 2006;152: 387-399
46. Mittmann N, Craven C, Gordon M, Macmillan R, Hassouna M, Raynard W, et al. Erectile dysfunction in spinal cord injury: a cost-utility analysis. *J Rehabil Med* 2005; 37: 358–364
47. Sipski ML, Arenas A. Female sexual function after spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 2006;152:441-447
48. Kreuter M, Siösteen A, Biering-Sørensen F. Sexuality and sexual life in women with spinal cord injury: a controlled study. *J Rehabil Med* 2008; 40: 61–69
49. Bombardier CH, Richards JS, Krause JS, Tulskey D, Tate DG. Symptoms of Major Depression in People With Spinal Cord Injury: Implications for Screening. *Arch Phys Med Rehabil*, 2004; 85: 1749- 1756
50. Dryden DM, Saunders LD, Rowe BH, May LA, Yiannakoulis N, Svenson LW, et al. Depression following Traumatic Spinal Cord Injury. *Neuroepidemiology*, 2005;25:55–61
51. Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res*. 2008; 31(3):247-51.
52. Ho CH, Wuermsler LA, Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC. Spinal Cord Injury Medicine. 1. Epidemiology and Classification. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88(1):s 49-s54
53. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991; 75(1):15-26.

54. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 1995; 5(4):407–13
55. Bauchet L, Lonjon N, Perrin FE, Gilbert C, Privat A., Fattal C. Strategies for spinal cord repair after injury: A review of the literature and information. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 2009; 52:330–351
56. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4(4): 451–464
57. Zwimpfer TJ, Bernstein M. Spinal cord concussion. *J Neurosurg* 1990; 72(6):894–900.
58. Del Bigio MR, Johnson GE. Clinical presentation of spinal cord concussion. *Spine* 1989; 14(1):37–40.
59. Sparrey CJ, Choo AM, Liu J, Tetzlaff W, Oxland TR. The distribution of tissue damage in the spinal cord is influenced by the contusion velocity. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008; 33(22):E812-9.
60. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 2002; 26(4):238–55.
61. Privat A. Pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Bull Acad Natl Med* 2005; 189(6):1109–17. Discussion 17–18.
62. 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; 24(5):254-64.
63. Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie*. 1991; 37(5):291-302.
64. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1997; 86 (3):483–92.
65. Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1993; 71: 81-105.
66. Braughler JM., Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*1989; 6:289–301.

67. Alvarez MN, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol.* 2002; 359, 353–366.
68. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 295–311.
69. Kruman I, Bruce-Keller, A.J., Bredesen, D., Waeg, G., Mattson, M.P. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 1997; 17: 5089–5100.
70. Szabo C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 21: 855–869.
71. Singh IN, Sullivan PG, Hall ED. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: protective effects of peroxynitrite scavengers. *J. Neurosci. Res.* 2007; 85: 2216–2223.
72. Xiong Y, Hall E. Pharmacological evidence for a role of peroxynitrite in the pathophysiology of spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2009; 216: 105–114
73. Hall, E.D., Braugher, J.M. Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6:303–313.
74. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23(9):1261–76.
75. Wrathall JR, Teng YD, Choiniere D. Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp Neurol* 1996; 137(1):119–26.
76. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca₂₊ release. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16(10):356–9.
77. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7(2):369–79.
78. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11(10):465–9.
79. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998; 396(6707):119–22.
80. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(8):299–306.

81. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001; 103(1):203–18.
82. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 1997; 377(3):443–64.
83. Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1994; 6(5):712–24.
84. Tonai T, Taketani Y, Ueda N, et al. Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 1999; 72(1):302–9.
85. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12(12):1063–73
86. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999; 16(10):851–63.
87. Lavine SD, Hofman FM, Zlokovic BV. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(1):52–8.
88. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(20):9328–32.
89. Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 1994; 12(1):139–53.
90. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999; 16(10):851–63.

91. Brewer KL, Bethea JR, Yeziarski RP. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999; 159(2):484–93.
92. Robins S. L, Fehlings M.G. Models of experimental spinal cord injury: Translational relevance and impact. *Drug Discovery Today: Disease Models Nervous system*. 2008 ; 5(1)
93. De la Torre J. C. Spinal cord injury models. *Progress in Neurobiology* 1984; 22(4):289-344
94. Bergman ML, Murray WJ. Effect of intrathecal epinephrine on rabbit spinal cord. *Anesth. Analg.* 1972; 51:383-386.
95. Osterholm JL, Mathews GJ. Anti-norepinephrine therapy against traumatic necrosis of the spinal cord. *Clin. Neurosurg.* 1972b; 20: 382-399.
96. Kakari S, DeCrescito V, Tomasula JJ, Flamm, ES, Campbell JB. Histochemical changes in feline spinal cord following intraspinal norepinephrine injection. *J. Histochem. Cytochem.* 1973; 21:408-409.
97. Balentine JD, Dean DL Jr. Calcium-induced spongiform and necrotizing myelopathy. *Lab Invest.* 1982; 47(3):286-95.
98. Nygren, LG, Olson L, Seiger A. Monoaminergic reinnervation of the transected spinal cord by homologous fetal brain grafts. *Brain Res.* 1977; 129: 227-235.
99. Nobin A, Baumgarten HG, Brorklund A, Lachenmayer L, Stenev U. Axonal degeneration and regeneration of the bulbo-spinal indoleamine neurons after 5,6-dihydroxytryptamine treatment. *Brain Res.* 1973; 56:1-24.
100. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. *J. Am. Med. Assoc.* 1911; 57(11): 878- 880.
101. Albin MS, White RJ, Acosta-Rua G, Yashon D. Study of functional recovery produced by delayed localized cooling after spinal cord injury in primates. *J. Neurosurg.* 1968a; 29:113-120.
102. Albin MS, White RJ, Yashon D, Massopust Jr. LC. Functional and electrophysiologic limitations of delayed spinal cord cooling after impact injury. *Surg. Forum*, 1968b; 19: 423-424.
103. Albin MS, White RJ, Yashon D, Harris LS. Effects of localized cooling on spinal cord trauma. *J. Trauma*, 1969; 9: 1000-1008.

104. White RJ, Albin MS, Harris LS, Yashon D. Spinal cord injury: sequential morphology and hypothermic stabilization. *Surg. Forum*, 1969; 20: 432-434.
105. Goodman JH, Bingham Jr. WG, Hunt WE. Edema formation and central hemorrhagic necrosis following impact injury to primate spinal cord. *Surg. Forum*, 1974; 25: 440-442.
106. Bresnahan JC, King JS, Martin GE, Yashon D. A neuroanatomical analysis of spinal cord injury in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Neurol. Sci.* 1976; 28: 521-542.
107. Ducker TB, Kindt GW, Kempe LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J. Neurosurg.* 1971a; 35: 700-709.
108. Ducker TB, Kindt GW, Kempe LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J. Neurosurg.* 1971b; 35: 700-708.
109. Tator CH, Deecke L. Studies of the treatment and pathophysiology of acute spinal cord injury in primates. *Paraplegia* 1973; 10: 344-345.
110. Kobrine AI, Doyle TF. Role of histamine in posttraumatic spinal cord hyperemia and the luxury perfusion syndrome. *J. Neurosurg.* 1976; 44: 16-20.
111. Kobrine AI, Doyle TF, Rizzoli HV. The effect of antihistamines on experimental posttraumatic edema of the spinal cord. *Surg. Neurol.* 1976a; 5: 307-309.
112. Kobrine AI, Doyle TF, Rizzoli HV. Further studies on histamine in spinal cord injury and post traumatic hyperemia. *Surg. Neurol.* 1976b; 5: 101-103.
113. Kobrine AI, Doyle TE, Rizzoli HV. A method for estimating edema in experimental traumatic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 1976c; 50: 240-245.
114. Kobrine AI, Doyle TF, Rizzoli HV. Spinal cord blood flow as affected by changes in systemic arterial blood pressure. *J. Neurosurg.* 1976d; 44: 12-15.
115. Tator CH. Acute spinal cord injury: a review of recent studies of treatment and pathophysiology. *Can. Med. Assoc. J.* 1972; 107: 143-145.
116. Singer JM, Russell GV, Coe JE. Changes in evoked potentials after experimental cervical spinal cord injury in the monkey. *Exp. Neurol.* 1970; 29: 449-461.
117. Daniell HB, Francis WW, Lee WA, Ducker TB. A method of quantitating injury inflicted in acute spinal cord studies. *Paraplegia* 1975; 13: 137-142.
118. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma* 1992 ; 9, 123–126 discussion 126–128

119. Young W. Spinal cord contusion models. *Progress in Brain Research*, 2002; 137: 231-255
120. Ayer JB. Cerebrospinal fluid in experimental compression of the spinal cord. *Arch. Neurol. Psychiat.* 1919; 2(2):158-164.
121. Mcveigh JF. Experimental cord crushes with especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the spinal cord affected. *Arch. Surg.* 1923; 7: 573-600.
122. Thompson JE. Pathological changes occurring in the spinal cord following fracture dislocation of the vertebrae. *Ann. Surg.* 1923; 78: 260-293.
123. Craig WM. Pathology of experimental compression of the spinal cord. *Proc Staff Meeting Mayo Clinic* 1932; 7: 680-692.
124. Fontaine R, Mandel P, Dany A. Étude du déséquilibre biochimique provoqué par les traumatismes médullaires, chez l'homme et chez le chien. *Lyon. Chir.* 1954 ; 49 : 395-408.
125. Harvey JE, Srebnik HH. Locomotor activity and axon regeneration following spinal cord compression in rats treated with L-thyroxin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1967; 26, 661-668.
126. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute model in the rat. *Surg.Neurol.* 1978; 10: 38-43.
127. Khan, M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can. J. Neurol. Sci.* 1983; 10: 161-165.
128. Guha A, Tator CH, Rochon J. Spinal cord blood flow and systemic blood pressure after experimental spinal cord injury in rats. *Stroke* 1989; 20: 372-377.
129. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *A.M.A. Arch. Neurol. Psychiat.* 1953; 70: 813-819.
130. Hansebout RP, Eugene F, Kuthner F, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroid upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg. Neurol.* 1975; 4, 531-536.
131. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology* 1998; 56: 341-358
132. Martin SH, Bloedel JR. Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. *J. Neurosurg.* 1973; 39: 75-81.

133. Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can. J. Neurol.Sci.* 1983; 10: 161-165.
134. Baydin A, Cokluk C, Aydin K. A new minimally invasive experimental spinal cord injury model in rabbits. *Minim Invasive Neurosurg.* 2007; 50 (3):170-2.
135. Sant'Anna da Costa E, Lima Carvalho A, Blanco Martinez A, De-Ary-Pires B, Ary Pires-Neto M, De Ary-Pires R. Strapping the spinal cord: An innovative experimental model of CNS injury in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2008; 170:130–139
136. Lu K, Liang CL, Chen HJ, Chen SD, Hsu HC, Liliang PC, et al. Injury severity and cell death mechanisms: effects of concomitant hypovolemic hypotension on spinal cord ischemiareperfusion in rats. *Exp. Neurol.* 2004; 185: 120–132
137. Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala S, Johe K, Hazel T, et al. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience* 2007; 147: 546–560
138. Benton RL, Woock JP, Gozal E, Hetman M, Whittemore SR. Intraspinal application of endothelin results in focal ischemic injury of spinal gray matter and restricts the differentiation of engrafted neural stem cells. *Neurochem. Res.* 2005; 30: 809–823
139. Hughes PM, Anthony DC, Ruddin M, Botham MS, Rankine EL, Sablone M, et al. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003; 62:1276–1286
140. Krassioukov AV, Ackery A, Schwartz G, Adamchik Y, Liu Y, Fehlings MG. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Research Protocols* 2002; 10(2): 60–68
141. Okano H, Kaneko S, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Toyama Y. Regeneration-based therapies for spinal cord injuries. *Neurochemistry International* 2007; 51: 68–73
142. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2003; 182(2): 399–411
143. Gallo V, Bertolotto A, Levi G. The proteoglycan chondroitin sulfate is present in a subpopulation of cultured astrocytes and in their precursors. *Dev. Biol.* 1987; 123: 282–285

144. Katoh-Semba R., Matsuda M., Kato K, Oohira A. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur. J. Neurosci.* 1995; 7(4): 613–621
145. Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J. Neurosci. Res.* 2003; 71 (3): 427–444
146. McKeon RJ, Jurynech MJ, Buck CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J. Neurosci.* 1999; 19(24): 10778–10788
147. Rolls A, ShechterR, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(3): 235-241
148. McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 1991; 11(11), 3398–3411
149. Smith-Thomas LC, Fok-Seang J, Stevens J, Du JS, Muir E, Faissner A, et al. An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J. Cell Sci.* 1994; 107(6), 1687–1695
150. Fidler PS, Schuette K, Asher RA, Dobbertin A, Thornton SR, Calle-Patino Y, et al. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J. Neurosci.* 1999; 19(20): 8778–8788
151. Roitbak T, Sykova E. Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 1999; 28: 40–48
152. Vorisek I, Hajek M, Tintera J, Nicolay K, Sykova E. Water ADC, extracellular space volume, and tortuosity in the rat cortex after traumatic injury. *Magn. Reson. Med.* 2002; 48(6): 994–1003
153. Do Carmo Cunha, J. de Freitas Azevedo Levy B, de Luca BA, de Andrade MS, Gomide VC, Chadi G. Responses of reactive astrocytes containing S100 β protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved

- tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair Regen.* 2007; 15: 134–146
154. White RE, Yin FQ, Jakeman LB. TGF- α increases astrocyte invasion and promotes axonal growth into the lesion following spinal cord injury in mice. *Exp. Neurol.* 2008; 214: 10–24
155. Laywell ED, Steindler DA, Silver DJ. Astrocytic stem cells in the adult brain. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2007; 18: 21–30
156. Walton NM, Sutter BM, Chen HX, Chang LJ, Roper SN, Scheffler B, et al. Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. *Development* 2006; 133(18): 3671–3681
157. Ida M, Shuo T, Hirano K, Tokita Y, Nakanishi K, Matsui F, et al. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(9): 5982–5991
158. Garwood J, Garcion E, Dobbertin A, Heck N, Calco V, French-Constant C, Faissner A. The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is expressed by oligodendrocyte precursor cells and required for the regulation of maturation rate, survival and responsiveness to platelet-derived growth factor. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 20(10), 2524–2540
159. Caroni P, Savio T, Schwab ME. Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Prog. Brain Res.* 1988; 78: 363–370
160. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 *Nature* 2000; 403(6768), 434–439
161. Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 2000; 403(6768), 383–384
162. GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000, 403(6768), 439–444
163. Woolf CJ. No Nogo: now where to go? *Neuron* 2003; 38(2):153–156
164. Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004; 14: 118–124

165. McGee AW, Strittmatter SM. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci.* 2003; 26(4):193–198
166. Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 1994; 13 (3): 757–767
167. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002; 417(6892): 941–944
168. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(2):146-56.
169. Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenbergh MJ, Holtmaat AJ, De Wit J, De Winter F, et al. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 1999; 13(2), 143–166
170. De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenbergh MJ, et al. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 2002; 175: 61–75
171. Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur. J. Neurosci.* 2001;13(3):457–471
172. Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J. Neurosci.* 2003; 23(21): 7789–7800
173. Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 95–102
174. Ronca F, Anderson JS, Paech V, Margolis RU. Characterization of slit protein interactions with glypican-1. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29141–29147
175. Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, et al. Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia* 2003; 42(2): 130–138

176. Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* 2003; 71:427–444.
177. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1999; 19:5810–5822.
178. Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braisted JE, et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 2000; 20:2427–2438.
179. Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* 2002; 22:2225–2236.
180. Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, Tuszynski MH. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 2002; 22:2792–2803.
181. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003; 182:399–411.
182. Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* 1998; 154:654–662.
183. Yick LW, Wu W, So KF, Yip HK, Shum DK. Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury. *Neuroreport* 2000; 11: 1063–1067.
184. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002; 416:636–640.
185. Caggiano AO, Zimmer MP, Ganguly A, Blight AR, Gruskin EA. Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2005; 22:226–239.

186. Steinmetz MP, Horn KP, Tom VJ, Miller JH, Busch SA, Nair D, et al. Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 2005; 25:8066–8076.
187. Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, et al. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26:10856–10867.
188. SIGMA ALDRICH. Pancretin [en línea] 2010 March 2 [fecha de acceso 1 de abril de 2010]; disponible en:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P3292|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC
189. García-Alías G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 2009; 12:1145–1151.
190. Tanaka, E. M. and Ferretti, P. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; 10, 713–723
191. Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma* 1995;12, 1–21.
192. Yoshii S, Ito S, Shima M, Taniguchi A, Akagi M. Functional restoration of rabbit spinal cord using collagen-filament scaffold. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3: 19–25.
193. Tarlov IM. Acute spinal cord compression paralysis. *J neurosurg* 1972; 36:10–20.
194. Boga M, Discigil B, Ozkisacik E.A, Gurcun U, Badak M.I, Dikicioglu E, Yenisey C, Meteoglu I. The Combined Effect of Iloprost and N-Acetylcysteine in Preventing Spinal Cord Ischemia in Rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31, 366–372
195. Shi E, Kazui T, Jiang X, Washiyama N, Yamashita K, Terada H, Muhammad Bashir A. H. Intrathecal Injection of Bone Marrow Stromal Cells Attenuates Neurologic Injury After Spinal Cord Ischemia. *Ann Thorac Surg* 2006;81:2227–34

196. Bignami, G. Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104, 285–298.
197. Metz, G.A.S., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M.E., Fouad, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research* 2000; 883, 165–177.
198. Yoshii S, Ito S, Shima M, Taniguchi A. Akagi M. Functional restoration of rabbit spinal cord using collagen-filament scaffold. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3: 19–25
199. Laviola G, Renna G, Bignami G, Cuomo V. Ontogenetic and pharmacological dissociation of various components of locomotor activity and habituation in the rat. *Int J Dev Neurosci* 1988; 6:431-438
200. Fehlings, M.G., Tator, C.H. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology* 1995; 132, 220–228.
201. Rivlin, A.S., Tator, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery* 1977; 47, 577–581.
202. Arvanian, V.L., Manuzon, H., Davenport, M., Bushell, G., Mendell, L.M., Robinson, J.K., Combined treatment with neurotrophin-3 and LSD facilitates behavioral recovery from double-hemisectomy spinal injury in neonatal rats. *Journal of Neurotrauma* 2006; 23, 66–74.
203. Shumsky, J.S., Tobias, C.A., Tumolo, M., Long, W.D., Giszter, S.F., Murray, M. Delayed transplantation of fibroblasts genetically modified to secrete BDNF and NT-3 into a spinal cord injury site is associated with limited recovery of function. *Exp. Neurol.* 2003; 184, 114–130.
204. Jung D, Ha J, Kang B, Kim J, Quan F, Lee J, Woo E, Park H. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences* 2009; 285, 67–77
205. Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem

- cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci.* 2007; 8: 275–282.
206. Wang L, Shi JX, Yin HX, Ma CY, Zhang QR. The influence of subarachnoid hemorrhage on neurons: an animal model. *Ann Clin Lab Sci.* 2005; 35(1):79-85.
207. Tamayo C. Estrategias para diseñar y elaborar proyectos de investigación en ciencias de la salud. 1ra ed. Lima-Perú: Mundo científico en salud; 2003.
208. Batchelor GR. The laboratory rabbit. In *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 7th edition. Poole T ed, Blackwell Science, Oxford 1999; 395-408
209. Chaovipoch, P., Jelks, K.A., Gerhold, L.M., West, E.J., Chongthammakun, S., Floyd, C.L. 17beta-estradiol is protective in spinal cord injury in post- and premenopausal rats. *Journal of Neurotrauma* 2006; 23, 830–852.
210. Roof, R.L., Hall, E.D. Gender differences in acute CNS trauma and stroke. Neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *Journal of Neurotrauma* , 2000; 9, 187–195.
211. Hall, E.D., Gibson, T.R., Pavel, K.M., 2005. Lack of a gender difference in post-traumatic neurodegeneration in the mouse controlled cortical impact injury model. *Journal of Neurotrauma* 22, 669–679.
212. Swartz, K.R., Fee, D.B., Joy, K.M., Roberts, K.N., Sun, S., Scheff, N.N., Wilson, M.E., Scheff, S.W., 2007. Gender differences in spinal cord injury are not estrogen-dependent. *Journal of Neurotrauma* 24, 473–480.
213. Fee, D.B., Swartz, K.R., Joy, K.M., Roberts, K.N., Scheff, N.N., Scheff, S.W. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Research* 2007; 1137, 146–152.
214. Eila Kaliste. *The Welfare of Laboratory Animals*. Lena Lidfors, Therese Edström and Lennart Lindberg. Chapter 10. The welfare of laboratory rabbits. 2007 Springer. p. 211
215. Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación. Edición mexicana. Institute of laboratorie animal resource. 2002
216. Gordon C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. and behav.* 1990; 47:963-991
217. Berthelsen H, Hansen LT. The effect of hay on the behaviour of caged rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim Welf* 1999; 8:149-157

218. Morton DB, Jennings M, Batchelor GR, Bell D, Birke L, Davies K, Eveleigh JR, Gunn D, Heath M, Howard B, Koder P, Phillips J, Poole T, Sainsbury AW, Sales GD, Smith DJA, Stauffacher M, Turner RJ. Refinement in rabbit husbandry, *Lab Anim* 1993; 27:301-329
219. Cheeke PR. Rabbit Feeding and Nutrition. Academic Press, USA 1987; 160-175
220. De Schuchmann, S.M.: Individual care and treatment of rabbits, mice, rats, guinea pigs, hamsters, and gerbils. En Kirk, R.W.(ed.): *Current Veterinary Therapy X*. Philadelphia, W.B. Saunders Co, 1989, p.739
221. Meredith A. General biology and husbandry. In *Manual of Rabbit Medicine and Surgery*. Flecknell P ed, British Small Animal Veterinary Association, London 2000; p.13-23
222. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 7; 72: 248-54.
223. Blau K. Chromatographic methods for the study of amines from biological material. *Biochem J*. 1961, 80(1):193-200.
224. Partridge SM. Filter-paper partition chromatography of sugars: 1. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. with a note by R. G. Westall. *Biochem J*. 1948; 42(2):238-50.
225. Partridge S M. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature* 164:443, 1949.
226. Hashimoto T, Fukuda N. New spinal cord injury model produced by spinal cord compression in the rat. *J Pharmacol Methods*. 1990; 23(3):203-12.
227. Lee JH, Choi ChB, Chung DJ, Kang EH, Chang HS, Hwang SH, Han H, Choe BY, Sur JH, Lee SY, Kim HY. Development of an improved canine model of percutaneous spinal cord compression injury by balloon catheter. *Journal of Neuroscience Methods* 2008;167, 310–316
228. Muñoz C. Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates. [Tesis doctoral] Valencia,.: Valencia Univ.; 2007

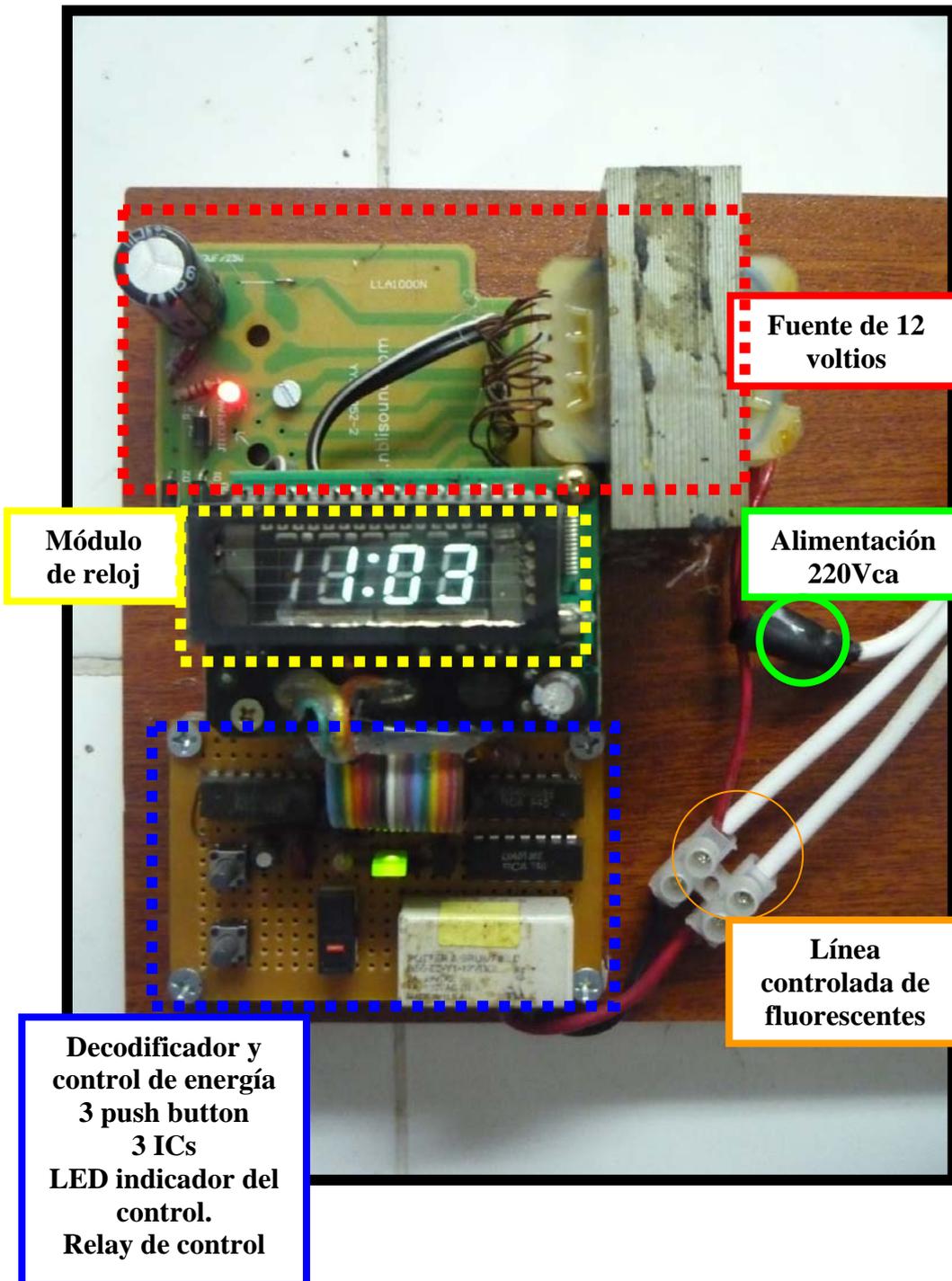
229. Ley Peruana Nro. 27265 de la protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. 2010 March 2 [fecha de acceso 1 de abril de 2010]; disponible en:
<http://www.congreso.gob.pe/ntley/Imagenes/Leyes/27265.pdf>
230. Animal Welfare Committee. Guidelines on the use of animals for training interventional medical practitioners and demonstrating medical equipment and techniques. Australia 2009
231. Silver J, Horn KP, Busch SA, Yonkof AL. Neural regeneration: regeneration and functional recovery: Axonal regeneration: role of the extracellular matrix and the glial scar. En: *The New Encyclopedia of Neuroscience* (Squire L, Albright, T., Bloom, F., Gage, F., and Spitzer, N., eds.), 2009, p 1173-1180.
232. Landry E, Frenette J, Guertin PA. Body weight, limb size, and muscular properties of early paraplegic mice. *J Neurotrauma*. 2004; 21(8):1008-16.
233. García-Alías G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci*. 2009; 12 (9):1145-51.
234. Matthews MA, St Onge MF, Faciane CL, Gelderd JB. Spinal cord transection: a quantitative analysis of elements of the connective tissue matrix formed within the site of lesion following administration of piromen, cytoxan or trypsin. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1979; 5 (3):161-80.
235. Okada, S. *et al.* Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Med*. 2006; 12, 829–834

ANEXOS

ANEXO N °1

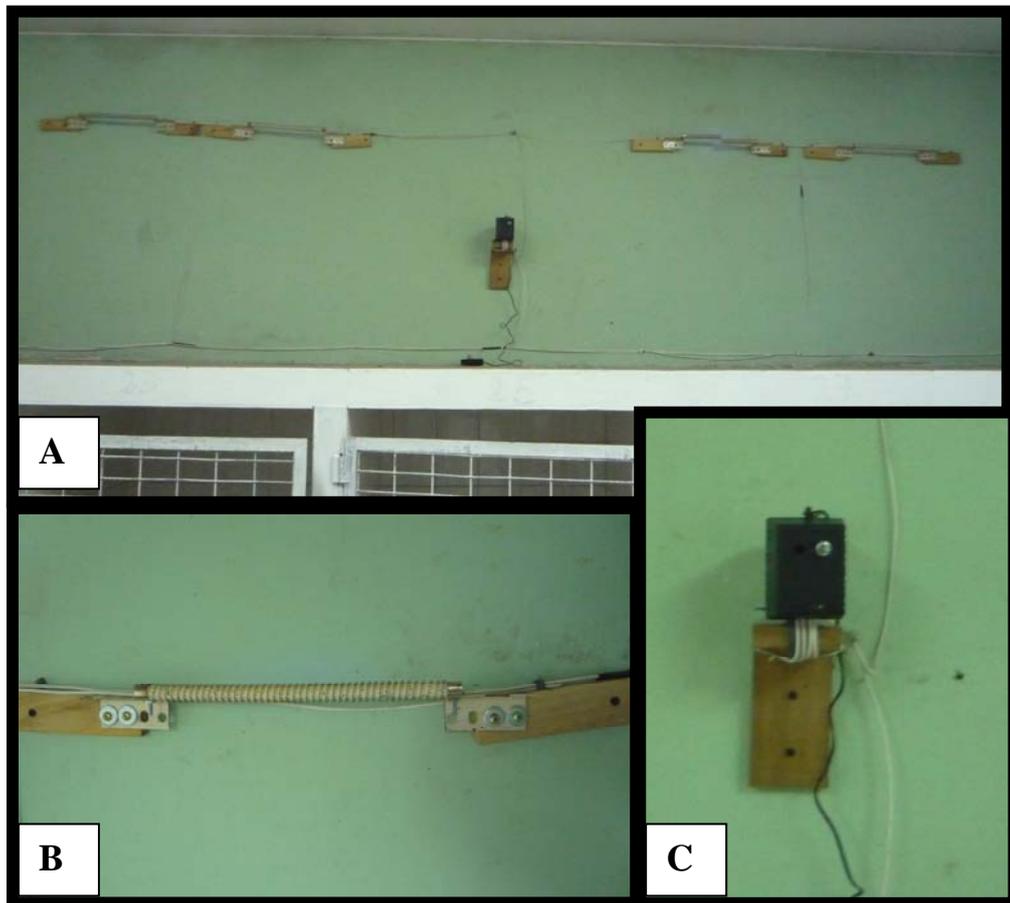


TEMPORIZADOR DE 12 HORAS: Adaptado en el Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM, permitió controlar el ciclo luz/oscuridad de 12 horas, por tanto se respetó el ritmo circadiano del animal.²¹⁵ El temporizador registró la hora del día, a su derecha el centro de control del extractor de aire y temperatura (control accesorio).



DISEÑO DE TEMPORIZADOR DE 12 HORAS

ANEXO N °2

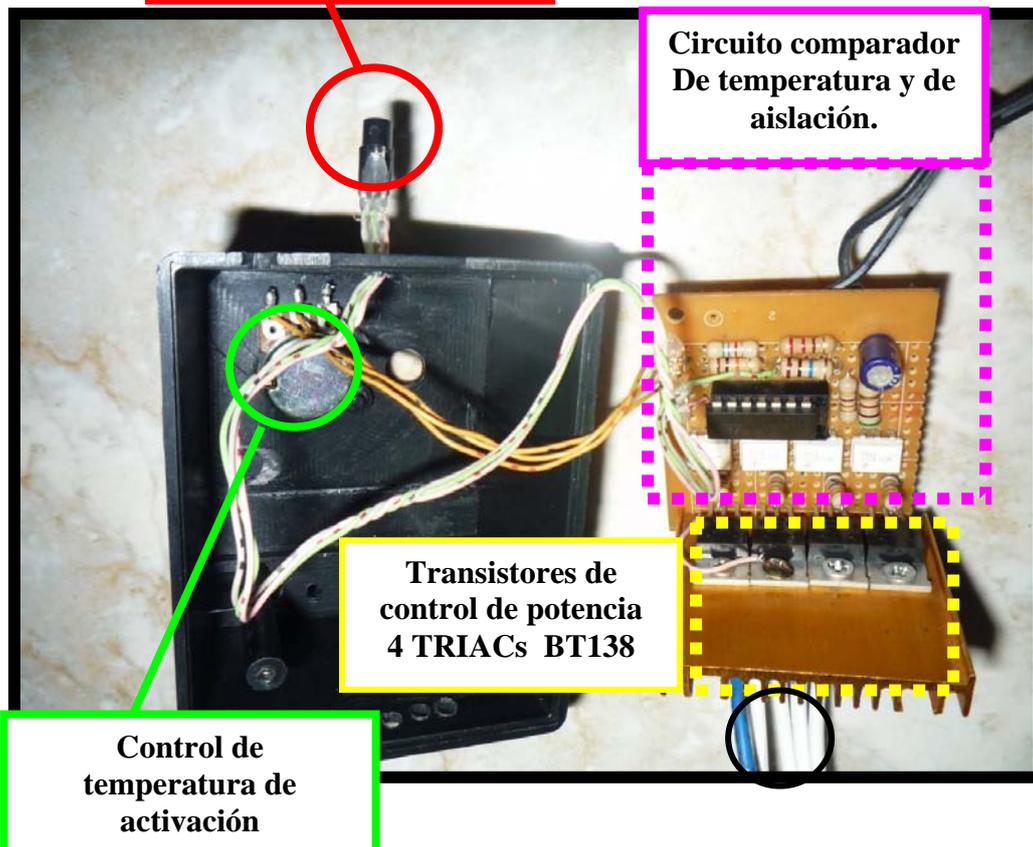


TERMOSTATO ELECTRÓNICO: (A) Controló una temperatura promedio de 18 °C con un rango de 15-22 °C ²⁰⁸ Este termostato reguló 4 calefactores, con prendido y apagado automático en caso de exceder la temperatura establecida dentro del rango, fue

adaptado al Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM. **(B)** Calefactor, imagen ampliada. **(C)** Termostato, imagen ampliada



IC Sensor de temperatura LM35



Circuito comparador De temperatura y de aislación.

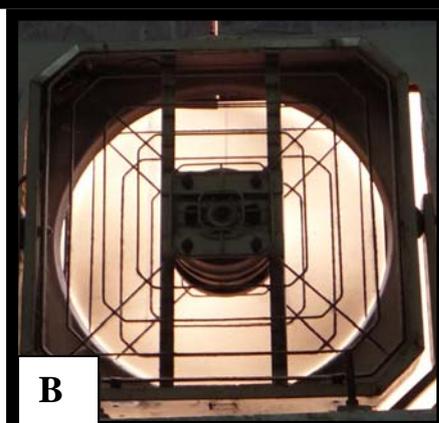
Transistores de control de potencia 4 TRIACs BT138

Control de temperatura de activación

Lineas controladas al calefactor

DISEÑO DE TERMOSTATO ELECTRÓNICO

ANEXO N °3



EXTRACTOR DE AIRE: (A y B) Adaptado en la parte superior del Bioterio N °6 Facultad de Medicina UNMSM considerando el sentido del flujo de aire por densidad,

así mismo los bordes del ambiente fueron adaptados de forma roma, esto permitió una ventilación adecuada por la acumulación de amonio, de CO₂ y los cambios de pelaje.²⁰⁸

ANEXO N °4



JAULA: (A) El alojamiento del conejo tuvo dimensiones respecto a su peso, un área del piso de 0.7569 m² con altura de 78cm. (B) La parte inferior de la jaula tuvo una malla de hierro galvanizado, permitiendo el paso de heces y orina para que los animales no tengan contacto con los mismos, evitando de esta forma la coprofagia. (C) Hacia el

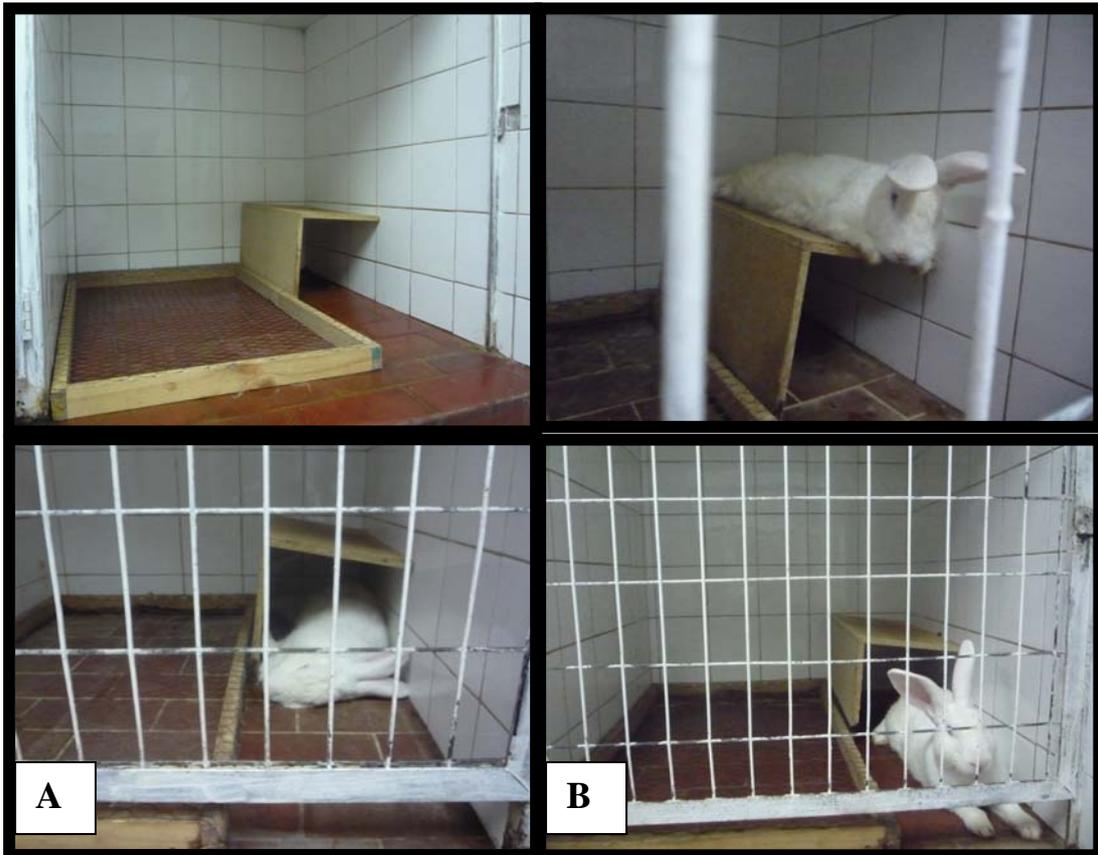
lado derecho en la jaula un pequeño estante y su comedero y bebedero. **(D)** El conejo *Nueva Zelanda* alimentándose. **(E y F)** Disposición de jaulas en el bioterio. **(G)** Comedero fijo con alambre a la malla, evita derrame de alimento sobre todo cuando el conejo presenta dificultad para deambulación por la lesión medular.



G

ANEXO N °5

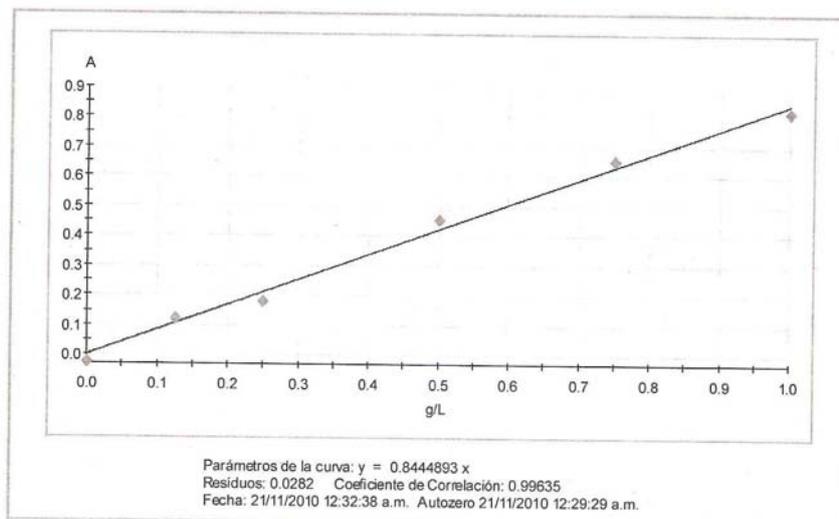
Ambiente enriquecido: (A, B, C y D) El ambiente enriquecido consistió en un estante, para que los conejos salten por encima o se oculten por debajo, de esta manera se redujo la intranquilidad, nerviosismo y timidez a la captura.²¹⁷ La jaula tuvo un solo conejo varón adulto debido a que existe agresividad entre los machos de esta edad²¹⁸, por otro lado el ambiente enriquecido compensó la falta de compañía del animal.²⁰⁸



ANEXO N °6

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE BRADFORD PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS:

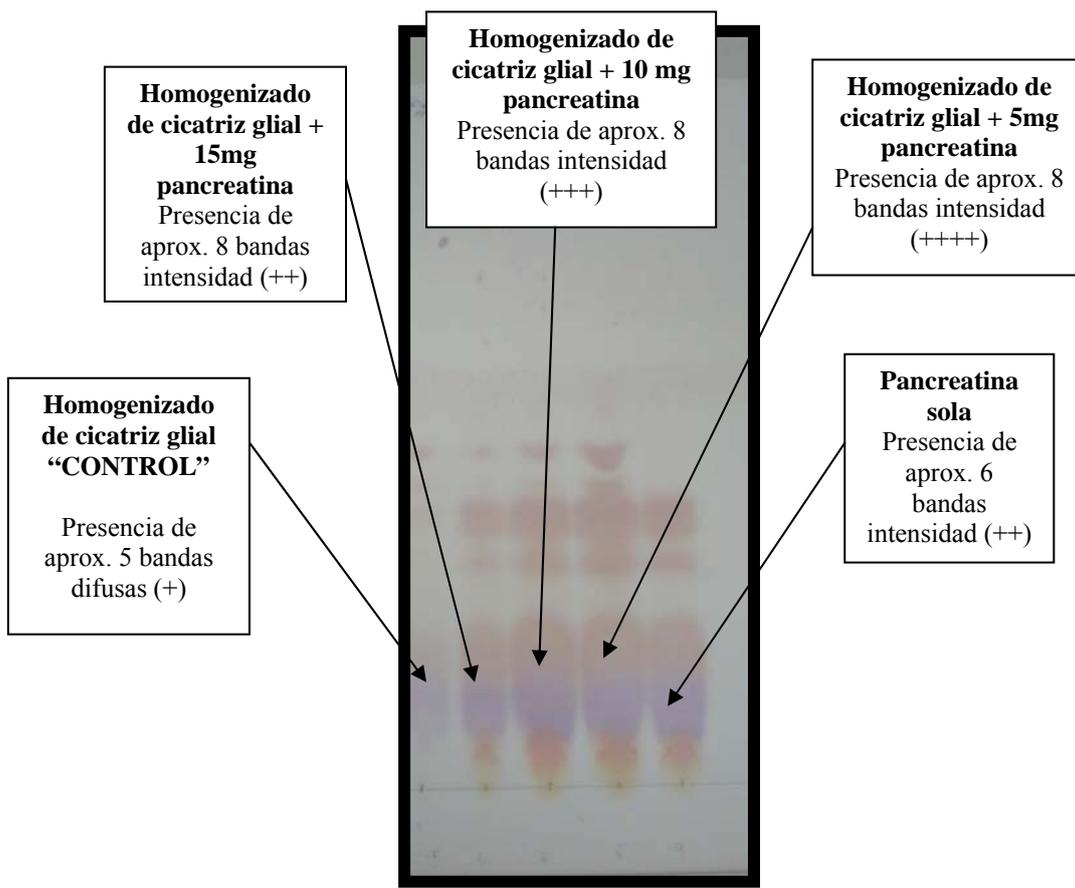
Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA 0,1%), siendo aceptada con un coeficiente de correlación de 99,6%, luego de lo cual se procedió a la medición de la muestra de estudio.



Muestra	Factor de dilución	Ordenada (A)	Concentración (g/L)
Homogenizado de cicatriz glial "CONTROL"	1	0.480	0.601
Homogenizado de cicatriz glial + 5mg pancreatina	1	0.210	0.263
Homogenizado de cicatriz glial + 10 mg pancreatina	1	0.217	0.272
Homogenizado de cicatriz glial + 15 mg pancreatina	1	0.254	0.318
5mg pancreatina	1	0.025	0.032
10 mg pancreatina	1	0.027	0.034
15 mg pancreatina	1	0.039	0.049

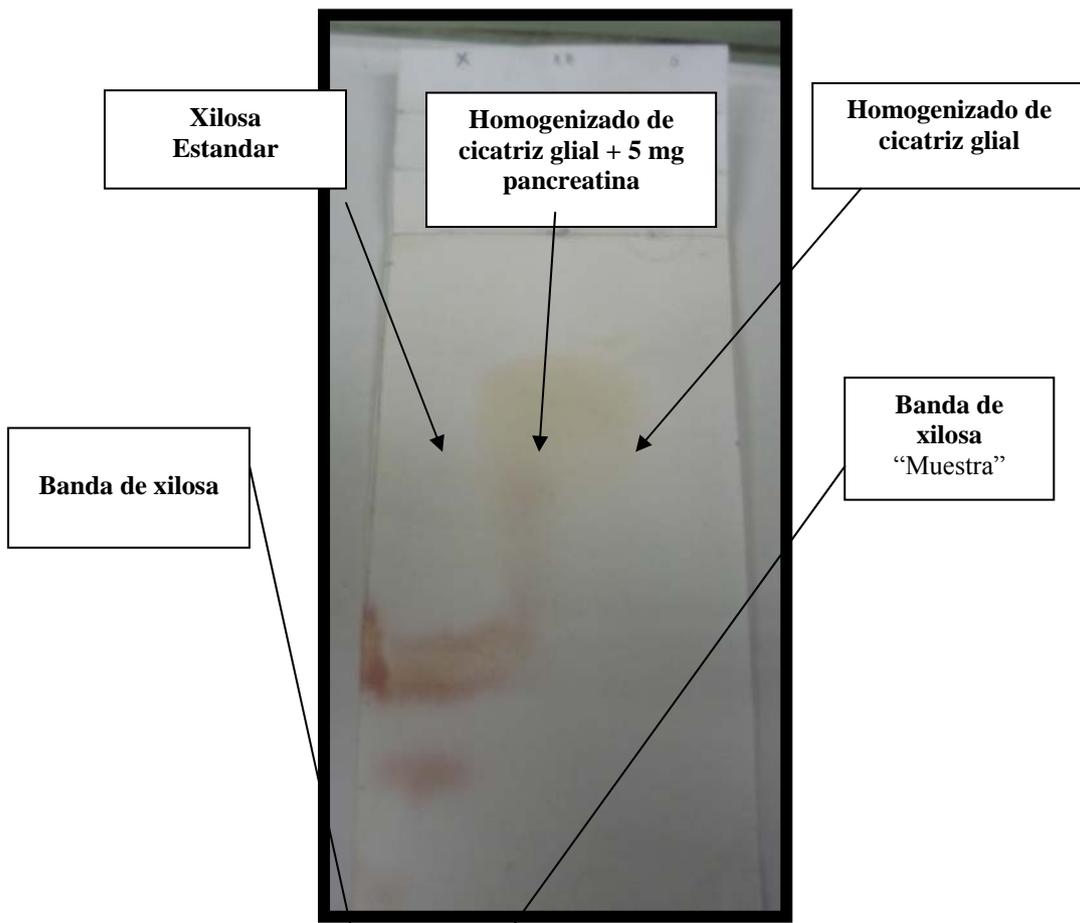
ANEXO N °7

MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE CAPA FINA EN SILICA GEL PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE AMINOÁCIDOS:



ANEXO N °8

MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN PAPEL PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES ESPECIFICAMENTE XILOSA





ANEXO N °9

MÉTODO DE INDUCCIÓN DE LESIÓN MEDULAR EXPERIMENTAL (MÉTODO DE HASHIMOTO)





El conejo una vez anestesiados con ketamina (35 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) via intramuscular, se procedió a la colocación de via periférica en pata anterior derecha, como se aprecia de manera secuencial en la fotos

(A, B, C y D)



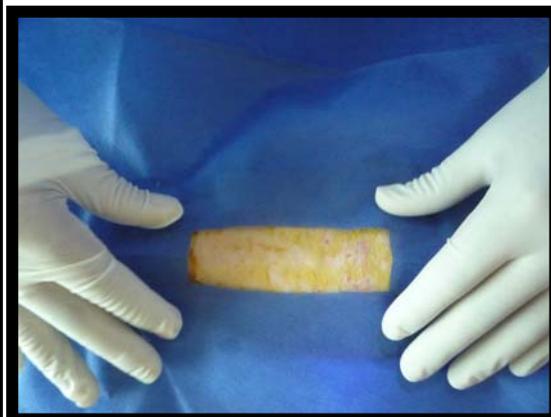
Se administró una dosis preoperatoria de enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo), luego la mitad posterior inferior del conejo fue rasurada con afeitadora.



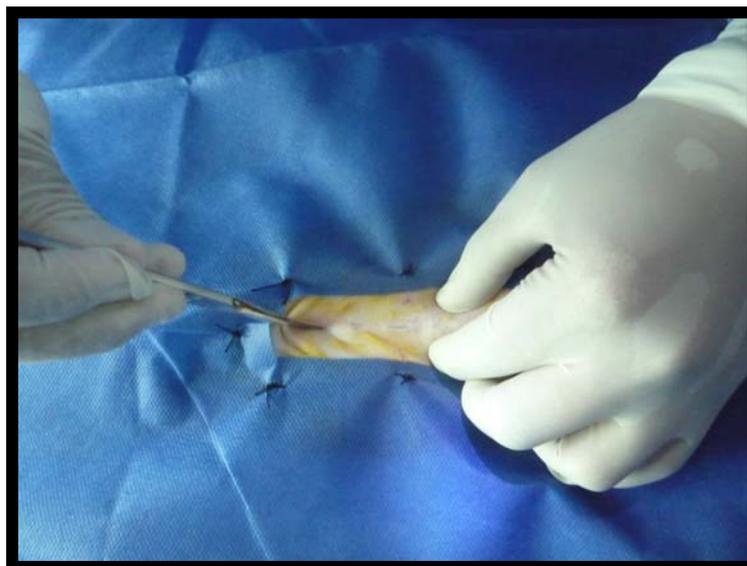
El área toracolumbar fue limpiada con solución jabonosa y luego con solución de yodopovidona.



Se mantuvo la vía periférica permeable. La frecuencia cardiaca (RN: 130-320 lpm), frecuencia respiratoria (RN: 30-60 rpm) y la temperatura rectal (RN: 38.5-39.5 °C) fueron supervisadas.



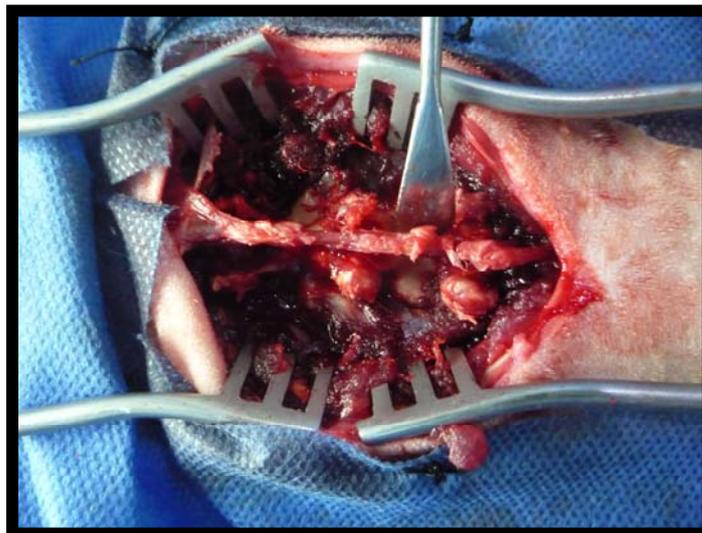
El área quirúrgica se cubrió con campos quirúrgicos para mantener condiciones asépticas. La cirugía se realizó con ayuda de una lupa de 10X.



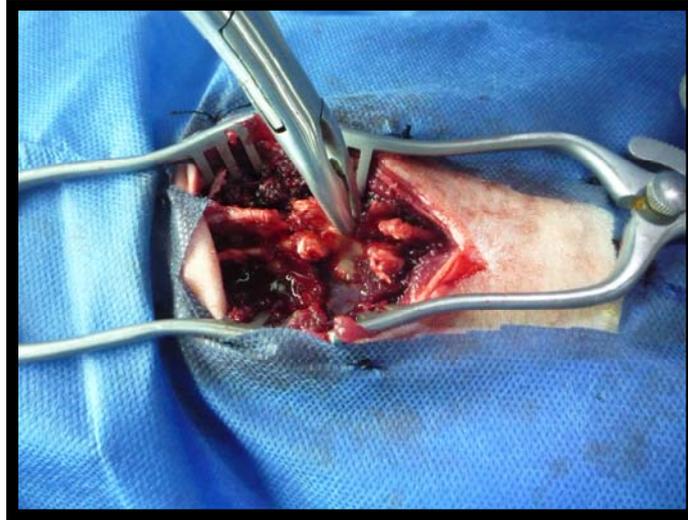
Se realizó una incisión de la piel por la línea media de T11a T13. La fascia fue cortada bilateralmente en el borde lateral de los procesos espinosos.



Intervención quirúrgica. Izquierda (Médico Veterinario Diego Díaz Coahila), Derecha (Bachiller en Medicina Humana Roberto Chávez Asmat)



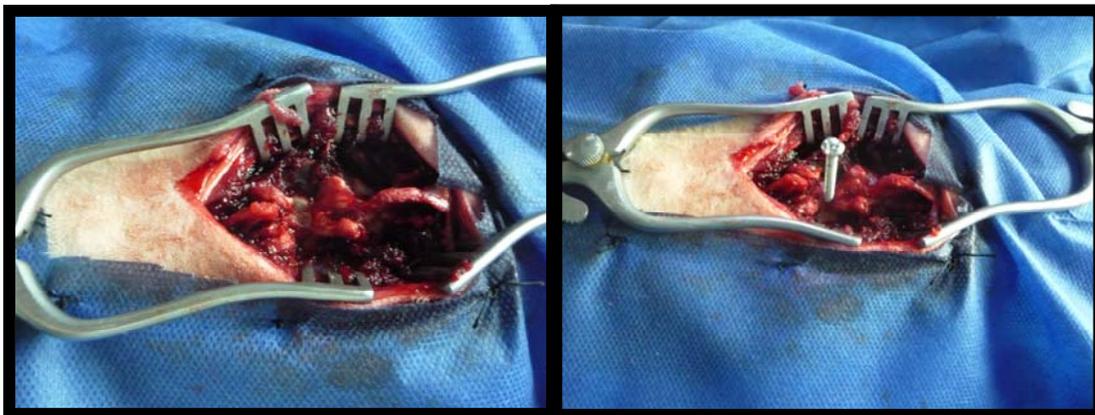
Los músculos paraespinales fueron disecados subperiostealmente en el proceso espinoso y laminar de T12.



Se retiró la apófisis espinosa de la vértebra T12.



Un pequeño agujero fue realizado en el centro de la superficie disecada de la vértebra.



Un tornillo del acero inoxidable de diámetro 3 milímetros fue implantado en el agujero sobre la duramadre.





El tornillo fue retirado luego de 60 minutos y suturada la incisión. Una dosis adicional de enrofloxacino intramuscular (10mg/ kilogramo), fue administrada a las 24 horas del postoperatorio. Metamizol a dosis de 10mg/k fue administrado en las patas delanteras cada 12 horas en los posteriores 3 días.

ANEXO N °10

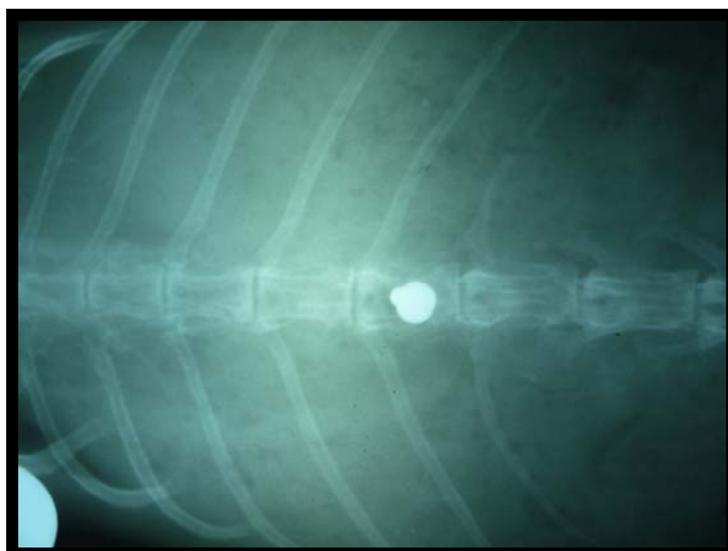
MÉTODO RADIOLÓGICO PARA COLOCACIÓN DE TORNILLO



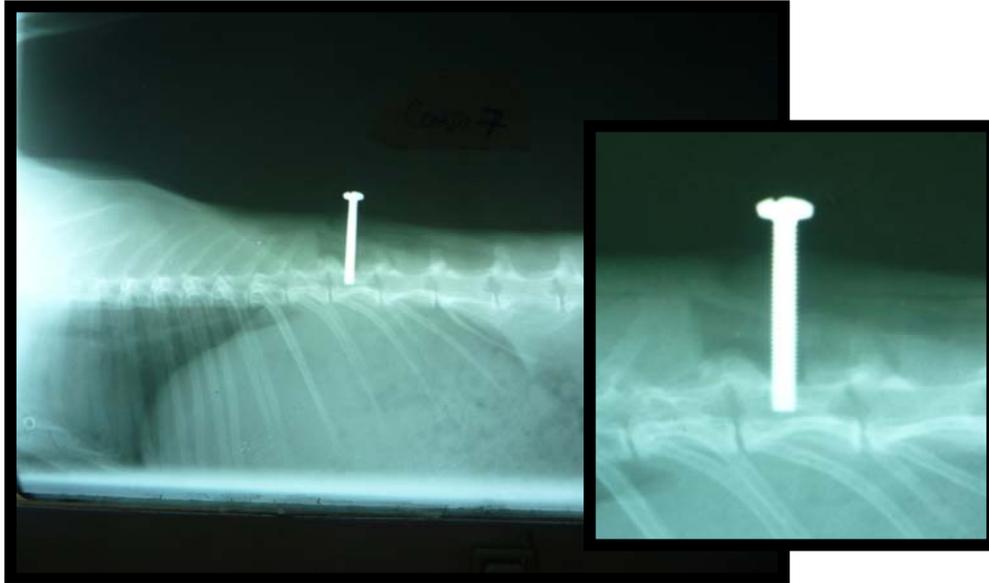
Equipo de radiología. Clínica Veterinaria. UNMSM



Ubicación adecuada de conejo para toma radiológica.



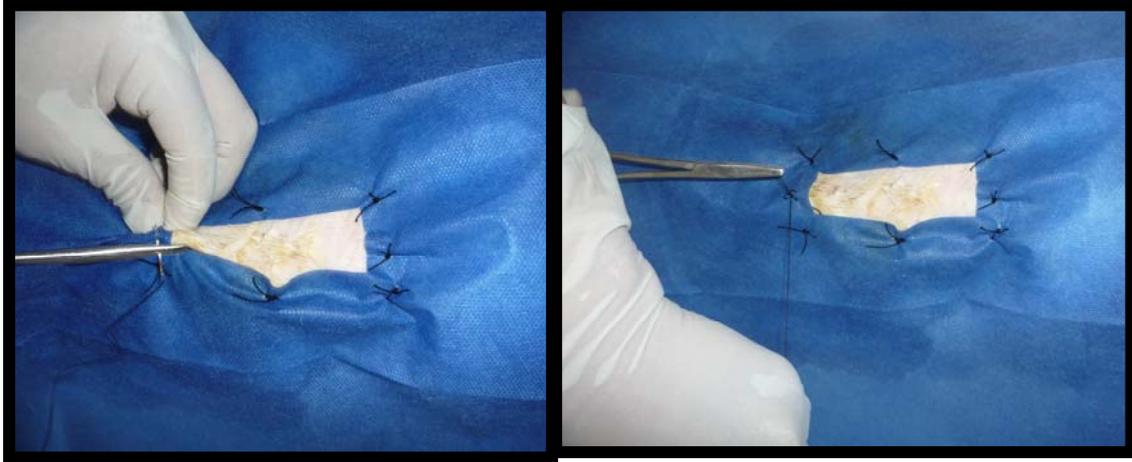
Radiografía postero anterior.



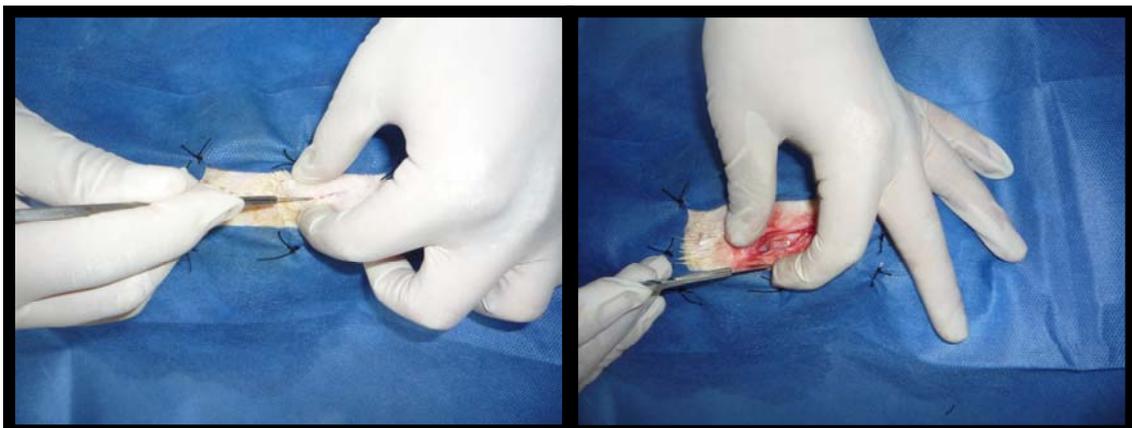
Radiografía de perfil o incidencia lateral. Se aprecia que el tornillo ocupa el 90% del canal medular, se tomó de referencia la investigación de T. Hashimoto y N. Fukuda ²²⁸ donde al ocuparse el 90% del canal se presenta un puntaje neurológico moderado a severo.

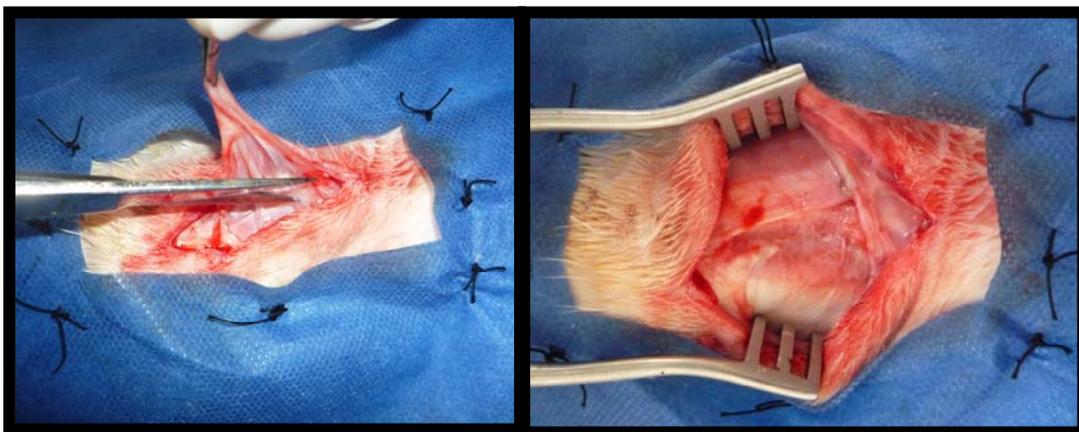
ANEXO N °11

MÉTODO DE COLOCACIÓN DE CATÉTER PARA APLICACIÓN DE PANCREATINA EN LESIÓN MEDULAR



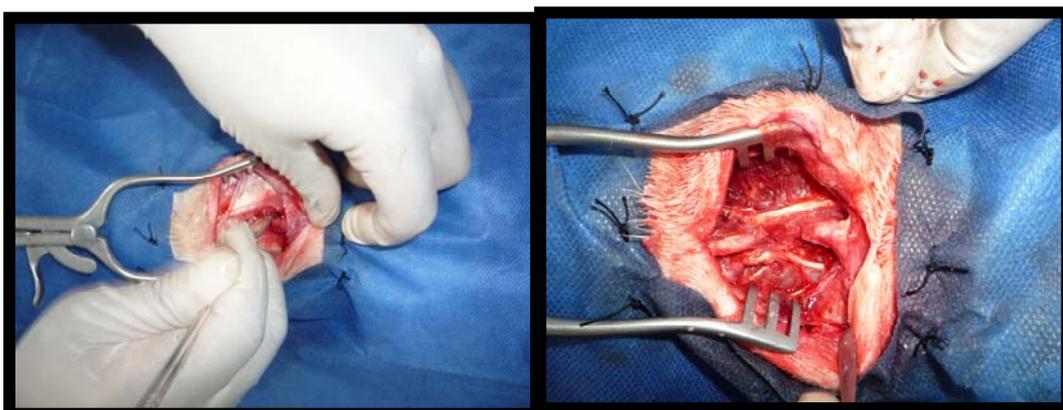
El conejo una vez anestesiados con ketamina (35 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) via intramuscular, se procedió a la colocación de via periférica en pata anterior derecha. Se administró una dosis preoperatoria de enrofloxacino intramuscular (10mg/ kilogramo), luego la mitad posterior inferior del conejo fue rasurada con afeitadora. El área quirúrgica se cubrió con campos quirúrgicos para mantener condiciones asépticas. La cirugía se realizó con ayuda de una lupa de 10X.



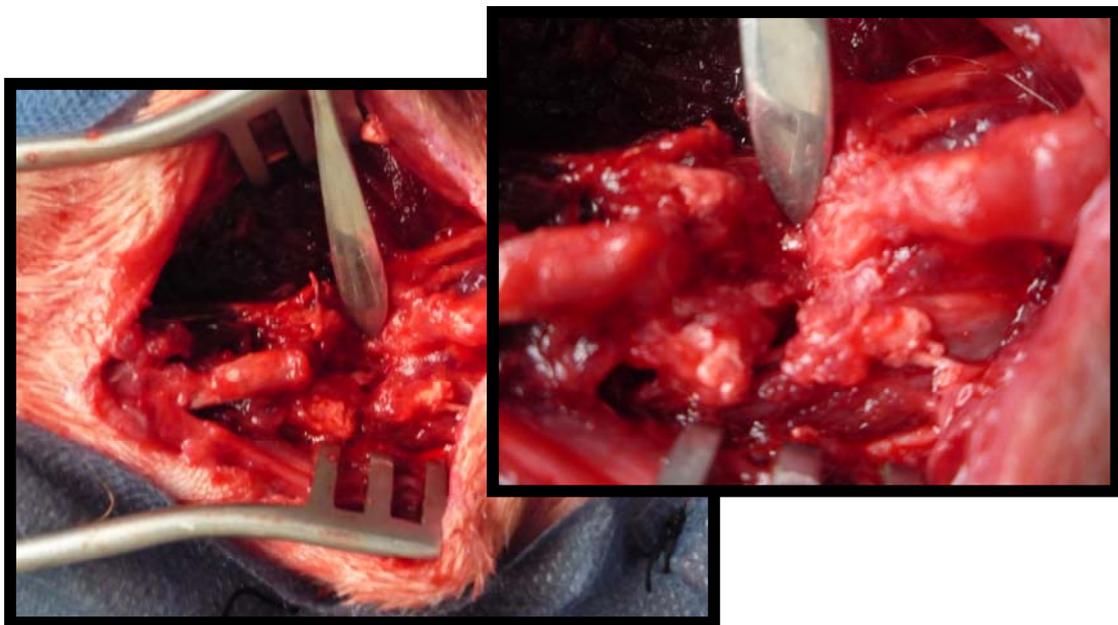


Se realizó una incisión de la piel por la línea media de T10 a L1.

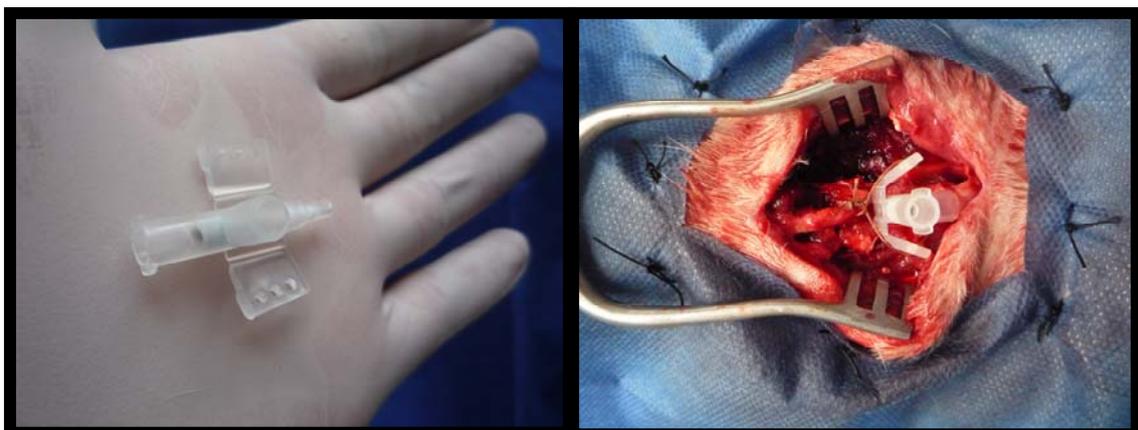
Se retiró el tejido fibroso.



Se visualizó el agujero realizado en el centro de la superficie disecada de la vertebra.



Se identificó la zona correspondiente a la cicatriz glial.





periódica de la enzima.

Se procedió a fijar un catéter en dicha zona a través de las apófisis espinosas de T11 y T13, lo que permitió la administración



Se sutura la incisión. Una dosis adicional de enrofloxacino intramuscular (10mg/kilogramo), fue administrada a las 24 horas del postoperatorio. Metamizol a dosis de 10mg/k fue administrado en las patas delanteras cada 12 horas en los posteriores 3 días.

ANEXO N °12

CUIDADOS POSTOPERATORIOS



Apósito *DuoDERM CGF*



Se colocó apósitos en zonas de prominencia ósea, zonas de propensión a úlceras de presión.

ANEXO N °13

FISIOTERAPIA

Con el fin de retrasar la aparición de atrofia muscular, evitar deformaciones, mantener las articulaciones en buena forma, y prevenir contracturas en las mismas, se realizó masajes circulares suaves y lentos en todos los músculos situados por debajo del nivel de la lesión en todas los conejos (grupo control y grupo enzima) todos los días. Además,

los masajes ayudaron a mantener la circulación sanguínea tanto en los músculos como en la piel, evitando así posibles atrofas.



También se realizaron movimientos diarios de flexión y extensión de la cadera así como movimientos de adducción y abducción en las dos direcciones (treinta veces en cada articulación).



Movimientos diarios de flexión y extensión de la rodillas en las dos direcciones (treinta veces en cada articulación).



Movimientos diarios de flexión y extensión del tobillo en las dos direcciones (treinta veces en cada articulación).





Movimientos diarios de flexión y extensión de los 4 dedos en las dos direcciones (treinta veces en cada articulación).

ANEXO N °14

PRUEBAS CLÍNICAS (CONSIDERACIONES PARA SU ADAPTACIÓN EN CONEJOS)

ESCALA BBB MODIFICADO¹⁹¹⁻¹⁹²

DISEÑO DE LA PRUEBA

Se ha considerado el trabajo original de Basso D, Beattie M y Bresnahan J. en 1995, para extrapolar las dimensiones de la prueba a un conejo, se toma en cuenta también las modificaciones realizadas por Yoshii S, Ito S, Shima M, Taniguchi A y Akagi (longitud de campo mayor de 2 metros).

Teniendo una rata de peso 250-300 g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 17.5 cm. aproximadamente (**k**), diseñaron una prueba de 100 cm. de diámetro y 21 cm. de alto.

Entonces, para un conejo de 3800-4000g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 48 cm. aproximadamente (**k1**), se diseñó la prueba con 268.8 cm. de diámetro y 57.6 cm. de alto.

273.6 cm.=5.7 **k1**



Diseño final de la prueba BBB



Proceso de adaptación, conejo reconociendo la prueba



Evaluación clínica del conejo, 3 observadores

PRUEBA DE CAMPO ABIERTO: ¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

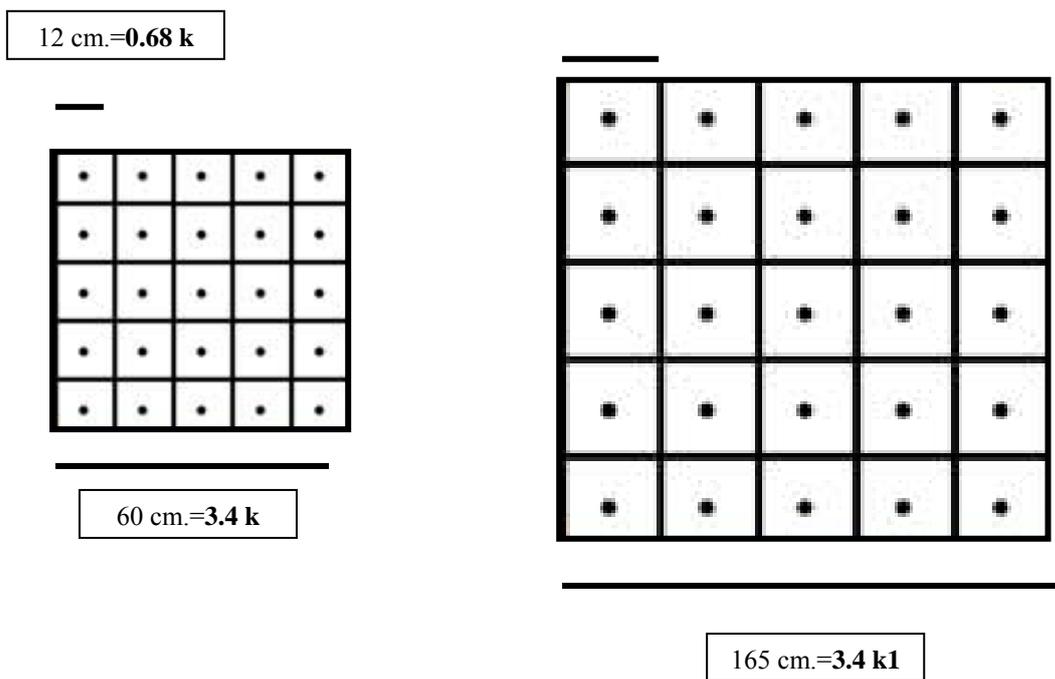
DISEÑO DE LA PRUEBA

Se ha considerado el trabajo original de Laviola G, Renna G, Bignami G y Cuomo V. en 1988, para extrapolar las dimensiones de la prueba a un conejo.

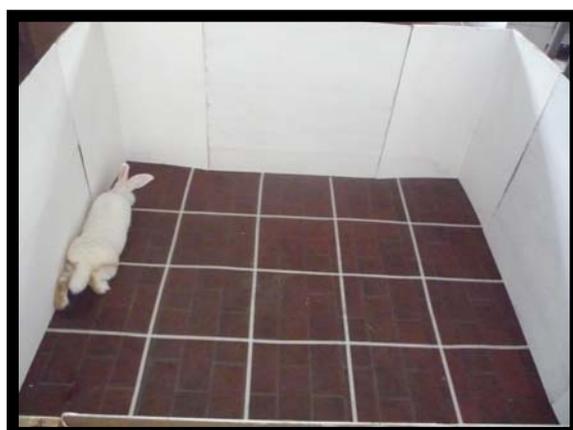
Teniendo una rata de peso 250-350 g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 17.5 cm. aproximadamente (**k**), diseñaron una prueba de 60 x 60 cm. hecha de Plexiglás negro, con la parte inferior verde clara subdividida por las líneas negras en 25 campos de 12 x 12 cm.

Entonces, para un conejo de 3800-4000g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 48 cm. aproximadamente (**k1**), se diseñó una prueba de 165 x 165 cm. hecha de madera pintada de blanco (el color blanco disminuye el estrés del animal), con la parte inferior subdividida por las líneas blancas en 25 campos de 33 x 33 cm.

33 cm.=**0.68k1**



Diseño final de la prueba de campo abierto



Proceso de adaptación, conejo reconociendo la prueba



Evaluación clínica del conejo, 2 observadores

PRUEBA DE PLANO INCLINADO: ²⁰⁰⁻²⁰¹

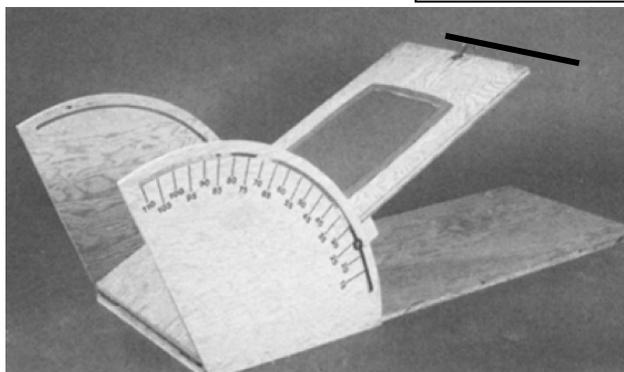
DISEÑO DE LA PRUEBA

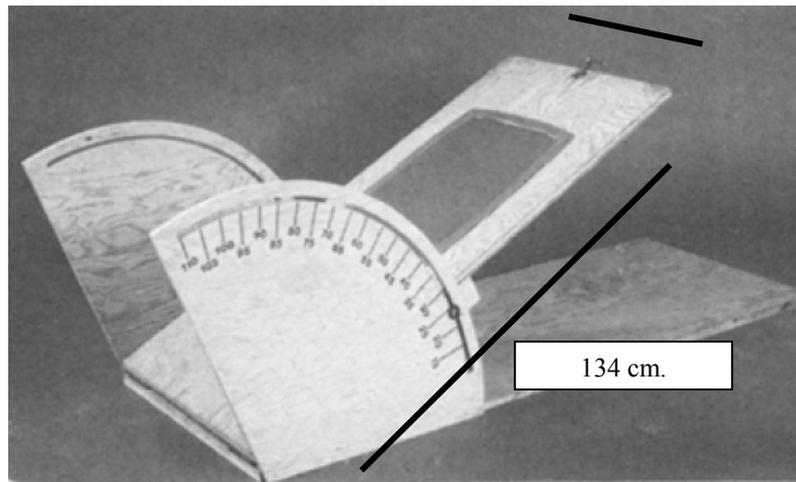
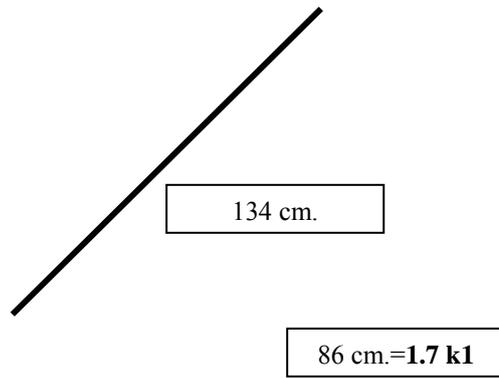
Se ha considerado el trabajo original de Rivlin A.S. y Tator C.H. en 1977, para extrapolar las dimensiones de la prueba a un conejo.

Teniendo una rata de peso 350-400 g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 18 cm. aproximadamente (**k**), diseñaron la prueba con un tablero móvil de 134 x 42 cm. Se debe enfatizar la importancia del ancho en este tablero para el soporte del animal así como la distancia hacia el suelo al caer, por ello se mantiene constante la longitud del tablero.

Entonces, para un conejo de 3800-4000g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 48 cm. aproximadamente (**k1**), se diseñó la prueba con un tablero móvil de 134 x 110 cm.

32 cm.=1.7 k





Diseño final del test del plano inclinado



Evaluación del conejo, 2 observadores

TEST DE LEVANTAMIENTO (MEDIDA POSTURAL): ²⁰²⁻²⁰³

DISEÑO DE LA PRUEBA

Se ha considerado el trabajo original Shumsky, J.S., Tobias, C.A., Tumolo, M., Long, W.D., Giszter, S.F. y Murray, M. 2003, para extrapolar las dimensiones de la prueba a un conejo.

Teniendo una rata de peso 200-250g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 15.5 cm. aproximadamente (**k**), diseñaron la prueba con un cilindro de plexiglás de 17.8 cm. de diámetro y 35.5 cm. de alto.

Entonces, para un conejo de 3800-4000g con una longitud *cabeza*-tronco (medida sin la cola) de 48 cm. aproximadamente (**k1**), se diseñó la prueba con un cilindro de vidrio de base hexagonal de 52.8 cm. de diámetro (lado de hexágono 26.4cm) y 110 cm. de alto.

52.8 cm.=**1.k1**



Diseño final de la prueba de levantamiento



Evaluación del conejo, 2 observadores

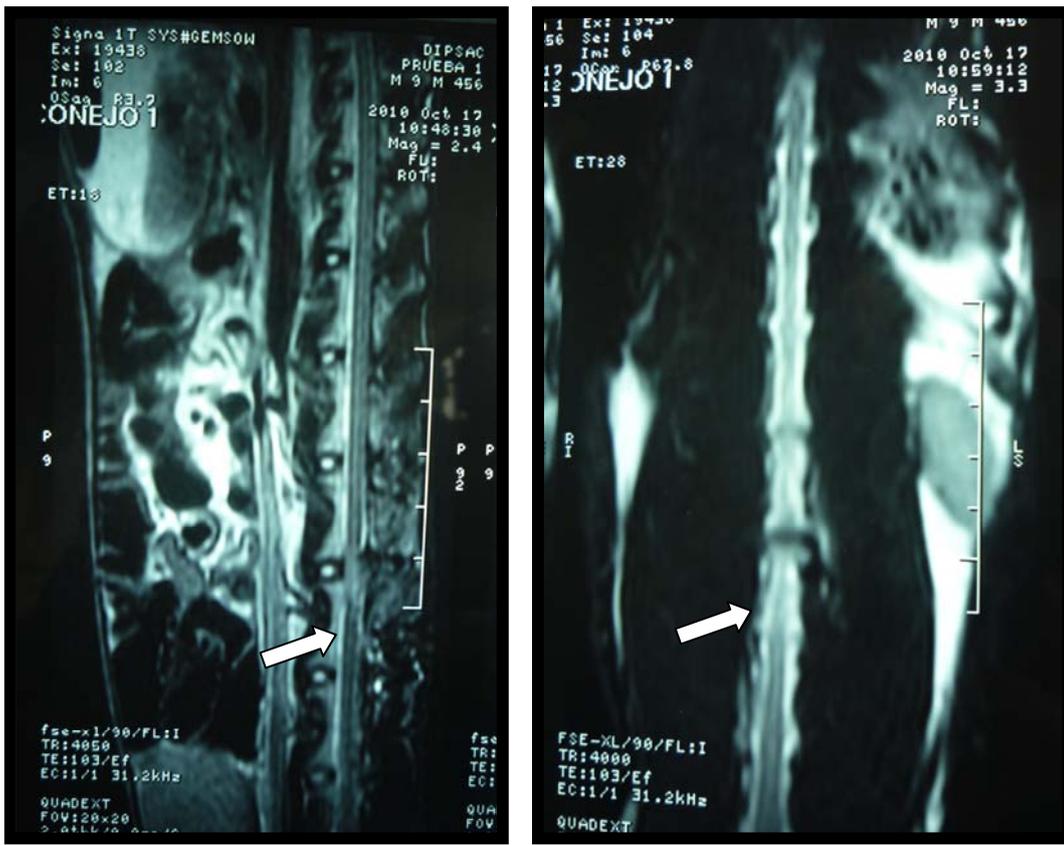




Se aprecia levantamiento sobre patas traseras “tipo 3”, los animales se alzan y extienden el tronco con los miembros posteriores doblados.

ANEXO N °15

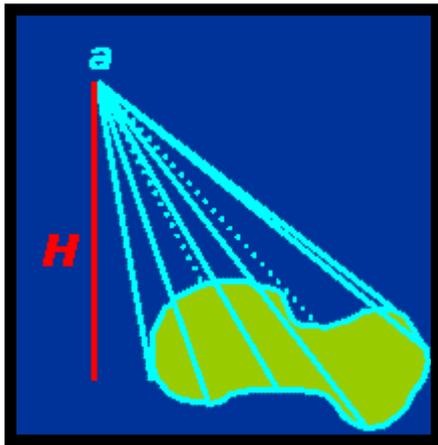
EVALUACIÓN RADIOLÓGICA PARA APLICACIÓN DE ENZIMA



A

B

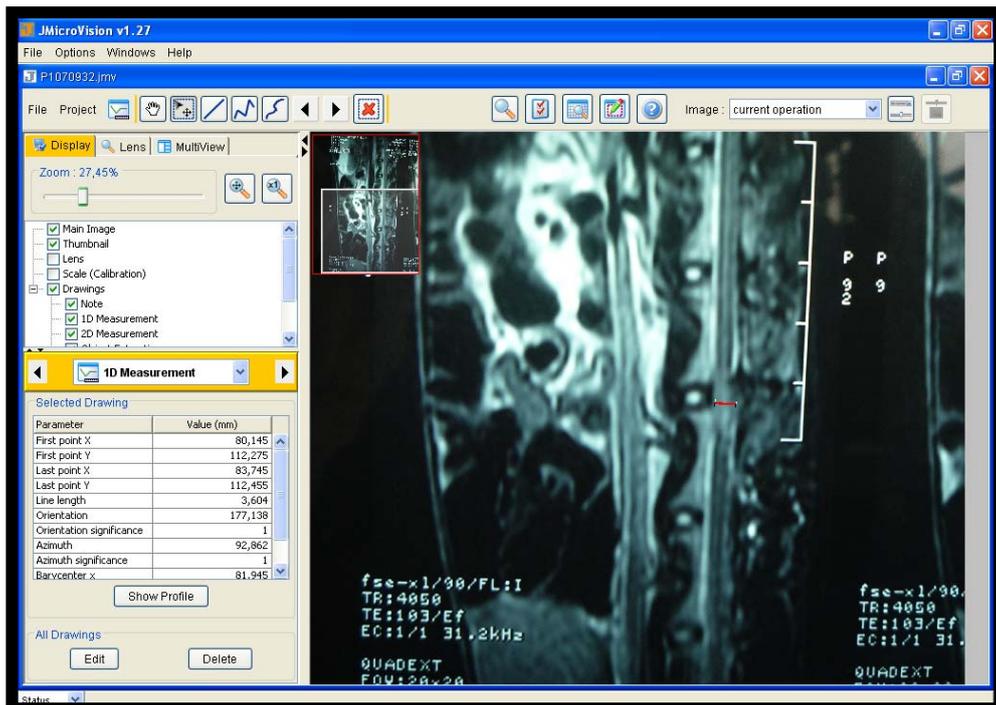
Resonancia magnética del conejo después de 60 días de inducida la lesión **(A)** Incidencia sagital T1. **(B)** Incidencia coronal T1. Se aprecia las zonas de lesión (flechas).

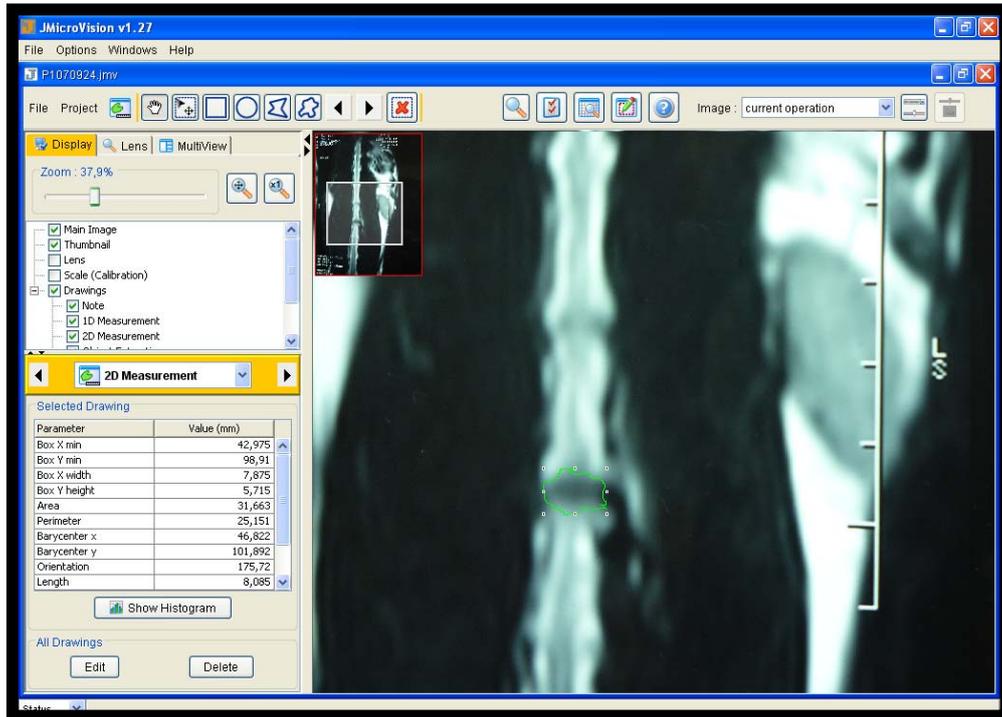


$$V_{cono} = \frac{1}{3} b \cdot H$$

V: Volumen
b: area de la base
H: altura

Formula matemática para determinar volumen de imagen cónica.





Determinación de área de base y altura a través del software analizador de imagen (JMicroVision Versión 1.2.7). Se consideró la calibración de 1pix = 0,045mm.

Considerando las dimensiones tomadas a través del software analizador de imagen, se tiene:

$$\text{Volumen: } 1/3 (31,663\text{mm}^2) (3,604\text{mm}): 38,0378 \text{ mm}^3$$

RAZONAMIENTO: Bajo la premisa de que la densidad media del cerebro es 1040 kg/m³, se puede aproximar que el volumen de cicatriz glial de 38,0378 mm³ corresponde a 39,5593 mg de cicatriz glial.

Concluimos entonces que en este animal con lesión medular de 2 meses, tomado aleatoriamente para la resonancia magnética tiene una cicatriz glial que corresponde en peso a 40 mg aprox. Este dato es de suma importancia para perfilar los análisis bioquímicos y precisar la cantidad de pancreatina necesaria para el mayor porcentaje de degradación.

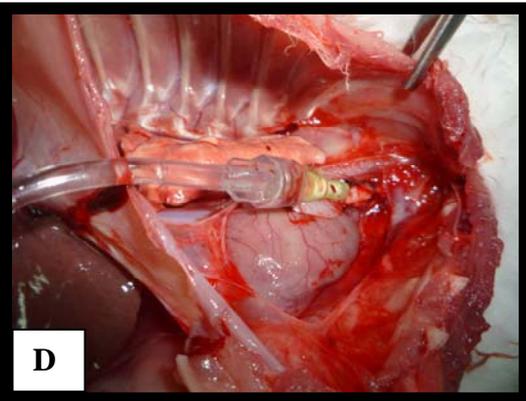
ANEXO N °16

MÉTODO DE FIJACIÓN Y PERFUSIÓN TRANSCARDIACA



Materiales: A y B) Soporte metálico, suero fisiológico, fijador (15 % paraformaldehído en buffer fosfato 0.1 M), equipo de venoclisis y guantes. C) Ketamina y xilazina D) Equipo de disección.

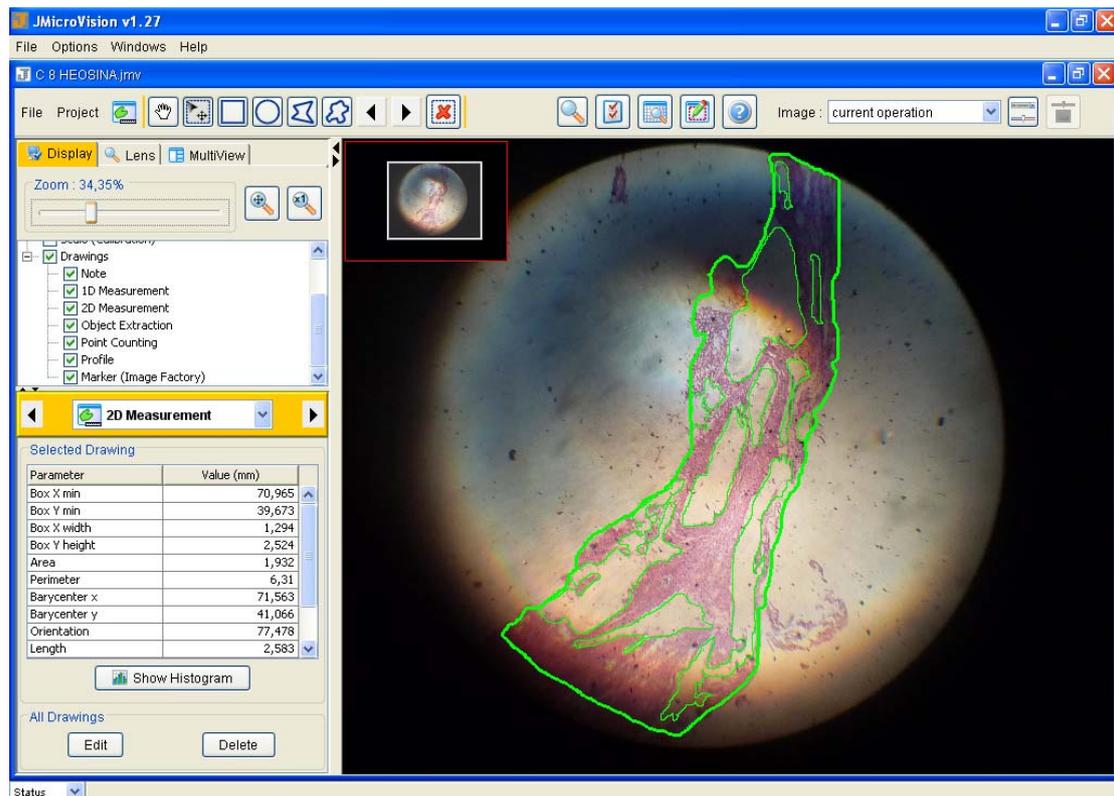




Procedimiento: **A)** Anestesiado el conejo con ketamina y xilazina a dosis de 35 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente. **B)** Se realizó una incisión por línea media. **C)** Se hizo un corte a lo largo del esternón de aprox. 8 cm largo, se expuso el esternón. Se utilizó tijeras agudas para cortar el diafragma lateralmente en ambos lados y también en dirección cefálica a través de costillas y en paralelo a los pulmones. Se visualizó la aorta ascendente y se colocó directamente un catéter 18 G (técnica modificada a la tradicional que ingresa por ventrículo izquierdo) no es necesario colocar fórceps. Se perfunde NaCl 0,9% en volumen de 500 ml seguido del fijador (15 % paraformaldehído en buffer fosfato 0.1 M) en volumen 500 ml a una presión de perfusión de 120 cm H₂O. **D)** Se realizó una incisión en circulación suprahepática para controlar el volumen sanguíneo de retorno. Se profundizó hasta observar la rigidez corporal. Se extrajo posteriormente la médula espinal de manera rápida por abordaje posterior.

ANEXO N °17

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE REGENERACIÓN NEURONAL DETERMINACIÓN DE CAVIDADES (PORCENTAJE): GRUPO CONTROL



J MicroVision medición de cavidades en mm^2 :

A total: 615,796

A1: 50,530

A2: 19,139

A3: 46,200

A4: 25,642

A5: 8,311

A6: 51,679

A7: 6,473

A8: 5,143

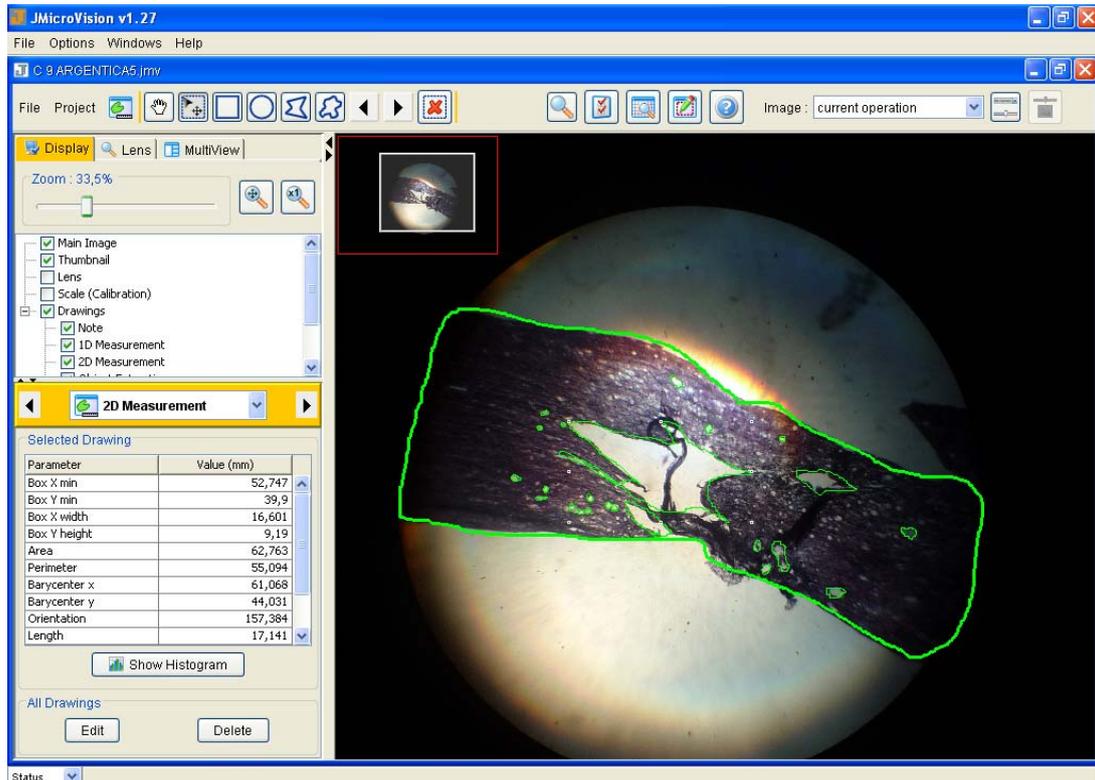
A9: 2,985

A10: 1,932

A11: 3,917

Sumatoria de A1-A11: 176,471 mm^2

DETERMINACIÓN DE CAVIDADES (PORCENTAJE): GRUPO ENZIMA



J Micro Vision medición de cavidades en mm^2 :

A total: 876,137

A1: 5,943

A2: 62,763

A3: 7,024

A4: 2,348

A5: 1,308

A6: 0,493

A7: 0,710

A8: 0,330

A9: 1,867

A10: 0,369

A11: 0,152

A12: 0,226

A13: 0,143

A14: 0,571

A15: 0,215

A16: 0,275

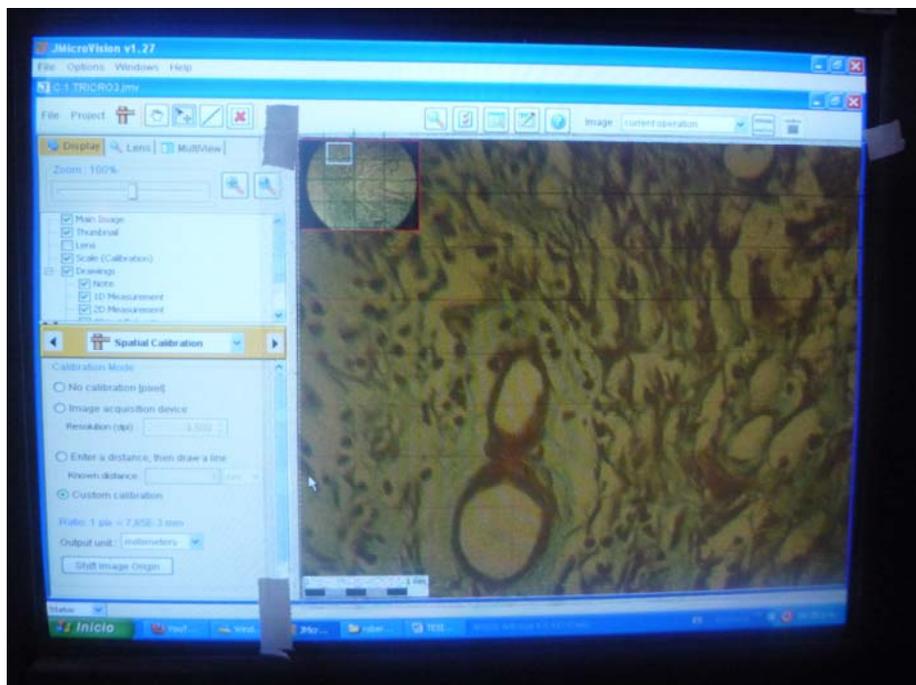
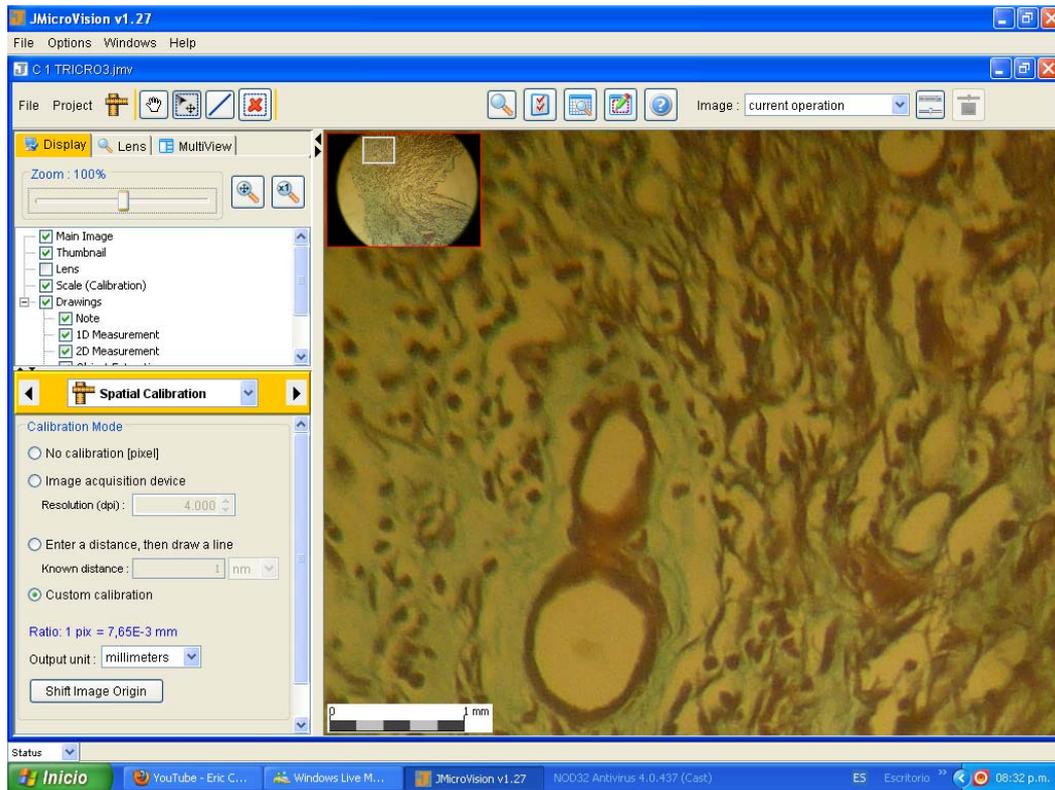
A17: 0,839

A18: 1,023

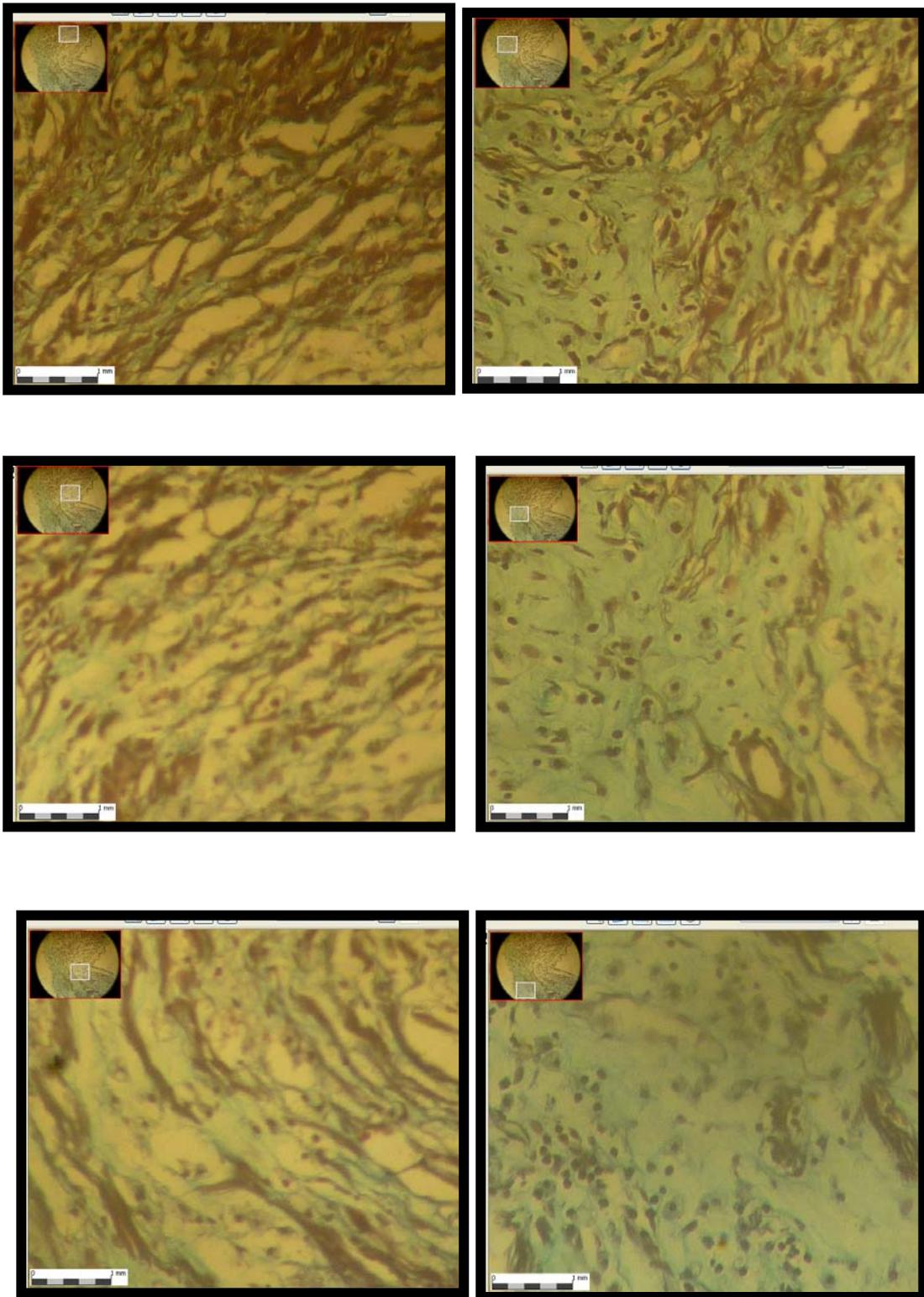
A19: 0,934

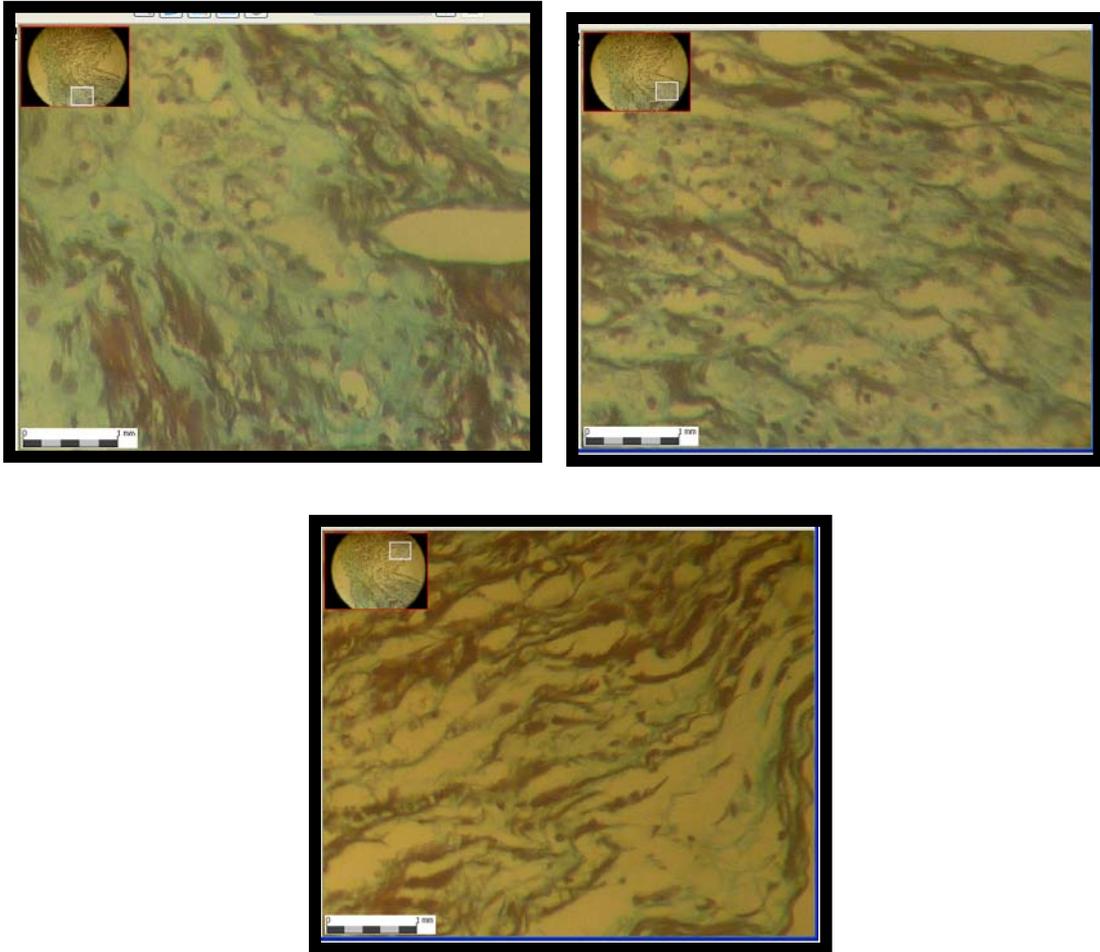
Sumatoria de A1-A19: **76,718 mm^2**

PRESENCIA DE TEJIDO CONECTIVO (PORCENTAJE): GRUPO CONTROL



Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.



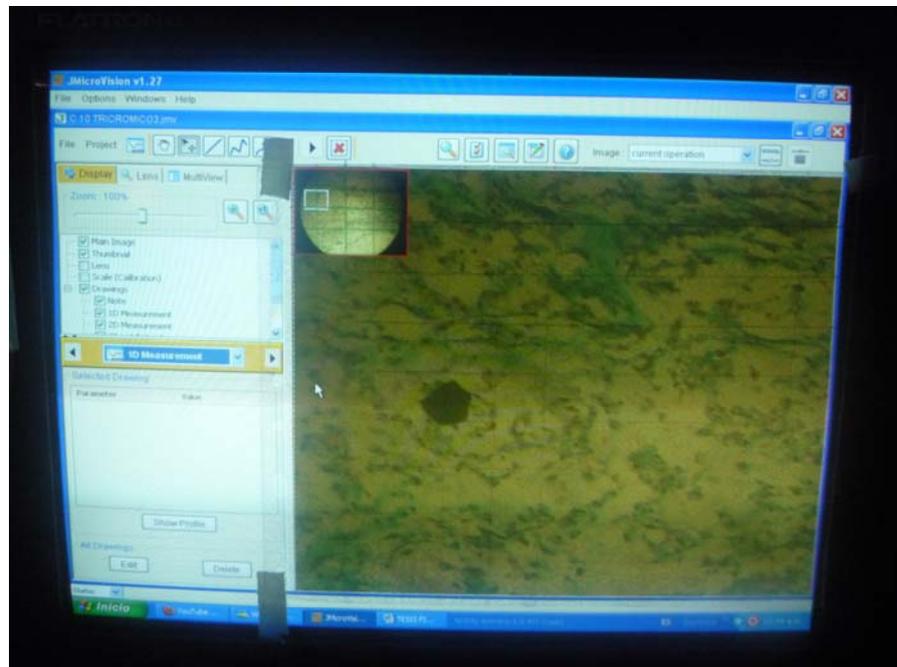
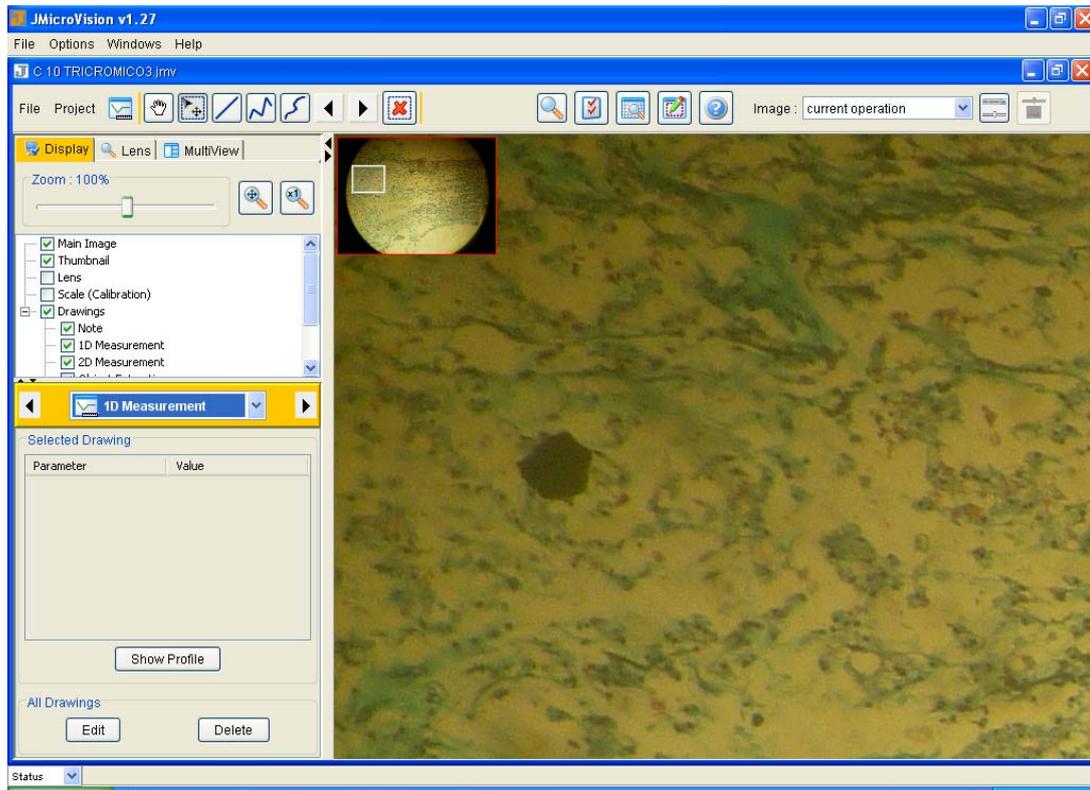


Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de 0,25mm². Se contabilizó el número de cuadrados ocupados con tejido conectivo (color verde) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

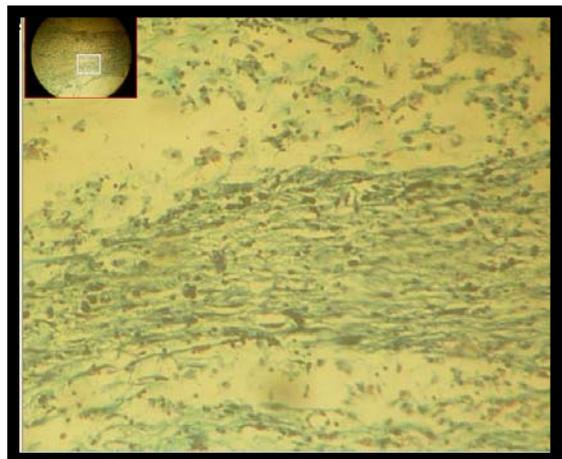
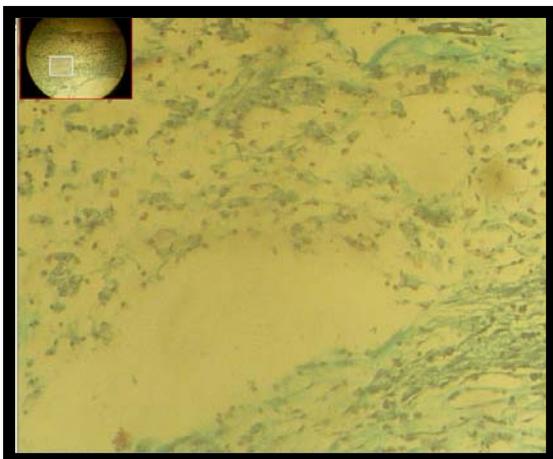
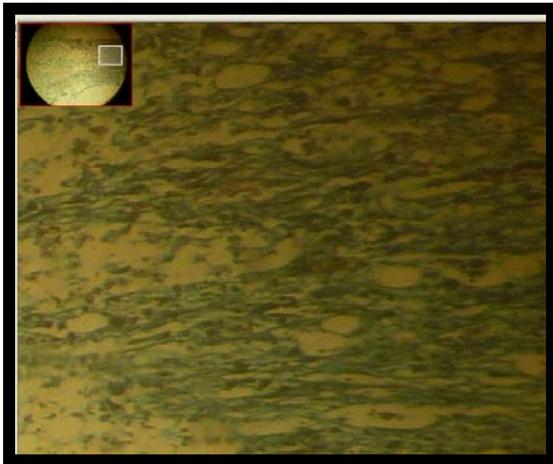
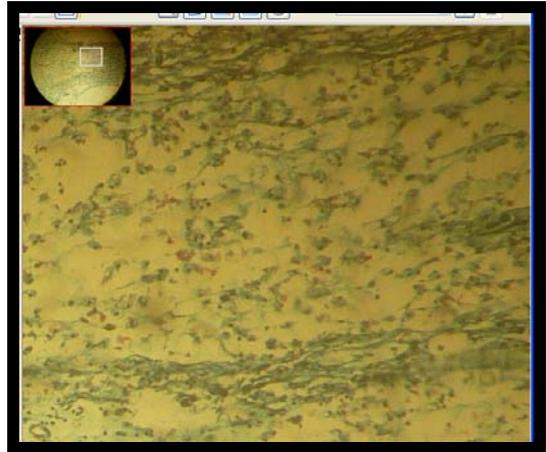
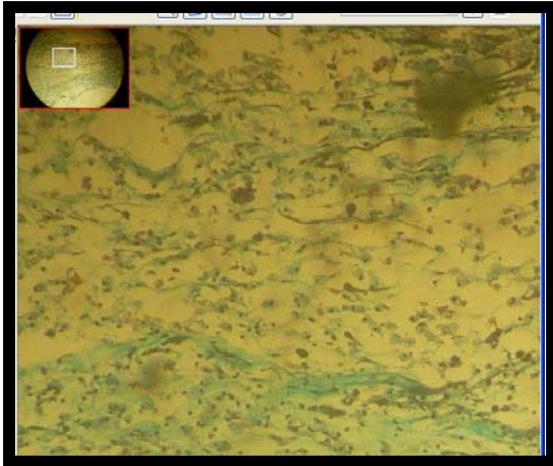
Campo1: 70/99
Campo2: 59/99
Campo3: 85/99
Campo4: 63/99
Campo5: 84/99
Campo6: 66/99
Campo7: 84/99
Campo8: 76/99
Campo9: 60/99
Campo10: 53/99

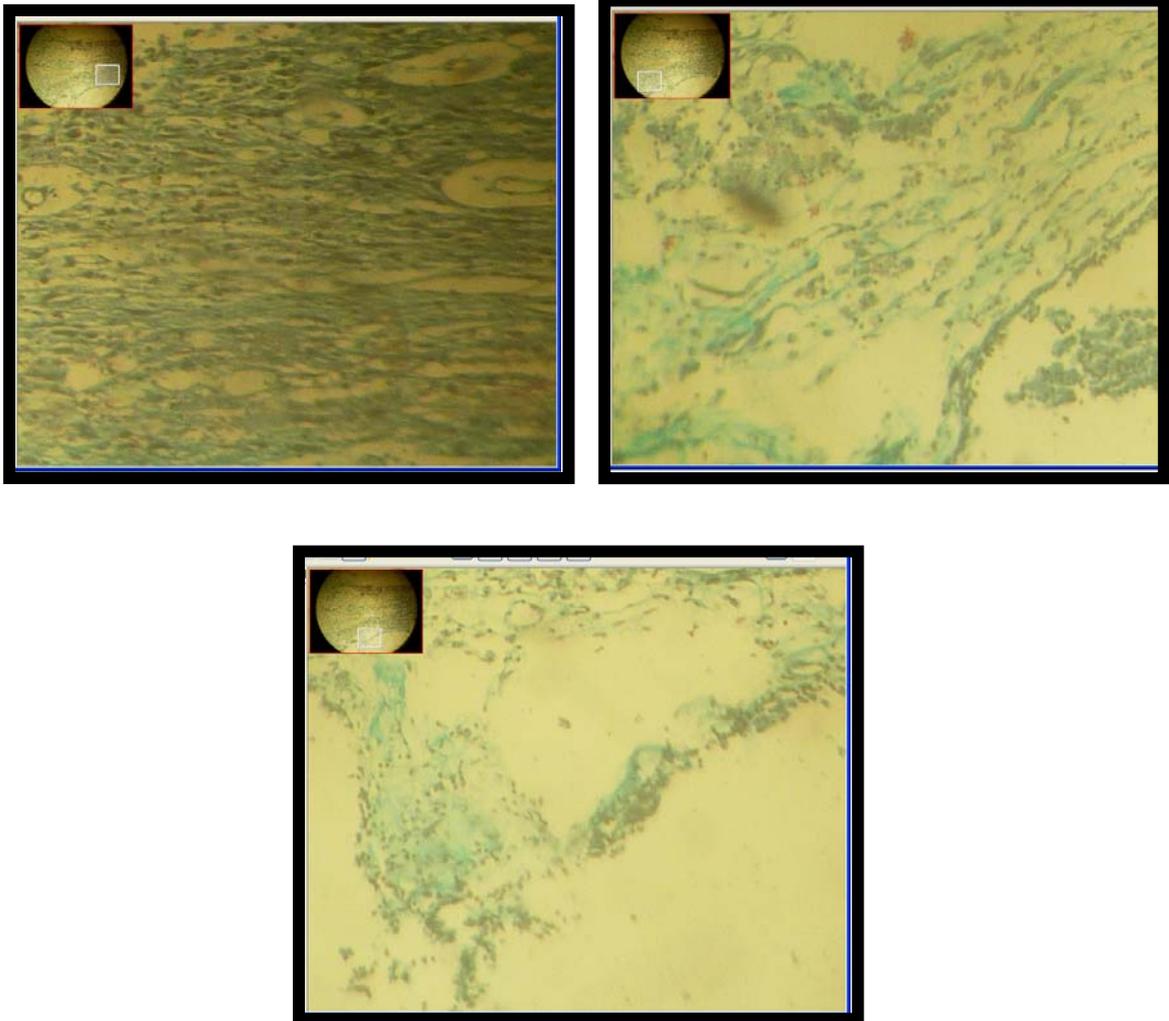
Suma de campos $700/990 \times 100 = 70,70\%$

PRESENCIA DE TEJIDO CONECTIVO (PORCENTAJE): GRUPO ENZIMA



Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.



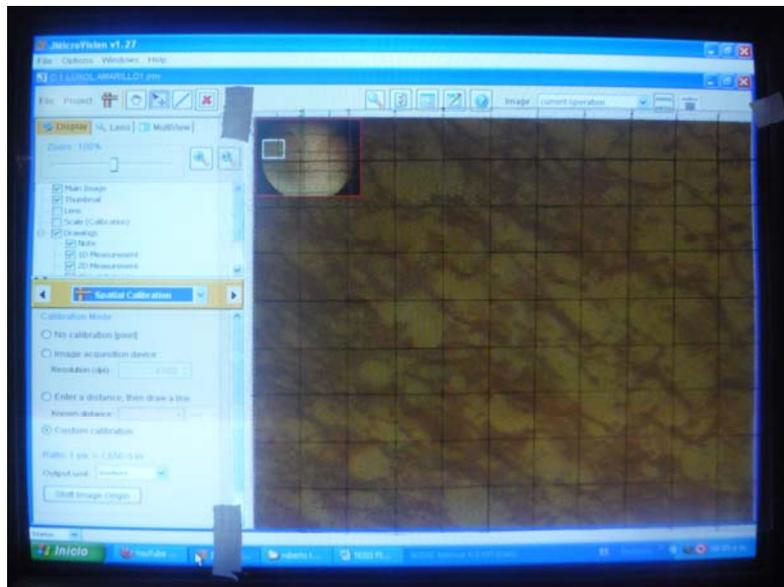
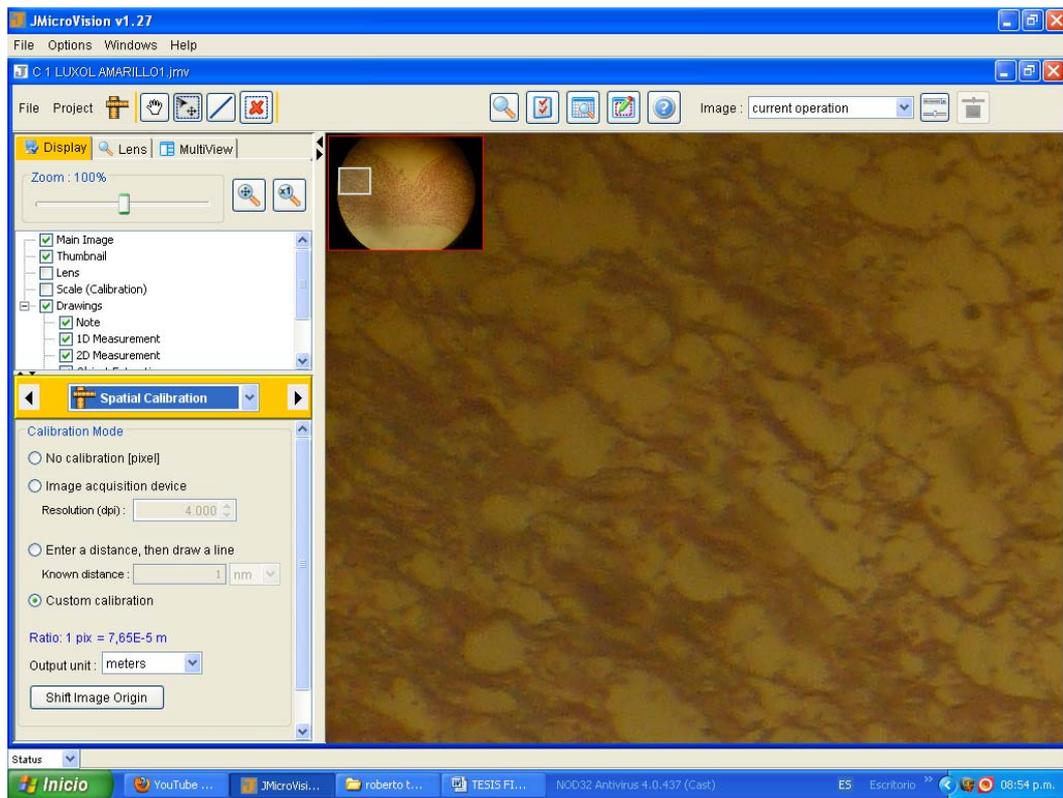


Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de $0,25\text{mm}^2$. Se contabilizó el número de cuadrados ocupados con tejido conectivo (color verde) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

Campo1: 25/99
Campo2: 32/99
Campo3: 40/99
Campo4: 57/99
Campo5: 18/99
Campo6: 26/99
Campo7: 47/99
Campo8: 86/99
Campo9: 22/99
Campo10: 19/99

Suma de campos $372/990 \times 100 = 37,57\%$

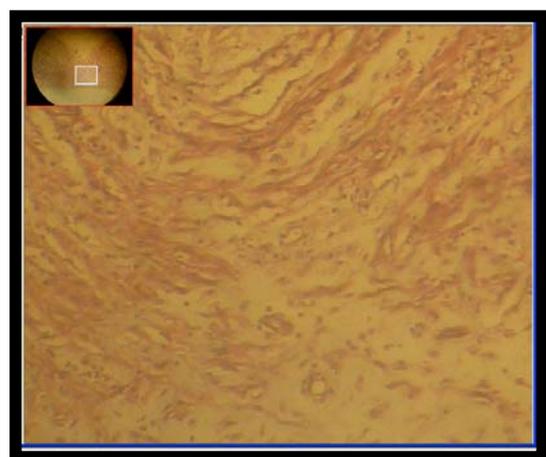
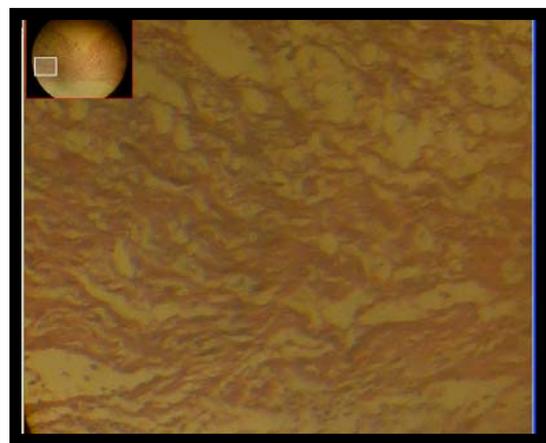
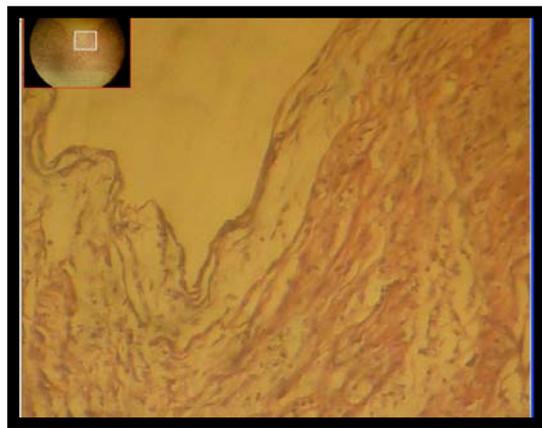
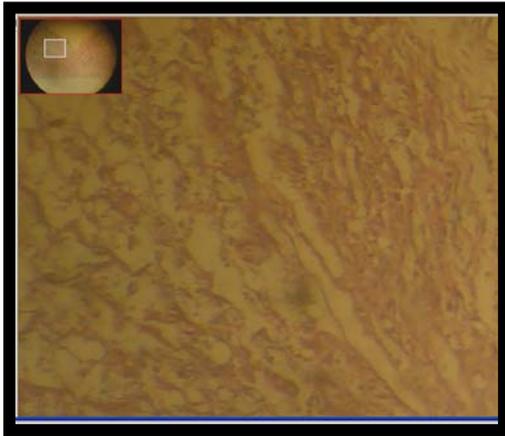
DETERMINACIÓN DE MIELINA (PORCENTAJE): GRUPO CONTROL

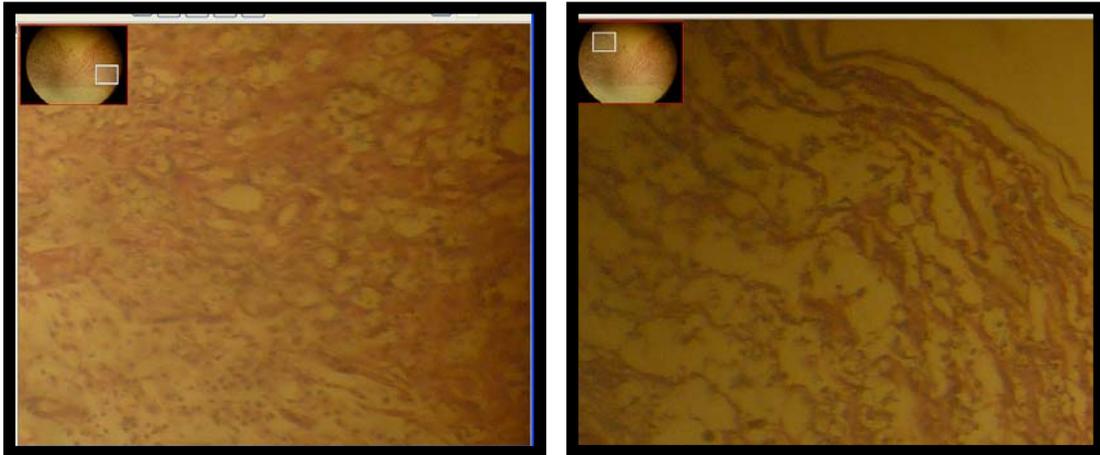


Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.

Aplicación de pancreatina en modelo de lesión medular experimental como medio de regeneración neuronal.

Roberto Jesús Chávez Asmat



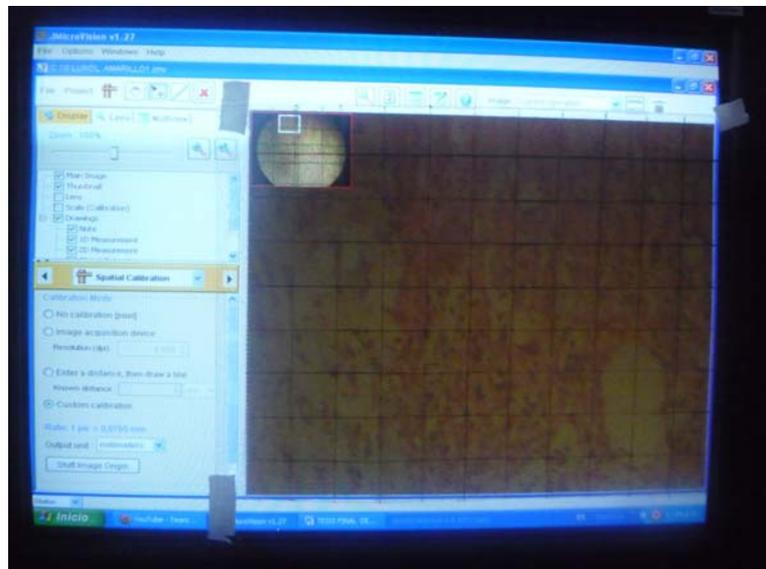
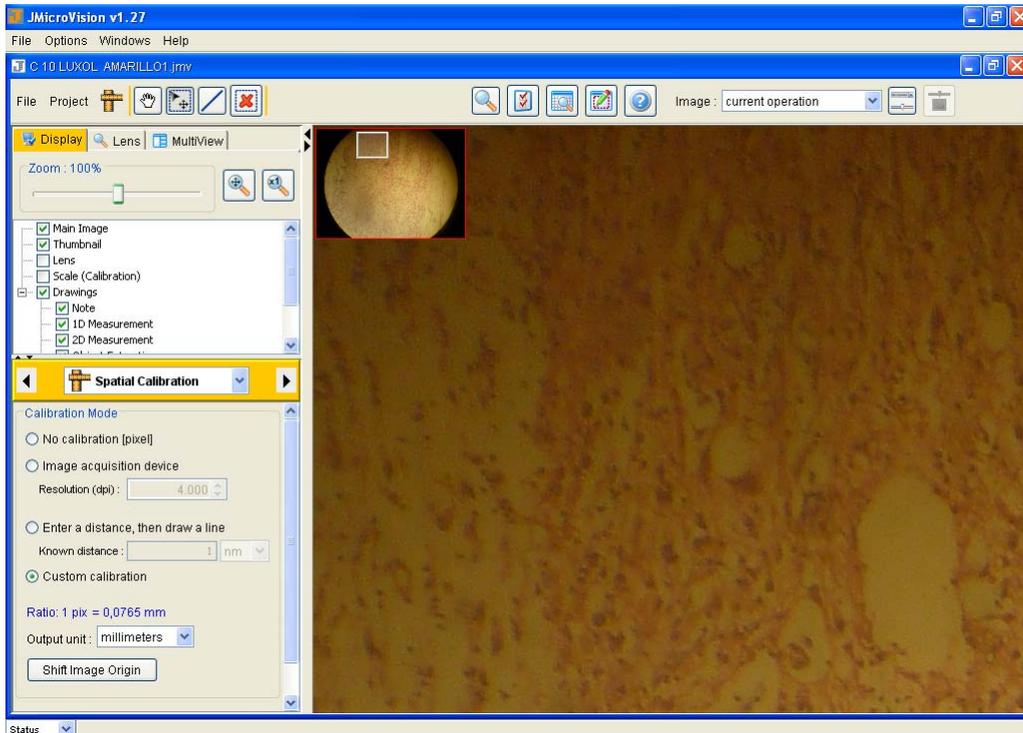


Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de $0,25\text{mm}^2$. Se contabilizó el número de cuadrados ocupados con mielina (color azul) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

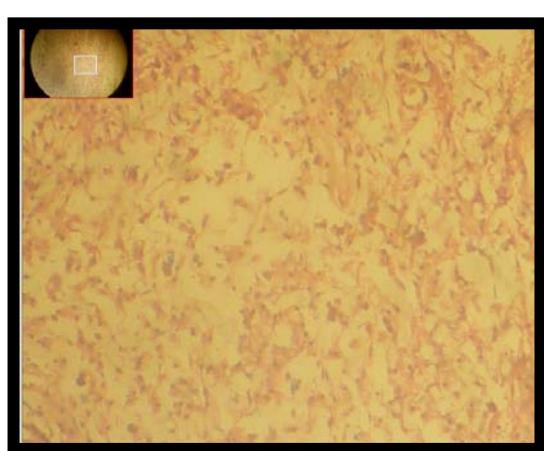
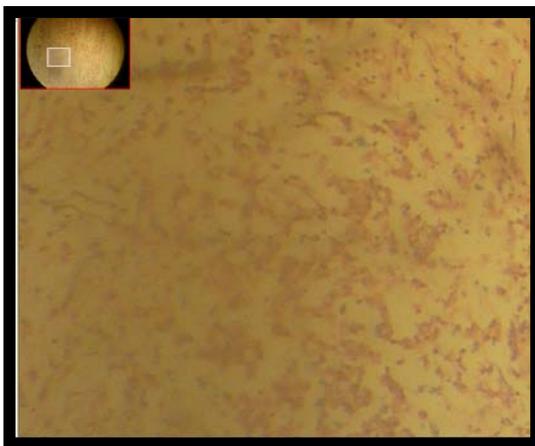
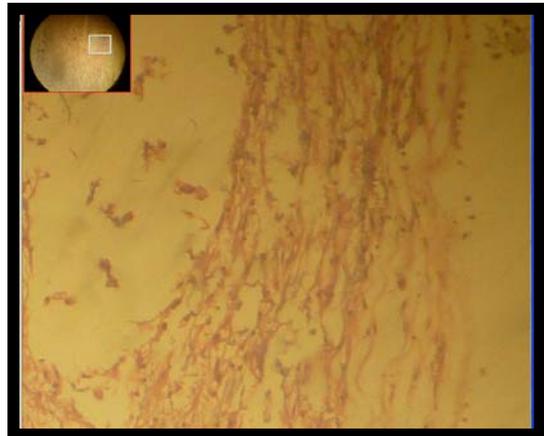
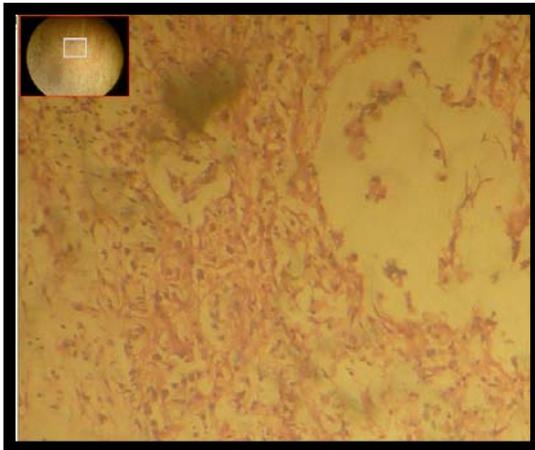
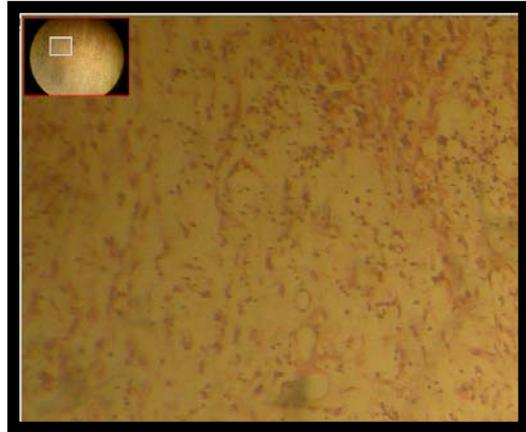
Campo1: 6/99
Campo2: 5/99
Campo3: 0/99
Campo4: 24/99
Campo5: 5/99
Campo6: 4/99
Campo7: 0/99
Campo8: 20/99
Campo9: 13/99
Campo10: 21/99

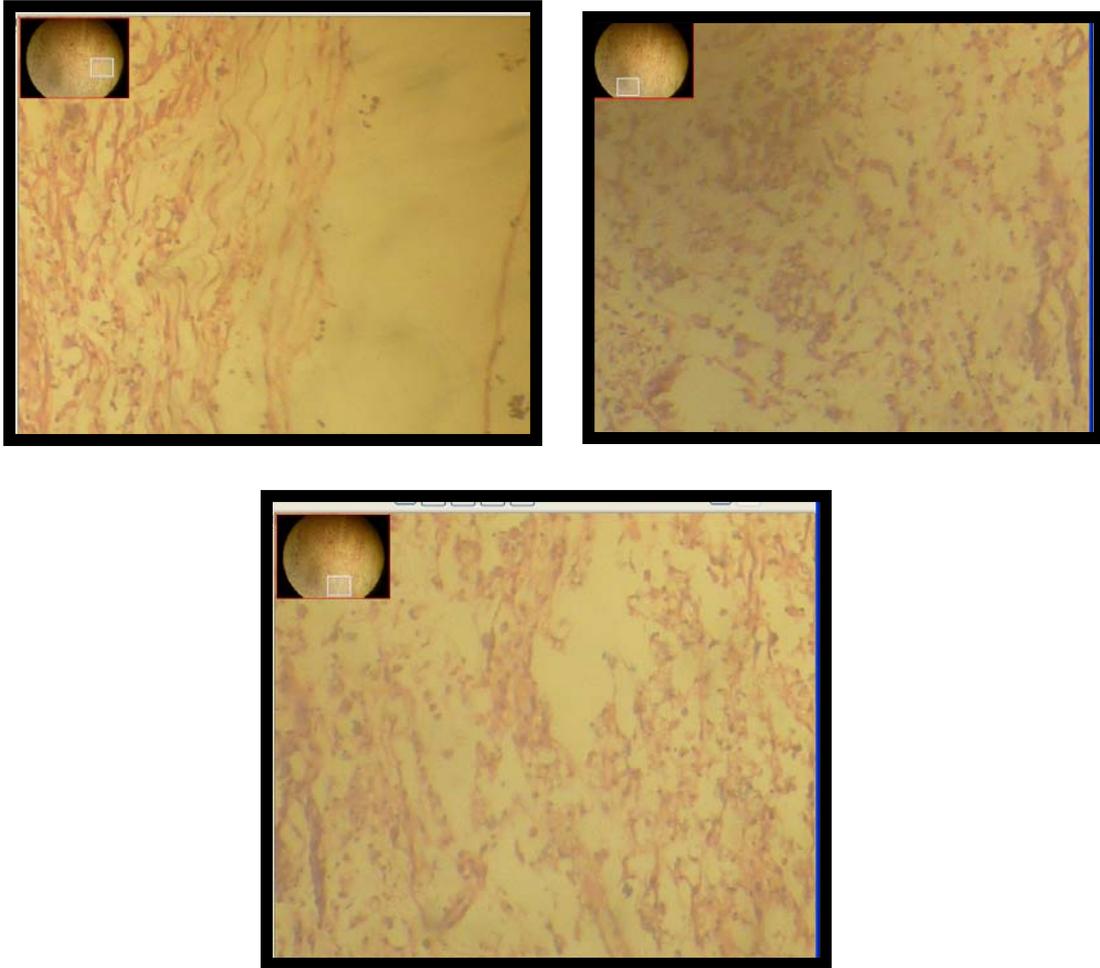
Suma de campos $98/990 \times 100 = 9,89\%$

DETERMINACIÓN DE MIELINA (PORCENTAJE): GRUPO ENZIMA



Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.





Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de $0,25\text{mm}^2$. Se contabilizó el número de cuadrados ocupados con mielina (color azul) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

Campo1: 0/99

Campo2: 0/99

Campo3: 6/99

Campo4: 4/99

Campo5: 0/99

Campo6: 0/99

Campo7: 0/99

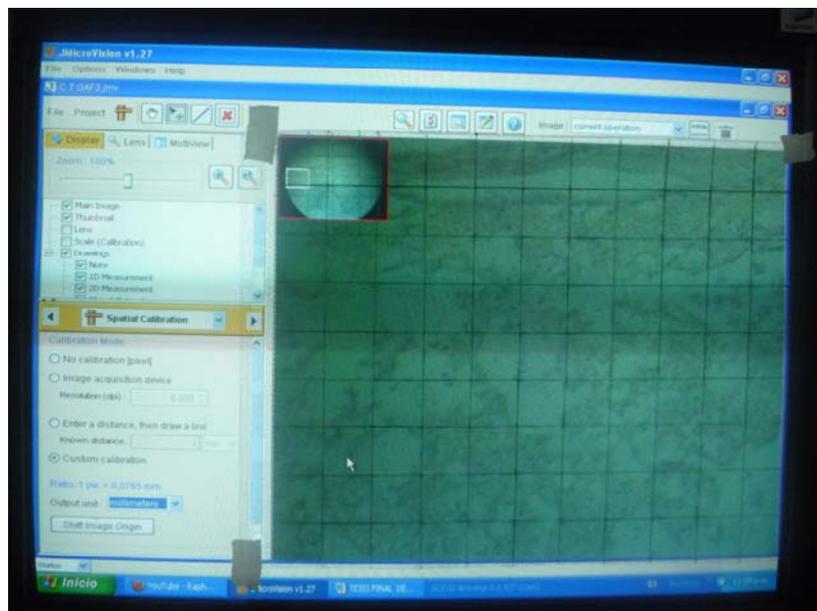
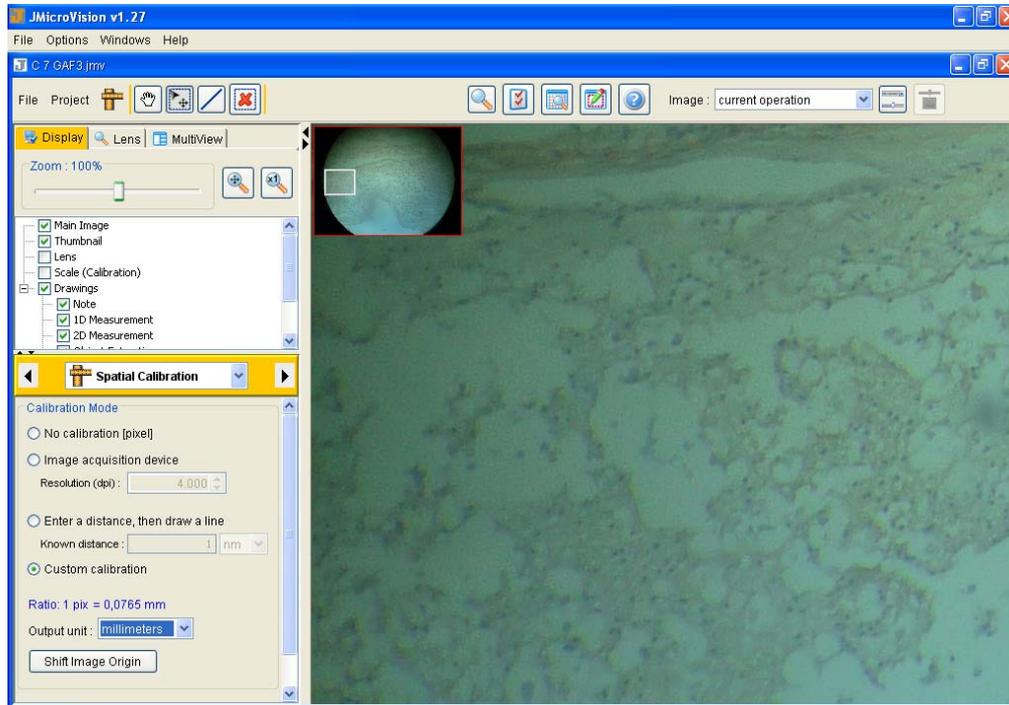
Campo8: 0/99

Campo9: 0/99

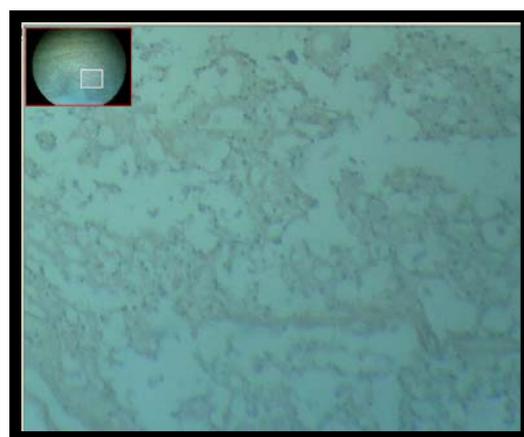
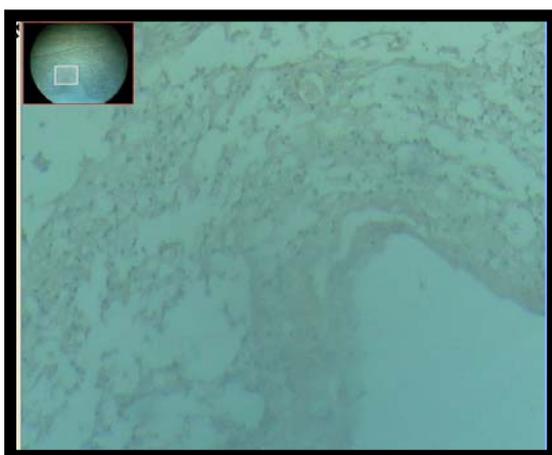
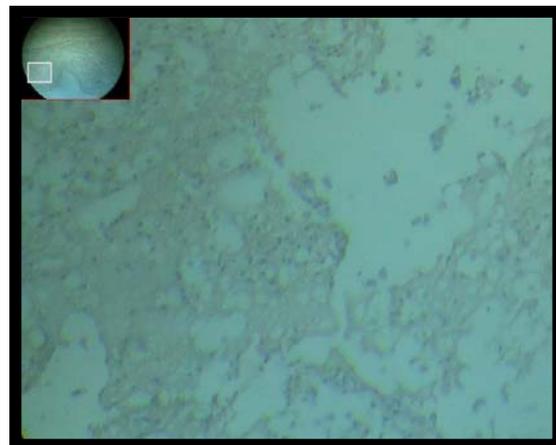
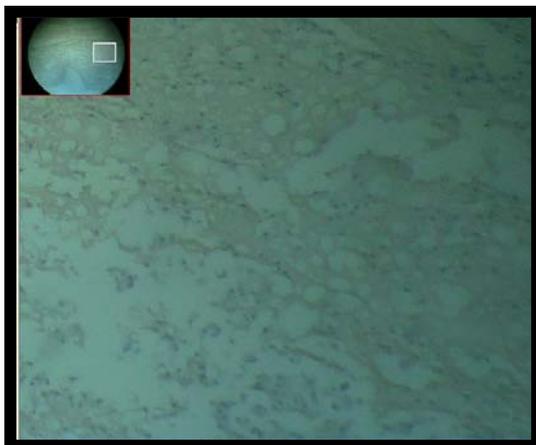
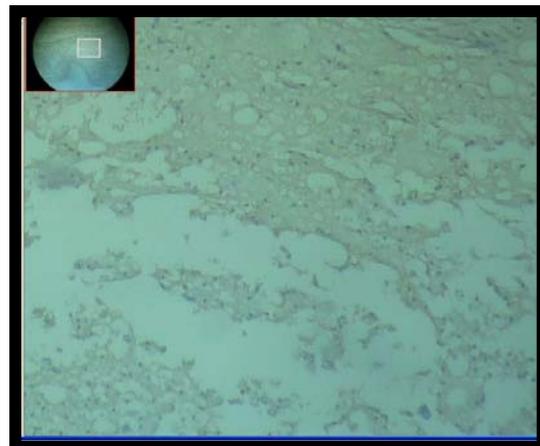
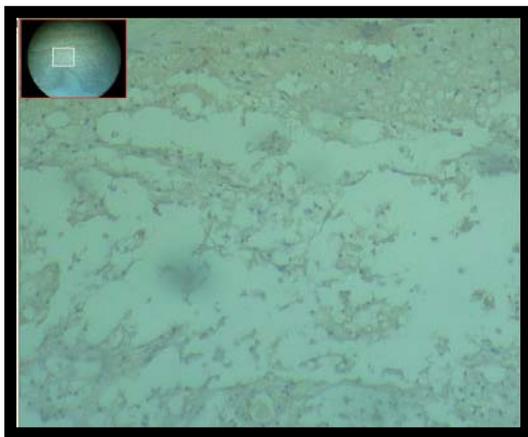
Campo10: 0/99

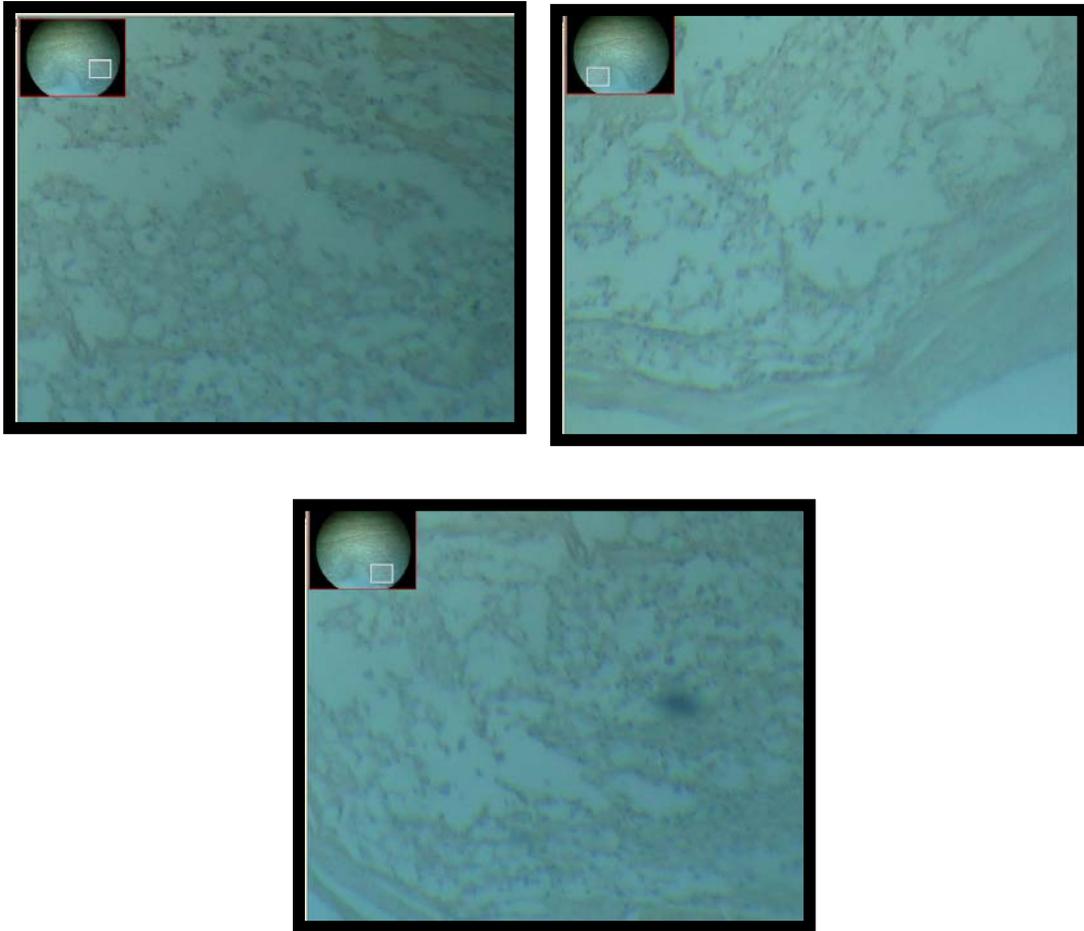
Suma de campos $10/990 \times 100 = 1,01\%$

DETERMINACIÓN DE ASTROCITOS (PORCENTAJE): GRUPO CONTROL



Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.



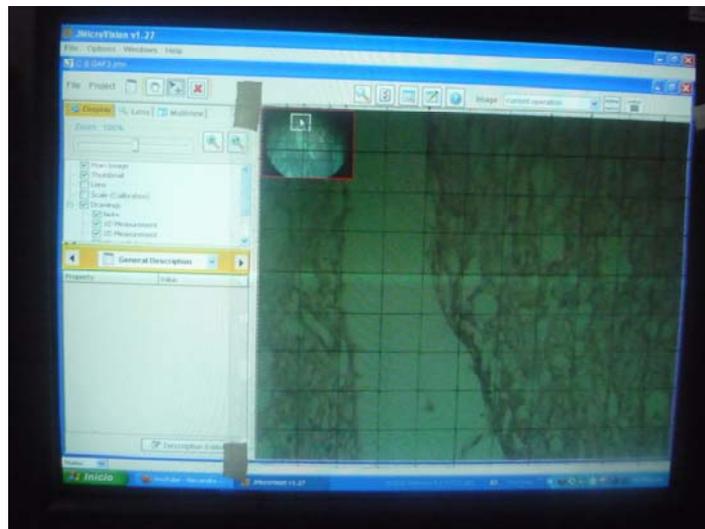
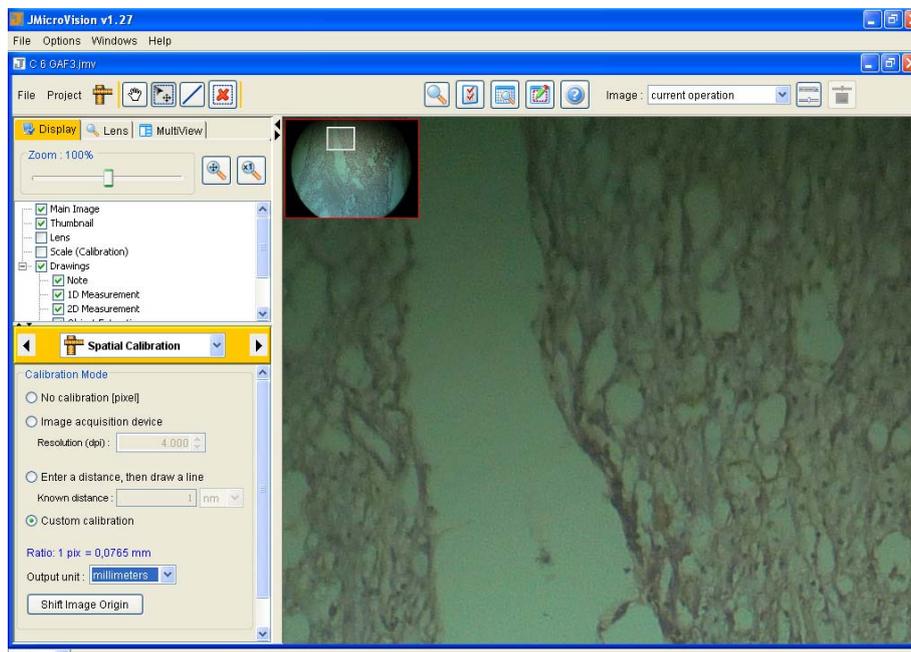


Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de $0,25\text{mm}^2$. Se contabilizó el número de cuadrados ocupados de astrocitos (color marrón oscuro brillante) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

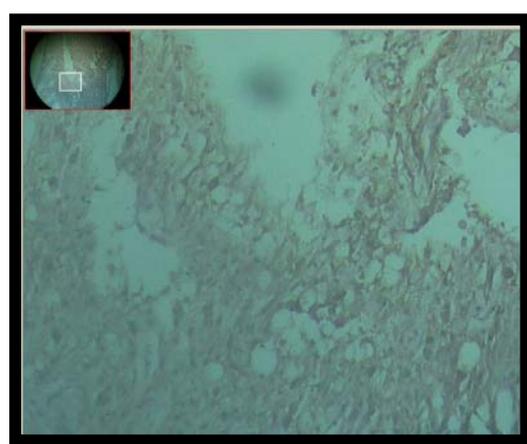
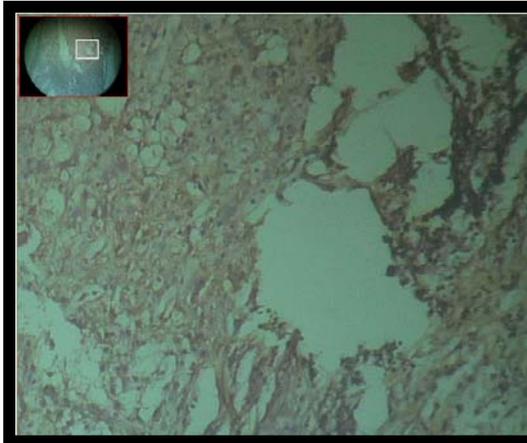
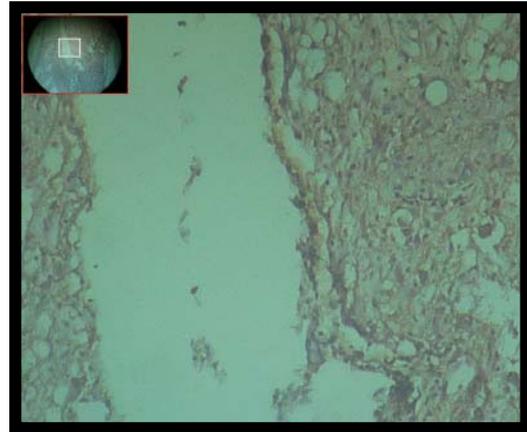
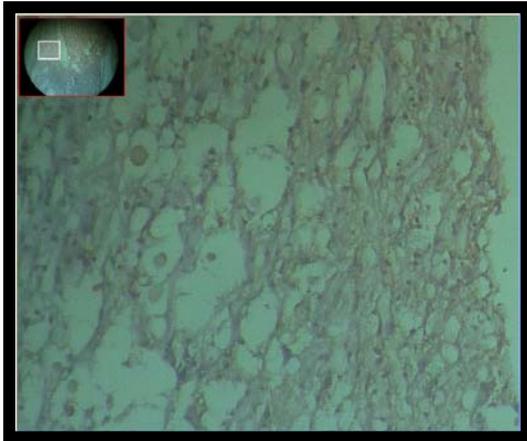
Campo1: 9/99
Campo2: 7/99
Campo3: 14/99
Campo4: 10/99
Campo5: 7/99
Campo6: 6/99
Campo7: 12/99
Campo8: 13/99
Campo9: 11/99
Campo10: 11/99

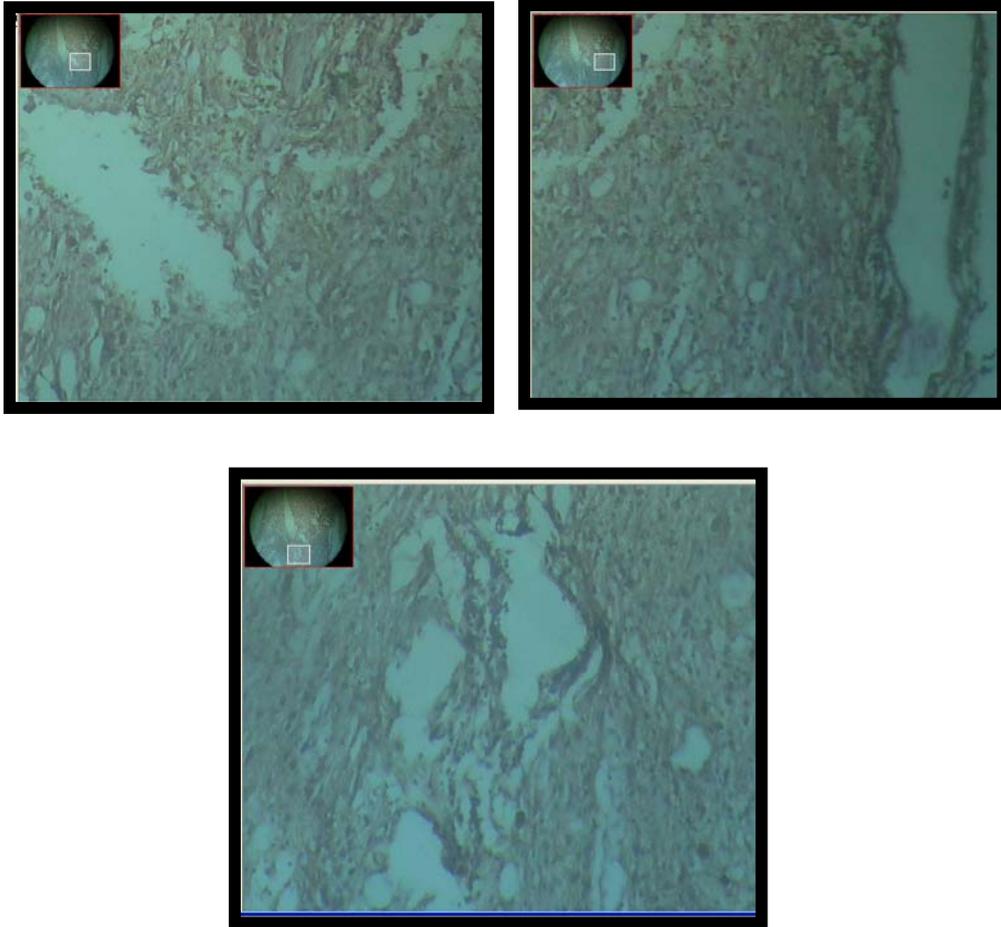
Suma de campos $100/990 \times 100 = \mathbf{10,10\%}$

DETERMINACIÓN DE ASTROCITOS (PORCENTAJE): GRUPO ENZIMA



Se pegó en la superficie de la pantalla una mica de 28x18cm con 99 casilleros de 2cm de lado.





Se toma 10 campos, cada campo se dividió en 99 cuadrados de $0,25\text{mm}^2$. Se contabilizó el número de cuadrados ocupados de astrocitos (color marrón oscuro brillante) y se determinó la proporción de cuadrados ocupados/total de cuadrados.

Campo1: 16/99

Campo2: 29/99

Campo3: 22/99

Campo4: 25/99

Campo5: 12/99

Campo6: 6/99

Campo7: 15/99

Campo8: 25/99

Campo9: 21/99

Campo10: 13/99

Suma de campos $184/990 \times 100 = \mathbf{18,58\%}$

ANEXO N °18

MÉTODO DE INDUCCIÓN DE LESIÓN MEDULAR EXPERIMENTAL (MÉTODO DE HASHIMOTO)

COMPARACIÓN PRE Y POST LESIÓN MEDULAR

PRUEBA	PRE LESIÓN	POST LESIÓN "2MESES"	<i>P</i> *
BBB (Media+/-DE)	20,05+/-1,42	8,10+/-5,38	0,005
Tarlov (Media+/-DE)	4,87+/-0,21	2,80+/-1,03	0,005
Campo abierto (Media+/-DE)	44,43+/-16,83	5,00+/-2,46	0,005
Plano inclinado (Media+/-DE)	61,00+/-3,16	44,50+/-6,85	0,005
Levantamiento (Media+/-DE)	1,9+/-2,23	0,00+/-0,00	0,017

DE: Desviación estándar. * Prueba Wilcoxon

ANEXO N °19

FORMACIÓN DE GRUPOS

COMPARACIÓN CLÍNICA BASAL ENTRE GRUPO CONTROL Y ENZIMA

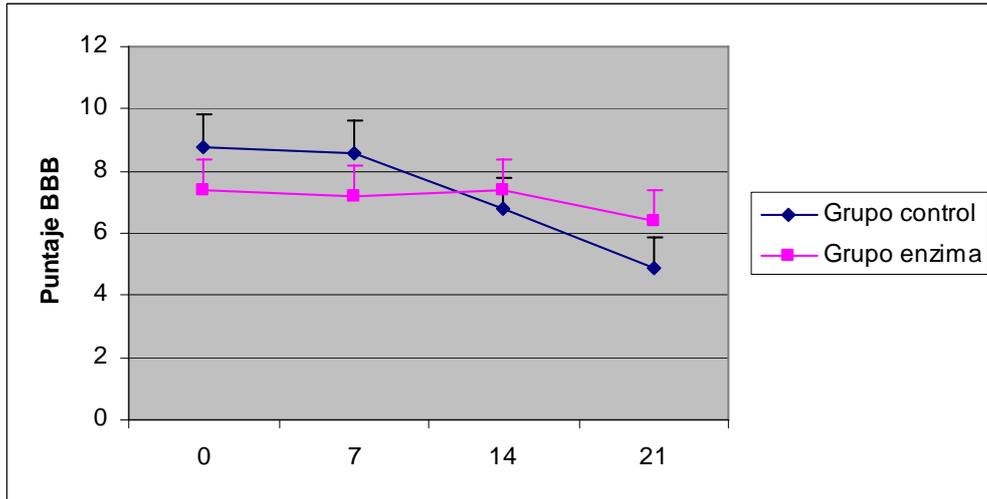
PRUEBA	GRUPO CONTROL	GRUPO ENZIMA	<i>P</i>*
BBB (Media+/-DE)	8,80+/-5,26	7,40+/-6,02	0,548
Tarlov (Media+/-DE)	2,80+/-1,09	2,80+/-1,09	1,000
Campo abierto (Media+/-DE)	4,90+/-2,41	5,10+/-2,79	0,841
Plano inclinado (Media+/-DE)	43,00+/-7,58	46,00+/-6,52	0,548
Levantamiento (Media+/-DE)	0,00+/-0,00	0,00+/-0,00	1,000

DE: Desviación estándar. * Prueba U de Mann - Whitney

ANEXO N °20

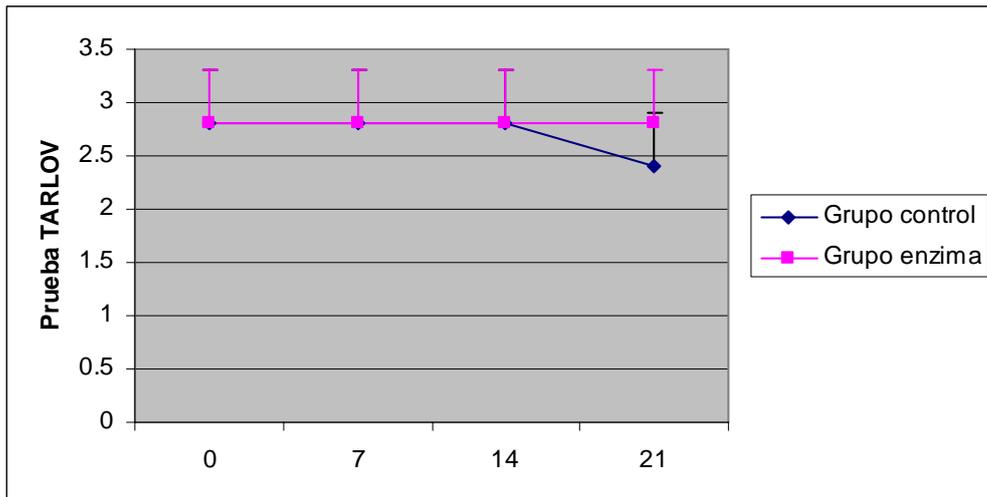
EVALUACIÓN CLÍNICA DE REGENERACIÓN NEURONAL

PUNTAJE DE PRUEBA BBB SEGÚN DÍA DE EVALUACIÓN



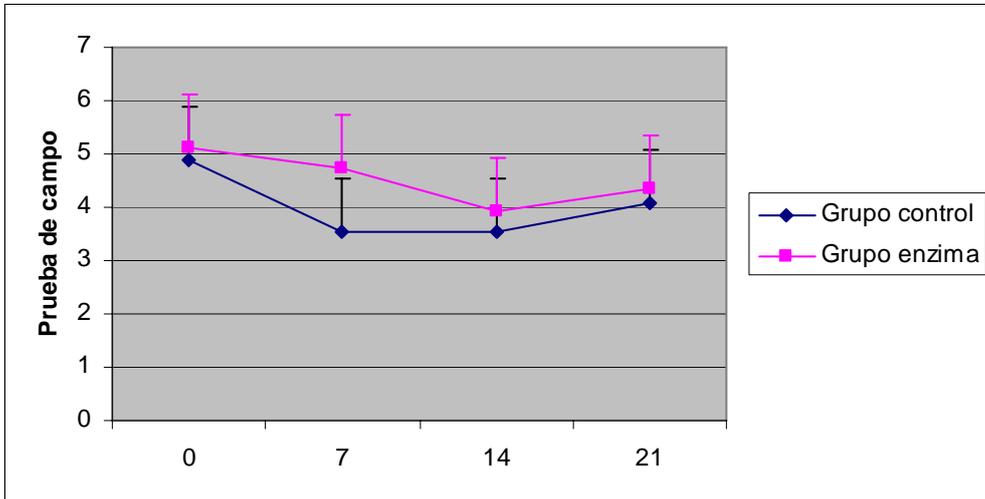
Día 0 ($p = 0,548$) día 7 ($p=0,690$) día 14 ($p=0,421$) y día 21 ($p=0,548$) Prueba U de Mann - Whitney

PUNTAJE DE PRUEBA TARLOV SEGÚN DÍA DE EVALUACIÓN



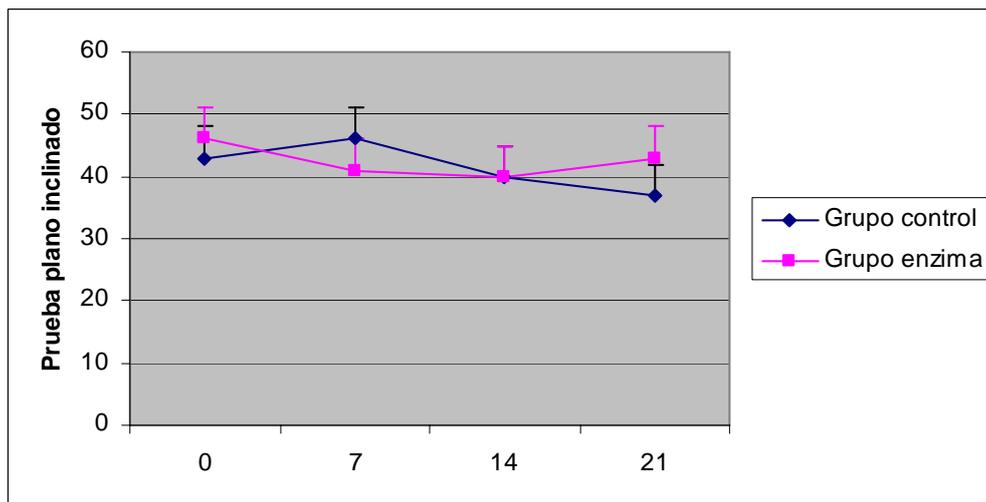
Día 0 ($p = 1,000$) día 7 ($p=1,000$) día 14 ($p=1,000$) y día 21 ($p=0,548$) Prueba U de Mann - Whitney

PUNTAJE DE PRUEBA DE CAMPO SEGÚN DÍA DE EVALUACIÓN



Día 0 ($p=0,841$) día 7 ($p=1,000$) día 14 ($p=0,841$) y día 21 ($p=1,000$) Prueba U de Mann - Whitney

PUNTAJE DE PRUEBA PLANO INCLINADO SEGÚN DÍA DE EVALUACIÓN



Día 0 ($p=0,548$) día 7 ($p=0,151$) día 14 ($p=1,000$) y día 21 ($p=0,421$) Prueba U de Mann - Whitney

ANEXO N °21

EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE REGENERACIÓN NEURONAL

COMPARACIÓN HISTOPATOLÓGICA ENTRE GRUPO CONTROL Y ENZIMA

HISTOPATOLOGÍA	GRUPO CONTROL	GRUPO ENZIMA	<i>p</i> *
Formación de cavidades mm² (Media+/-DE)	194,88 +/-86,83	52,60+/-26,50	0,008
Formación de cavidades (%)	20,05	7,63	0,042
Contenido de tejido conectivo (%)	49,85	41,53	0,222
Área mielinizada (%)	9,80	8,64	1,000
Presencia de astrocitos (%)	15,18	17,63	0,421

DE: Desviación estándar. * Prueba *U* de Mann-Whitney

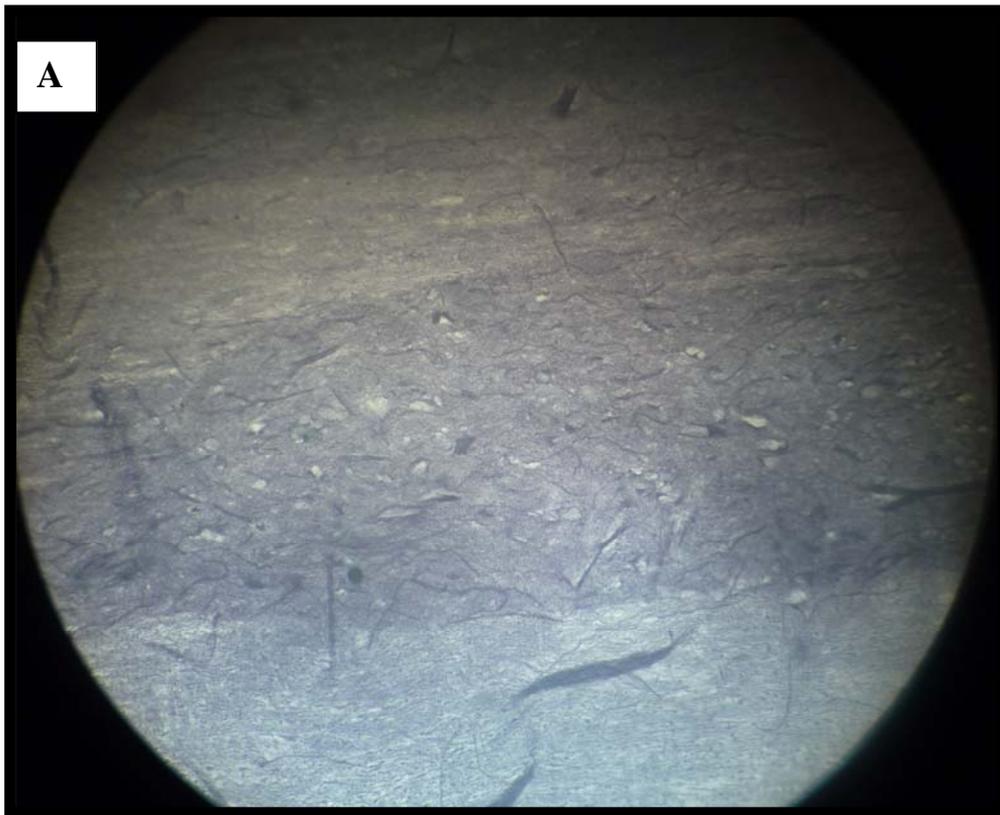
ANEXO N °22

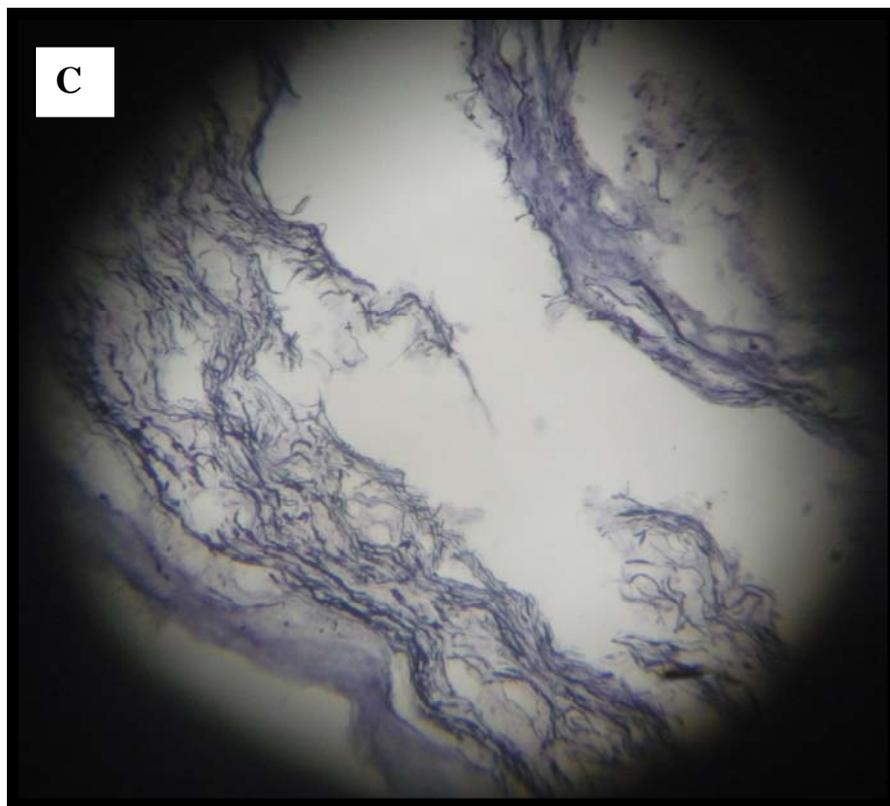
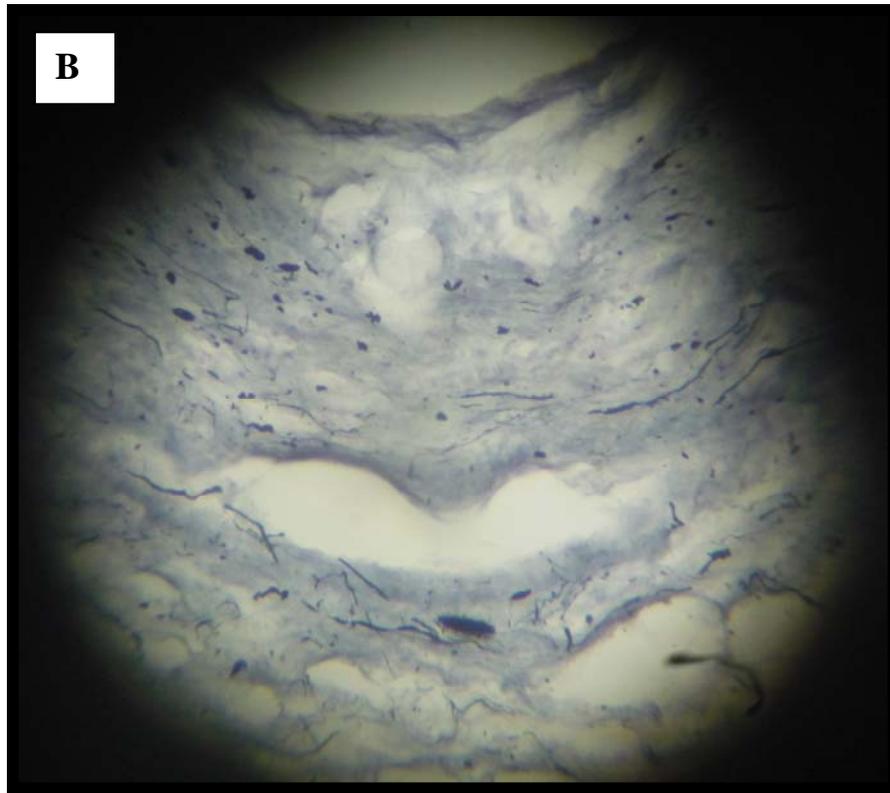
REGENERACIÓN NEURONAL

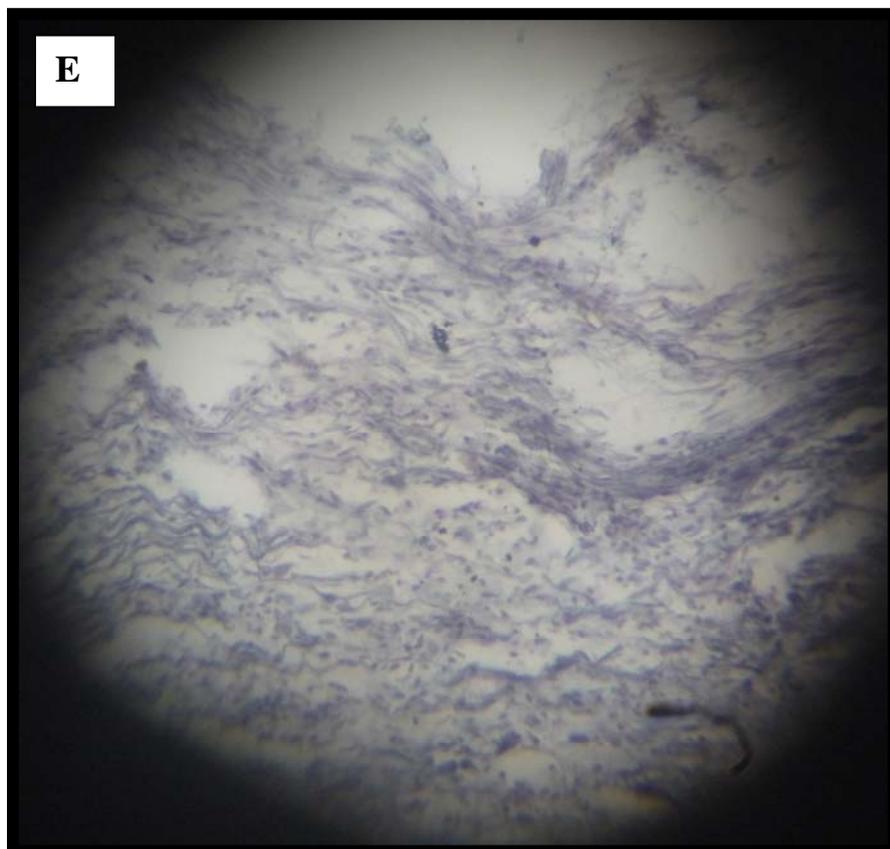
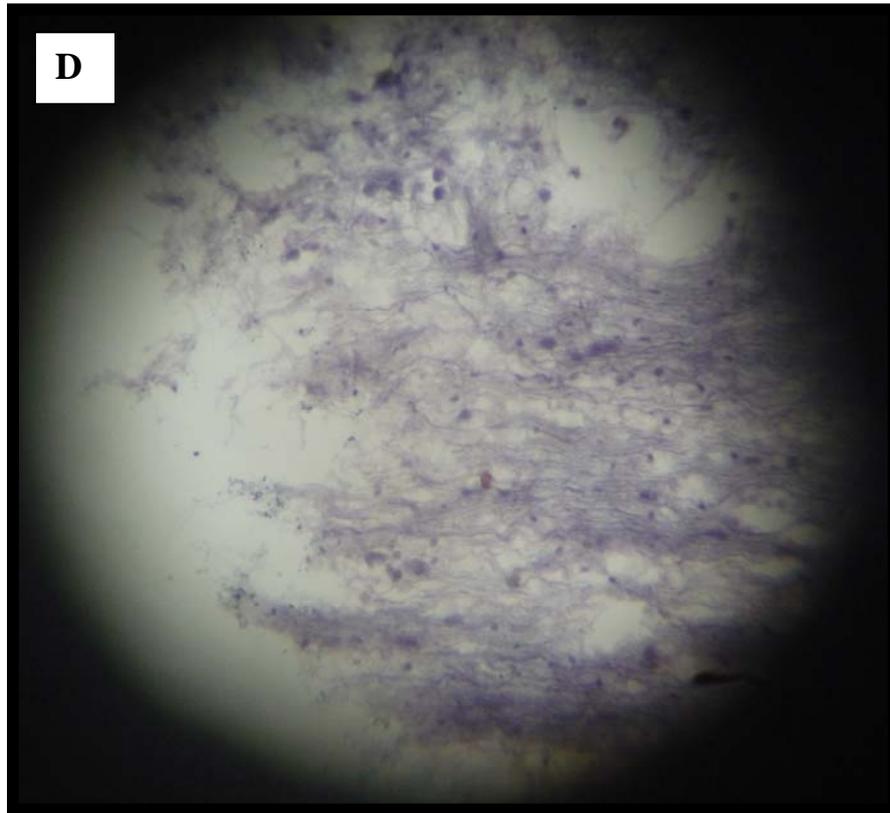
(A) Imagen sagital de médula espinal normal de conejo *Nueva Zelandia* nivel torácica 12, se distingue con claridad sustancia gris y blanca. Tinción de Reumond x 12,5.

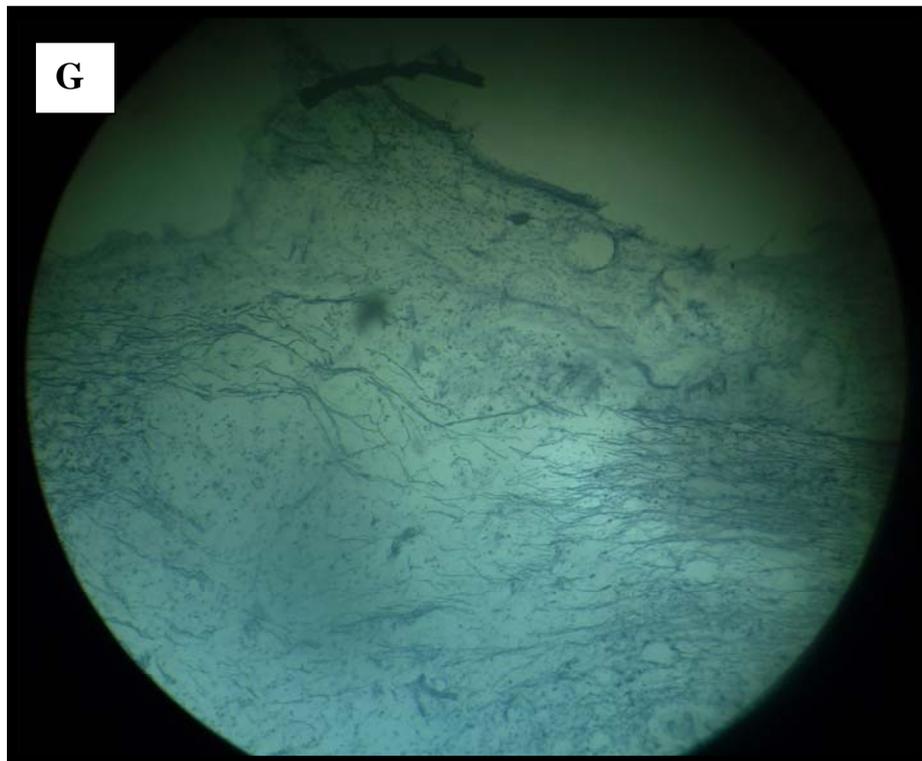
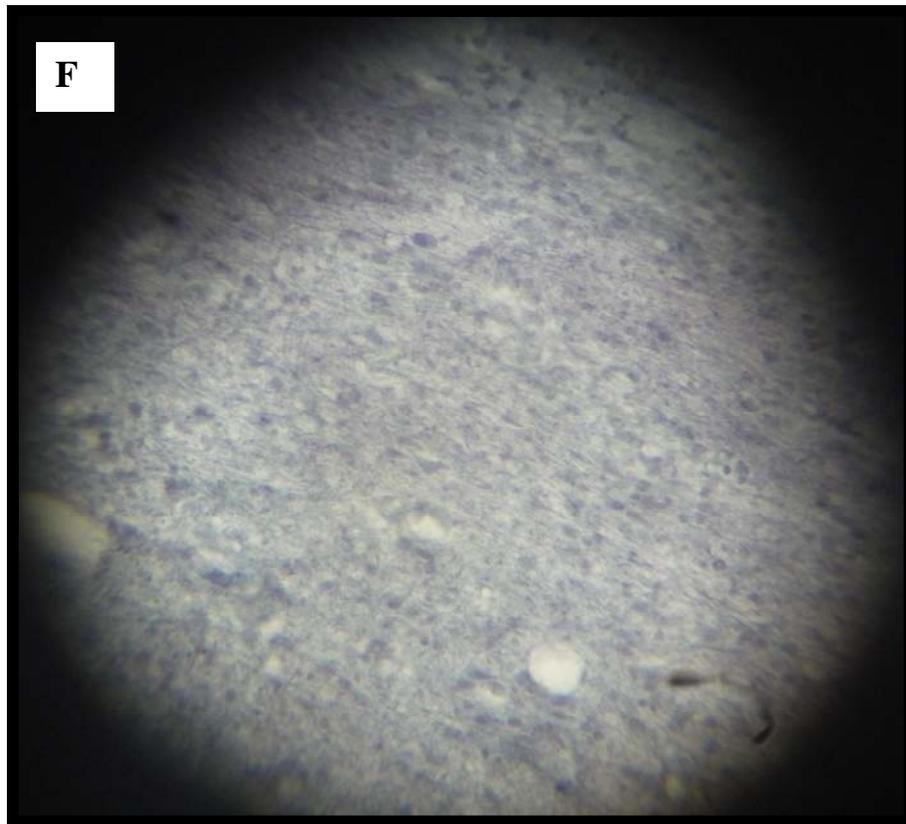
(B, D, F, H e J) Zona de cicatriz glial, imagen sagital de médula espinal nivel torácica 12 del grupo control, se aprecia ninguna o poca axonogénesis. Tinción de Reumond x 12,5.

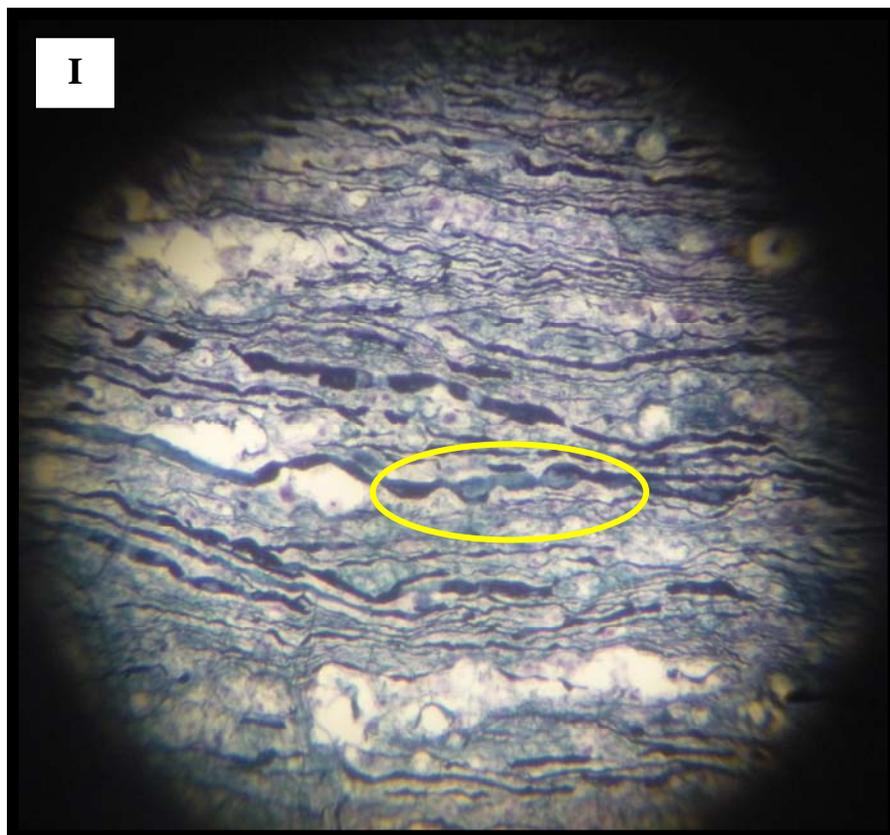
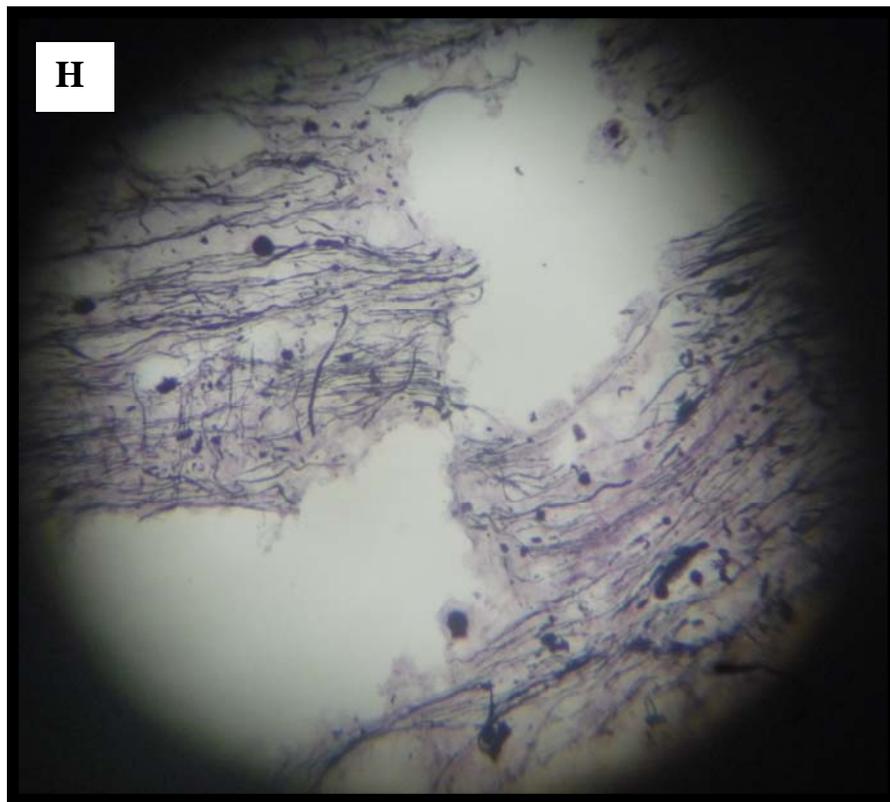
(C, E, G, I y K) Zona de cicatriz glial, imagen sagital de médula espinal nivel torácica 12 del grupo enzima, se aprecia axonogénesis desde las zonas distales y proximales a la lesión. Incluso presencia de neuomas arrosariados en imagen I (círculo). Tinción de Reumond x 12,5.



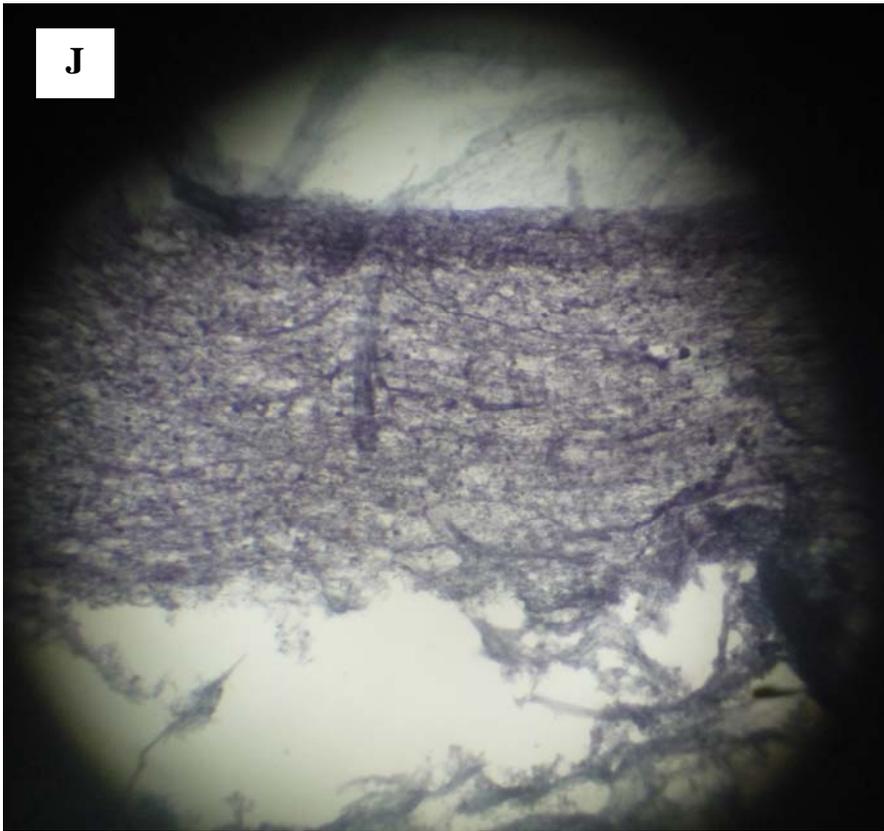








J



K

