



**Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo**

**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
"Dr. Ignacio Chávez"**

**División de Estudios de Posgrado**

**TESIS:**

**Terapia celular regenerativa con coadyuvancia farmacológica  
múltiple para la recuperación motora en un modelo de sección  
medular aguda en roedores**

***Que para obtener el grado de:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD***

**Presenta:**

**Médico Cirujano y Partero, Especialista en Cirugía General  
Carlos Torres Vega**

***Directora de tesis:***

**D. en C.B. Ana Edith Higareda Mendoza**

***Co-director de tesis:***

**D. en I.B.B. Marco Aurelio Pardo Galván**



Morelia, Michoacán, México, marzo 2021

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis presentada por:

**Médico Cirujano y Partero, Especialista en Cirugía General  
Carlos Torres Vega**

Doctora en Ciencias  
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctora en Ciencias  
Ana Edith Higareda Mendoza

Doctor en Ciencias  
Marco Aurelio Pardo Galván

Doctora en Ciencias  
Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctora en Ciencias  
Martha Eva Viveros Sandoval

La Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia de Excelencia  
del CONACyT

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

y en el laboratorio privado de Histología avanzada para la enseñanza  
asociado al departamento de Histología de la misma Facultad.

## **Agradecimientos**

*Agradezco a mi familia por su comprensión, en el tiempo sacrificado de convivencia, para dedicarlo a mi trabajo de maestría.*

*En especial a mi esposa por su apoyo irrestricto a mis inquietudes de incursión en la ciencia, así como a mi madre por las mismas razones.*

## Abreviaturas

**ASIA..... American Spine Injury Association**

**BBB.....Escala motora Basso, Beathie, Bresnan**

**EM.....Escala Motora**

**HyE.....Tinción Hematoxilina y Eosina**

**LM.....Lesión Medular**

**PEG.....Polietilenglicol**

**S/TX..... Sin Tratamiento**

**TA.....Taxol (Paclitaxel) y Ambroxol**

**TAC..... Taxol (Paclitaxel), Ambroxol y Colchicina**

**TBO.....Trasplante de Bulbo Olfatorio**

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Antecedentes históricos .....	14
2.1.2 Situación actual en el conocimiento de la lesión medular .....	14
<b>2.2 Lesión medular</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2. Mecanismos asociados a la regeneración axonal en lesión medular</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Modalidades terapéuticas potenciales para la lesión medular</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 Terapia de regeneración celular en lesión medular</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5 Modelos experimentales de lesión medular</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6 Evaluación motora pre- y pos-lesión medular</b> .....	<b>23</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
6.1 Objetivo general .....	27
6.2 Objetivos específicos .....	27
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
7.1 Tipo de estudio .....	28
7.2 Manejo de animales y aspectos bioéticos .....	28
7.3 Definición de los grupos .....	28
7.4 Modelo quirúrgico de lesión y tratamientos .....	29
7.5 Procesamiento muestras histológicas .....	30
7.6 Análisis estadístico .....	31
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
8.1 Estandarización de la técnica quirúrgica .....	32
8.2 Realización de las escalas de valoración neurológica .....	33
8.3 Recuperación motora .....	37
8.4 Resultados de los cortes histológicos .....	51

9. RESUMEN DE RESULTADOS .....	69
10. DISCUSIÓN.....	71
11. CONCLUSIÓN .....	76
12. REFERENCIAS .....	78
13. ANEXOS .....	87
13.1 Oficio de aprobación por el Comité de Bioseguridad y Bioética del IIQB-UMSNH.....	87

## Índice de tablas

Tabla 1. Guías clínicas ASIA de manejo de la lesión aguda de la médula espinal .....	16
Tabla 2. Ensayos clínicos fase I/II de neuroprotección en lesión medular aguda .....	17
Tabla 3. Modelos <i>in vitro</i> de regeneración axonal .....	19
Tabla 4. Escala de discapacidad motora EM Tarlov .....	23
Tabla 5. Escala BBB (Basso, Beathie, Bresnan) .....	24
Tabla 6. Grupos de tratamiento y controles .....	29
Tabla 7. Número de animales perdidos por fallecimiento y N para evaluación a 12 semanas.....	32
Tabla 8. Correlación de los valores de escalas neurológicas EM/BBB .....	34
Tabla 9. Recuperación motora medida con escala EM de Tarlov en sección medular .....	38
Tabla 10. Recuperación motora medida con EM de Tarlov en contusión medular.....	38
Tabla 11. Recuperación motora medida con escala BBB en sección medular .....	39
Tabla 12. Recuperación motora medida con escala BBB en grupos de contusión medular .....	39
Tabla 13. Recuperación motora con escala EM de Tarlov en lesión medular (agrupa sección y contusión).....	40
Tabla 14. Recuperación motora con escala BBB en lesión medular (agrupa sección y contusión).....	40
Tabla 15. Resultados semicuantitativos de análisis de cortes histológicos con HyE, Nissl y Golgi Cajal .....	51
Tabla 16. Resultados semicuantitativos de análisis de cortes en microscopía electrónica de transmisión .....	61
Tabla 17. Resultado de series de lesión medular experimental tratadas con polietilenglicol.....	74
Tabla 18. Resultados comparativos con implante celular solo o en combinación con fármacos .....	74

## Índice de figuras

Figura 1 Correlación entre escalas de evaluación en el grupo con contusión de la semana 0 a 12 .....	34
Figura 2. Correlación de escalas de evaluación en el grupo de sección basal en la semana 12.....	35
Figura 3. Déficit motor en grupos Sham, contusión y sección con escala EM de Tarlov .....	36
Figura 4. Déficit motor en grupos Sham, contusión y sección con escala BBB .....	36
Figura 5. Prueba ANOVA entre grupos control respecto al déficit motor medido con escala BBB.....	37
Figura 6. Evolución en escala motora de EM de Tarlov basal a la semana 12 en todos los grupos de sección medular .....	41
Figura 7. Evolución en escala motora EM basal a 12 semanas en grupos de contusión medular.....	41
Figura 8. Evolución en EM de Tarlov basal a 12 semanas en "Lesión Medular" (conjunta contusión y sección medular) .....	42
Figura 9. Evolución con escala BBB basal a 12 semanas en grupos de sección medular .....	43
Figura 10. Evolución con escala BBB basal a 12 semanas en grupos de contusión medular .....	43
Figura 11. Evolución con escala BBB en los grupos de "Lesión Medular" (conjunta contusión y sección).....	44
Figura 12. ANOVA de la evaluación motora de EM de Tarlov en lesión medular .....	45
Figura 13. ANOVA de la evaluación BBB en lesión medular .....	46
Figura 14. Información estadística que proporciona un videotracking con el programa ToxTrac .....	47
Figura 15. Pantalla de información gráfica del programa ToxTrac.....	48
Figura 16. Distancia recorrida basal y a las 12 semanas, enfatizando su porcentaje de decremento en animales seccionados .....	49
Figura 17. Decremento en la distancia recorrida basal y a las 12 semanas en animales contundidos. ....	50
Figura 18. Número de levantamientos sostenidos en patas traseras en animales seccionados. ....	50
Figura 19. Tinción de Golgi - Cajal que evidencia células gliales y neuritas traspasando sitio de sección .....	52
Figura 20. Tinción Golgi - Cajal que evidencia células gliales y neuritas en grupos de solo fármacos .....	53
Figura 21. Cortes con tinción HyE en grupos Sham, sección y contusión sin tratamiento (controles).....	54

<b>Figura 22. Cortes HyE en grupos TBO, TBO-TA, TBO-TAC que evidencia glía no reactiva y rearrreglos vascular y de cordones .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 23. Tinción HyE de cortes en grupos PEG, TA y TAC .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 24. Tinción Nissl en grupos Sham y sección sin tratamiento .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 25. Tinción de Nissl en grupos PEG y TA .....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 26. Tinción de Nissl en grupos TAC y TBO.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 27. Tinción de Nissl grupos TBO-TA y TBO-TAC.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 28. Grupo Sham, mielinización normal, sin globos de degeneración.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 29. Sección sin tratamiento con desarreglo de fibras, desmielinización y globos de degeneración. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 30. Grupo TA remielinización parcial escasa.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 31. Grupo TAC que evidencia mielinización escasa a moderada y un globo de degeneración .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 32. Grupo TBO con mielinización moderada (++) que evidencia fibras delgadas con mielinización inicial (regeneración) .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 33. Grupo TBO-TAC con grado de mielinización importante (+++) y nuevas fibras delgadas mielinizadas (regeneración) .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 34. Grupo PEG que evidencia moderada mielinización y algunas fibras delgadas .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 35. Grado de mielinización detectado por intensidad de máscara (color rojo) en microscopia electrónica y análisis de imagen Fiji-ImageJ.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 36. Porcentaje de mielinización comparado al 100% del grupo Sham.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 37. Detalles de microscopía electrónica en trasplante de bulbo olfatorio asociado a triple fármaco TBO-TAC .....</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

La presente investigación tuvo por objeto explorar la sinergia potencial de asociar el injerto de bulbo olfatorio (terapia celular) a la administración sistémica de fármacos (Paclitaxel, Ambroxol y Colchicina) y estudiar al polietilenglicol tópico como terapia única, en un modelo de lesión medular aguda (contusión y sección completa) en ratón. El objetivo central de evaluación se centró en la recuperación motora medida por escalas ya validadas en roedor (BBB y Tarlov). Se sometieron 9 grupos, de 10 animales en cada uno, a laminectomía a nivel T-10: un grupo Sham sin lesión, 2 grupos controles con lesión (contusión y sección respectivamente) y 6 grupos con lesión y tratamiento con diferentes asociaciones terapéuticas. Los resultados de todos los grupos de tratamiento mostraron superioridad en recuperación motriz con ambas escalas de manera significativa en comparación a los controles ( $p < 0.01$ ). Dentro de los grupos de tratamiento la asociación de injerto de bulbo olfatorio y triple fármaco (TBO-TAC) tuvo la máxima recuperación motriz a las 12 semanas, con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto de los otros grupos tratados. El estudio histológico de las médulas, por microscopía fotónica y electrónica, reveló una mejor preservación neuronal, menor grado de gliosis, mayor número de neuritas cruzando el sitio lesionado y mayor grado de mielinización en todos los grupos con tratamiento, siendo más evidente en el grupo que asoció el implante de bulbo olfatorio y triple fármaco. Podemos afirmar que la sinergia demostrada, con un grado muy importante de recuperación motriz que alcanzó casi el 75% de la motricidad normal basal previo a la lesión (BBB de 16.5 de 21), representa una prometedora terapéutica que merece ser trasladada a estudios clínicos Fase I.

**Palabras clave:** sinergia, lesión medular, terapéutica, Taxol, Ambroxol, Colchicina, recuperación motora, bulbo olfatorio

## ABSTRACT

This research had the purpose to explore the potential synergy of the association of an olfactory bulb graft (cellular therapy) with systemic drugs as Paclitaxel, Ambroxol and colchicine, and topical polyethylene glycol as a unique therapeutic approach, on a mouse model of spinal cord injury. The goal was to evaluate the motor recovery with the widely validated BBB and Tarlov scales. Nine groups, ten mice each, got a T-10 laminectomy: the Sham group without injury, 2 control groups (injured with contusion and section respectively), and 6 groups with injury and different therapeutic combinations were compared. All the treatment groups showed higher significant grade of motor recovery in comparison to controls ( $p < 0.01$ ). In the treatment groups, that with the association of bulb graft and three drugs (TBO-TAC), show the highest motor recovery at 12<sup>th</sup> week post injury with a mean of 16.5 on BBB scale and was significant against the other treatments ( $p \leq 0.05$ ). The histological exams of all the spines with photonic and electronic microscopy were done at 12<sup>th</sup> week post injury. Both revealed a higher number of preserved neurons, fewer grade of reactive gliosis, higher number of neurites crossing the injured site, and also a higher grade of myelination in all the treatment groups over the controls, but it was more evident on the TBO-TAC group. We can assure that the synergy shown, with a great motor recovery almost of 75 % respect to basal (BBB 16.5 of 21), represents a clear and promissory therapeutic that deserves translation to Phase I clinical trials.

**Key words:** synergy, spinal cord injury, therapy, Taxol, Ambroxol, colchicine, motor recovery, olfactory bulb

## I. INTRODUCCIÓN

La sección traumática de la médula espinal es un problema de salud pública mundial por su alta incidencia, su irreversibilidad es alta, con secuelas permanentes de paraplejia o cuadriplejia en el 99% de los casos de sección completa y de 60 a 70% en los casos de sección parcial. Su prevalencia es creciente y de alto costo e impacto a la calidad de vida de las personas. En México, según datos del Instituto Nacional de Rehabilitación, se tienen aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes, entre edades de 16 a 35 años con mayor frecuencia (Estrada *et al.*, 2007), siendo los accidentes vehiculares (37%), los actos violentos (28%), las caídas (21%) y los accidentes deportivos (6%) sus causas comunes.

El tratamiento clínico actual es pobre en resultados, se reduce al manejo quirúrgico ortopédico descompresivo y al uso de fármacos, como esteroides para disminuir la lesión secundaria por inflamación e isquemia, sin embargo desde hace 4 décadas se ha producido investigación básica en el proceso de reconexión funcional de la médula lesionada, con innumerables trabajos experimentales utilizando diversos enfoques, cuyos resultados, aunque alentadores, no han representado un gran impacto en el traslado al ámbito clínico. Una de las razones básicas de ello, es la búsqueda generalmente única de medidas que impacten en la mejoría de la lesión medular, la cual sabemos hoy, tiene diferentes facetas en su fisiopatología, por lo que utilizar medidas terapéuticas simultáneas, enfocadas a corregir todas estas causas fisiopatológicas, se requieren para lograr un resultado de recuperación significativo y que prontamente pueda migrar a su aplicación clínica. Esta es la idea central del presente trabajo.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1.1 Antecedentes históricos

Desde la publicación de Santiago Ramón y Cajal (1913), que incluye sus investigaciones sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso y resume investigaciones anteriores de Eichorst, Nagoette, Lugaro, entre otros de finales del siglo XIX, se aceptó como dogma que la lesión axonal en neuronas centrales encefálicas o medulares terminaba en un infructuoso intento de regeneración con la consecuente pérdida funcional permanente, en cambio, la lesión axonal de neuronas periféricas podía tener éxito en su regeneración y recuperación funcional.

### 2.1.2 Situación actual en el conocimiento de la lesión medular

En las últimas 4 décadas se han producido avances e investigaciones que promisoriamente podrían cambiar postura dogmática de que la lesión medular es irreversible y poco recuperable y lograr el proceso de regeneración axonal y recuperación funcional en neuronas centrales, lo que tendría gran impacto clínico al hablar de las lesiones medulares (David y Aguayo, 1981; Fawcett, 2018; De Brot, 2018; Hill, 2017; Hilton y Bradke, 2017; Gomes *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018).

Desde hace 20 años se inició en forma experimental el uso de terapia celular, con resultados prometedores pero inciertos (Ramón-Cueto *et al.*, 2000; Dell-Anno y Strittmatter, 2017; He y Jin, 2016), desde 1994 hasta el 2011 en una revisión de todos los trabajos (Ramón-Cueto, 2011) utilizando células de glía envolvente olfatoria con variedades diversas de toma y aplicación, que van desde el trasplante de bulbo olfatorio completo, hasta la purificación de subvariedades de células de glía de la mucosa nasal, o región periférica del bulbo. Incluyeron trabajos experimentales en animales y algunos clínicos fase II que conjuntan más de 100, con algo más de 1300 pacientes con resultados variables y parciales. Esto ha dado lugar a la búsqueda de terapias farmacológicas alternativas para estimular la posible regeneración axonal, ya que se han dilucidado en parte los mecanismos intrínsecos que impiden la regeneración axonal de neuronas centrales (Blanquie y Bradke, 2018; Chandran *et al.*, 2016;

Meghon, 2017) y algunas alternativas para revertir dichos mecanismos, reprogramando la actividad neuronal para la regeneración. Los fármacos involucrados son Paclitaxel (Taxol), Epotilon D y B, Colchicina y Ambroxol (Dubey *et al.*, 2018; Chandran *et al.*, 2016; Pease-Raissi *et al.*, 2017; Vanhatalo *et al.*, 1998). Estos fármacos se han evaluado de manera individual en modelos de lesión axonal única de metazoarios como *Caenorhabditis elegans*, en modelos *in vitro* de cultivos neuronales y en modelos de roedor de lesión de nervio óptico, así como de sección de médula espinal, con resultados alentadores (Colburn y DeLeo, 1999; Cougnon-Aptel *et al.*, 1999; Curcio y Bradke, 2018; Steward y Willenberg, 2017; Mahor, 2013; Valakh *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018); pero no existen trabajos con la combinación de ellos. Además, estos trabajos se centran fundamentalmente en evidenciar proliferación morfológica, no teniendo muchos de ellos una evaluación de la recuperación funcional sensorio-motriz del animal. Algunos trabajos experimentales en rata, con sección medular, y aplicación local de polietilenglicol, han mostrado interesantes resultados de regeneración axonal y recuperación motriz, (Borgens y Blight, 1999; Borgens y Shi, 2000), atribuyendo su acción a una rápida reparación molecular de las membranas nerviosas o a una posible protección y estabilización de las mitocondrias en los axones lesionados (Chen *et al.*, 2009).

## 2.2 Lesión medular

La sección traumática de la médula espinal es un problema de salud pública mundial por su alta incidencia, entre 8 y 24 casos por millón de habitantes en México (Estrada Mondaca *et al.*, 2007) y en Latinoamérica, el manejo clínico actual es limitado y con resultados pobres en recuperación de la función.

El tratamiento clínico actual se reduce al manejo quirúrgico ortopédico descompresivo y al uso de fármacos, como esteroides (metilprednisolona), para disminuir la lesión secundaria por inflamación e isquemia (Quinzaños-Fresnedo y Sahagún-Olmos, 2015). En una revisión reciente (Badhiwala, 2019) se enlistan las guías clínicas de manejo recomendadas por la ASIA (American Spine Injury Association) que a grandes rasgos, se enumeran: soporte vital,

descompresión quirúrgica temprana (< 24 h), metilprednisolona, trombopprofilaxis, resonancia nuclear magnética y rehabilitación (Tabla 1).

**Tabla 1. Guías clínicas ASIA de manejo de la lesión aguda de la médula espinal**

Recomendación	Calidad de evidencia	Fuerza de recomendación
Descompresión quirúrgica	baja	débil
Uso de metilprednisolona	moderada	débil
Trombopprofilaxis con anticoagulación	baja	débil
Resonancia nuclear magnética basal	baja	débil
Rehabilitación	baja	débil
Tomado de Badhiwala, 2019.		

Cabe mencionar que dichas guías clínicas se catalogan con bajo grado de evidencia y bajo nivel de recomendación, posiblemente debido a que los estudios donde se fundamentan incluyen un conjunto de pacientes muy variados en condiciones fisiológicas previas como edad, y grado de afectación neurológica valorado con la escala ASIA que va desde la A: lesión medular completa, B: lesión medular incompleta motora, C: lesión medular incompleta sensorial, D: lesión medular incompleta sensorial con fuerza muscular > 3 y E: sin lesión (Marino *et al.*, 2003).

En esta misma revisión se explican diferentes intentos de neuroprotección en la lesión medular aguda a base de factores de crecimiento como el de hepatocitos, fármacos como gliburida, biomateriales como hialuronato y adhesivo de fibrina, así como diversas terapias celulares como células madre neurógenas, mesenquimales, y otras, de lo cual se están llevando a cabo estudio preclínicos fase II con N de 10 a 30 individuos en promedio y en distintos centros (Tabla 2).

**Tabla 2. Ensayos clínicos fase I/II de neuroprotección en lesión medular aguda**

Trial	Sponsor	Target N	Eligibility Criteria	Intervention	Control	Primary Outcome	Secondary Outcomes
<b>SCING (glyburide)</b>	Ohio State University	10	Age 18–80 yrs; AIS grade A, B, or C; neurological level btwn C2 & C8; able to receive drug w/in 8 hrs of injury	DiaBeta PO 1.25 mg then 0.625 mg q 6 hrs ×11 doses	None	AEs over 1 yr	None
<b>KP-10 OIT (HGF)</b>	Kringle Pharma Inc.	48	Age 18–75 yrs; modified Frankel grade A, B1, or B2; neurological level below C3	HGF intrathecal 0.6 mg at 72 hrs; repeat w/ly ×5	Placebo at 72 hrs; repeat w/ly ×5	AEs over 24 wks; ASIA motor score at 24 wks	P-100 concentration in plasma & CSF at 6 wks; ASIA motor score at 12 wks; ASIA sensory score at 24 wks; modified Frankel scale at 24 wks
<b>G-CSF</b>	Tehran University of Medical Sciences	120	Age 18–60 yrs; AIS grade B, C, or D; injury more than 6 mos prior	G-CSF 300 mg once daily ×7 days	Normal saline ×7 days	ASIA motor & sensory scores at 6 mos	SCIM-III & IANR-SCIFRS at 6 mos; AEs up to 1 yr
<b>CSF Drainage in Acute SCI</b>	St. Joseph's Hospital and Medical Center	60	Age 18–75 yrs; AIS grade A, B, or C; neurological level btwn C4 & C8; injury less than 24 hrs prior	CSF drainage by lumbar drain (target ITP 10 mm Hg) & elevation of MAP (target MAP 100–110 mm Hg) ×5 days	Lumbar drain w/o CSF drainage & maintenance of MAP (target MAP 85–90 mm Hg) ×5 days	Intrathecal pressure at 5 days; ASIA motor score at 180 days	AIS grade at 180 days; ASIA sensory score at 180 days; SCIM at 180 days; pain numeric rating scale at 180 days
<b>AST-OPC1</b>	Asterias Biotherapeutics Inc.	35	Age 18–69 yrs; AIS grade A or B; neurological level btwn C4 & C7; able to receive cells btwn 21 & 42 days after SCI	AST-OPC1s—dose escalation across patients w/ 2, 10, or 20 million cells	None	AEs over 1 yr	Upper-extremity ISNCSCI motor score at 1 yr
<b>NSI-566</b>	Neuralstem Inc.	8	Age 18–65 yrs; AIS grade A; neurological level btwn C5 & C7 or T2 & T12; able to receive cells btwn 1 & 2 yrs after SCI	Human spinal cord-derived NSC (NSI-566) transplant	None	AEs over 6 mos	Graft survival on MRI & potential autopsy at 60 mos; EMG, SCIM, ISNCSCI at 60 mos
<b>Safety of ahSC in Chronic SCI</b>	The Miami Project to Cure Paralysis	10	Age 18–65 yrs; AIS grade A, B, or C; neurological level btwn C5 & T12; at least 1 yr since injury	Autologous human sural nerve Schwann cell transplant	None	ISNCSCI at 6 mos; MRI at 6 mos; neuropathic pain inventory at 6 mos	SCIM-III, SCI-functional index computer adaptive testing, walk test, MEP, SSEP, & others at 6 mos
<b>CELLTOP</b> (adipose stem cells for SCI)	Allan Dietz	10	Age >18 yrs; AIS grade A or B; SCI btwn 2 wks & 1 yr prior	100 million intrathecal autologous, adipose-derived MSCs	None	AEs over 4 wks	CBC, CRP, Cr, BUN, & blood electrolytes at 4 wks; AEs over 48 wks; AIS grade at 96 wks; SSEP & MEP at 96 wks
<b>Stem Cell Therapy in SCI</b>	Neurogen Brain and Spine Institute	500	Age 1–65 yrs	Intrathecal autologous bone marrow mononuclear cell transplant	No intervention	Clinical symptoms at 6 mos	FIM at 6 mos

AE = adverse event; ahSC = adult human Schwann cells; BUN = blood urea nitrogen; CBC = complete blood count; Cr = creatinine; CRP = C-reactive protein; EMG = electromyography; IANR-SCIFRS = International Association of Neurorestoratology Spinal Cord Injury Functional Rating Scale; ISNCSCI = International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury; ITP = intrathecal pressure; MAP = mean arterial pressure; MEP = motor evoked potential testing; PO = by mouth; q = every; SSEP = somatosensory evoked potential testing.

(Badhiwala, 2019)

## 2.2. Mecanismos asociados a la regeneración axonal en lesión medular

Las descripciones de Cajal están fundamentadas en el aspecto histológico evolutivo de las lesiones medulares, en la formación de botones de regeneración y en la recuperación de continuidad guiada a través de las vainas de mielina distales a la lesión axonal, con la reconexión funcional parcial en neuronas periféricas. Desde las descripciones de Cajal, esta capacidad de reconexión funcional parcial se atribuyó fundamentalmente al influjo que las células de Schwann ejercían en dicho trofismo (Burda *et al.*, 2014 y 2017; Haggerty *et al.*, 2017). Así, la ausencia de estas células en el sistema nervioso central se relacionó con la imposibilidad de regeneración. Las investigaciones actuales reconocen en el influjo de regeneración el papel fundamental de las células de la neuroglia, como las células de Schwann, oligodendrocitos y astrocitos (Madison *et al.*, 2009). Otras muchas investigaciones han resaltado el papel fundamental que tienen los mecanismos intraneuronales “adormecidos” en las neuronas adultas, susceptibles de activarse en el soma por influjo retrógrado y anterogrado al sitio de la sección axonal (Cioni *et al.*, 2018; Ferguson, 2018; Goldner y Yaron, 2017; Ji, 2014; Mahar y Cavalli, 2018; Mahor, 2016). La elongación distal de la neurita axonal lesionada, hasta alcanzar un tejido blanco postsináptico, es conocida como “programa de crecimiento axonal”. Una revisión realizada por He y Jin (2016) recopila y expone varios trabajos sobre estos “programas de crecimiento axonal”. Los trabajos recopilados refieren que la regeneración neuronal está acompañada por la expresión diferencial de ciertas proteínas que regulan las interacciones celulares entre la membrana y el citoesqueleto. Por ejemplo, ante una lesión axonal ocurre la disminución en la expresión de genes de funcionalidad neuronal que codifican para componentes como receptores, canales iónicos y neurotransmisores. También ocurre la sobreexpresión de genes de “crecimiento” y elongación axonal a través de factores transcripcionales como ATF3, HIF-1 alfa, c-Jun, Sox11 y STAT3; mientras que la expresión de genes para la síntesis y el armado de microtúbulos y filamentos intermedios se mantiene constante. Igualmente, ocurre el aumento de AMPc, arginasa1 GAP-43, CAP-23 y componentes del citoesqueleto, como tubulinas y actina (Ji y Jaffrey, 2014; Scott-Solomon y Kuruvilla, 2018; Rama *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Maor-Nof *et al.*, 2011 y 2016). De manera simple se ha descrito que la regeneración axonal está determinada por la formación

de un cono de crecimiento axonal, el cual sólo se da mediante un arreglo dinámico de los microtúbulos y filamentos intermedios en el cabo seccionado. En cambio, la aparición de un bulbo de retracción, con desarreglo de estas estructuras citoesqueléticas, es el proceso que impide la regeneración en las neuronas centrales. Este concepto ha llevado al desarrollo de la terapia farmacológica con medicamentos que influyen en el armado y arreglo microtubular, como Epolitón B y D, Paclitaxel, Colchicina, Amiblastina y otros (Blanquie y Bradke, 2018; Dubey *et al.*, 2018; Park y Roll-Mecak, 2018; Ramadan *et al.*, 2017; Ruschel y Bradke, 2018; Sandner, 2018; Bixby *et al.*, 2015; Sengottuvel *et al.*, 2011). Los trabajos previamente citados (Tabla 3), tanto de mecanismos neuronales de respuesta de regeneración, vías de señalización, así como factores modificantes, fármacos, sustancias del microambiente e interacciones celulares, han sido obtenidos por estudios *in vitro*, de características variadas, siendo los ensayos de crecimiento de neuritas los más relevantes (Al-Ali *et al.*, 2017).

**Tabla 3. Modelos *in vitro* de regeneración axonal**

<b>1. Modelos en células</b>	<b>Tipo de utilidad</b>
A. Cultivos celulares de baja densidad	Regeneración axonal
1. Ensayo de crecimiento de neuritas	***
2. Ensayo de retracción de neuritas	**
3. Ensayo de listones	Efecto fármaco
4. Ensayo de manchas	**
B. Cultivos celulares de alta densidad	
1. Ensayo de rasgado	Regeneración axonal
2. Ensayo radial	Neurotrofia
3. cámaras de flujo	Neurotrofia
4. Co- cultivos neuronales-gliales	Neurotrofia
<b>2. Explantes / modelos organotípicos</b>	
1. DRG (ganglios de raíz dorsal) explantes	Condicionamiento
2. Retino explantes	Efecto fármaco
3. Cultivos de rebanadas de cerebro o espinales	Plasticidad

### 2.3 Modalidades terapéuticas potenciales para la lesión medular

Se ha definido como un blanco terapéutico el influir en la modulación del proceso de arreglo estructural de microtúbulos y de filamentos de actina para generar botones de regeneración en axones lesionados. De estos trabajos, se ha concluido la utilidad de manipulación farmacológica temprana con fármacos como Placitaxel (Taxol, estabilizador de microtúbulos), Epotilon D (estabilizador de microtúbulos) y Colchicina (interviene modulando la interacción de filamentos de actina, aunque pudiese tener acción de modulación antiinflamatoria y de liberación de citocinas en sitio de lesión y perilesional) (Blanquie y Bradke, 2018; Gummy y Hoogenraad, 2018; Hao *et al.*, 2018; He y Jin, 2016; Nirschl *et al.*, 2017). Es interesante señalar que Paclitaxel (Taxol) es utilizado como quimioterápico y que a dosis altas produce una lesión neuronal con neuropatía clínica debido a que propicia la degeneración axonal al inhibir la formación de la proteína antiapoptótica Bclw; el dominio BH4 de Bclw interactúa con IP3R1 axonal y restringe la degeneración axonal inducida por Taxol (Pease-Raissi *et al.*, 2017). Sin embargo, a **dosis bajas** de Taxol se ha demostrado que propicia el surgimiento de botones de regeneración (Tedeschi y Bradke, 2017; Tang y Jin, 2018), por su acción estabilizadora de microtúbulos; acción debida a su unión con tubulina  $\beta$  y su afinidad por las proteínas Tau (estabilizadoras de microtúbulos) (Tracy y Gan, 2018).

Los avances en la biología molecular han permitido se definan los mecanismos o “programas de regeneración axonal” en neuronas periféricas, generando redes de los genes expresados y las vías metabólicas y de señalización involucradas en el proceso de regeneración axonal. Esto llevó al análisis bioinformático de la activación de dichas redes, a su comprobación experimental y a su traspolación a neuronas centrales por estímulos farmacológicos, también deducidos por bioinformática. En esta investigación, se encontró que el uso de Ambroxol podría ser el detonante de la sobreexpresión de la mayoría de los genes de las redes de “regeneración” involucradas. En este mismo trabajo, se llevó a la experimentación con este agente en un modelo *in vitro* y en un modelo de sección de nervio óptico en roedor, demostrándose efectivamente la regeneración y elongación axonal (Chandran *et al.*, 2016; Scott-Solomon y Kuruvilla, 2018; Simon *et al.*, 2016; Sofroniew, 2017).

Asimismo, se han reportado extensos trabajos describiendo la respuesta celular al daño de neuronas centrales (Burda y Sofroniew, 2014), de los cuales se pueden identificar posibles factores tróficos a ser manipulados con fines terapéuticos. Tal es el caso del factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) (Scott-Solomon y Kuruvilla, 2018) o el bloqueo de receptores Nogo-1 (receptor para inhibidores asociados a mielina (MAI's) que suprimen la neurogénesis por medio de RNA de interferencia (Zhao *et al.*, 2018).

Por otra parte, se han descrito el uso local intralesional de biomateriales o “scaffolds” a manera de férulas, que favorezcan procesos de regeneración de las lesiones medulares. Recientemente un reporte en Argentina describe el uso de polietilenglicol en modelo de lesión medular en rata, con resultados de mejor recuperación motriz; pero el modelo es solo por contusión y con valoración en corto plazo de 72 h (Blanco *et al.*, 2017). Otros estudios por Borgens, (Borgens *et al.*, 1999 y 2000) de igual manera demuestran mejoría rápida en un modelo de contusión de rata, solo con seguimiento de 48 horas.

#### 2.4 Terapia de regeneración celular en lesión medular

Otro gran campo de desarrollo es la terapia celular regenerativa en lesión medular por medio de cultivos celulares y métodos de implantación de células madre. Se han realizado avances importantes que pueden resultar en la regeneración efectiva de neuronas centrales lesionadas (Lin *et al.*, 2018; Reymond, 2016; Li *et al.*, 2018; DeBrot y Yao, 2018). Se han descrito múltiples modalidades de terapia celular utilizando tejidos fetales que contienen células madre neurales y células progenitoras neurales, pluripotentes o neuronorestringidas (Bonner y Steward, 2015; Ortmann y Hellenbrand, 2018; Snyder y Walz, 2017; Ziegler *et al.*, 2011). Otros han utilizado células madre derivadas de médula ósea e incluso células madre neurógenas endimarias cultivadas. Algunos de estos trasplantes actúan como “puentes” entre las neuronas pre-lesión y las neuronas pos-lesión (motoras inferiores o interneuronas), estableciendo circuitos no idénticos pero potencialmente funcionales. Otras modalidades de trasplante celular tienen más un efecto trófico para la regeneración axonal, a través de la

liberación de factores como el trófico de glia (GDNF) (Ortmann y Hellenbrand, 2018; Raddatz *et al.*, 2015) y las modulaciones del microambiente que rodea al sitio de lesión.

Se han tenido resultados de recuperación funcional relevantes con el trasplante de bulbo olfatorio (glía envolvente) o el trasplante de mucosa olfatoria. Este modelo se ha trabajado por Ramón-Cueto y colaboradores, además de otros grupos, desde hace 2 décadas, iniciando con modelos experimentales en rata (Ramón-Cueto *et al.*, 2000; Arellanes-Chávez *et al.*, 2015; Thornton *et al.*, 2018), escalando a primate no humano (Ziegler *et al.*, 2011) y, en la actualidad, corriendo un estudio piloto experimental clínico en hospitales de Valencia, España (Gómez *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que este abordaje de trasplante de glía envolvente olfatoria funcionaría de manera mixta, con la producción local de factores neurotróficos regeneradores axonales y de diferenciación, inhibición y neutralización de factores inhibitorios en el microambiente como condroitin sulfato proteoglicanos y proteínas asociadas a mielina (Ramón-Cueto *et al.*, 2000), así como con la proliferación de células madre neurógenas del adulto del epitelio endimario (Gómez *et al.*, 2018; Bisbal, 2014; Choi y Gladwin, 2015).

## 2.5 Modelos experimentales de lesión medular

Se ha utilizado ampliamente el modelo roedor (rata y ratón), donde se ha estandarizado el mecanismo de lesión, por sección o contusión, con la finalidad de tener uniformidad basal para el ensayo de procesos de regeneración y terapias experimentales (Ahmed *et al.*, 2019). Los modelos en animales mayores como perro, gato o primates han tendido a abandonarse por el costo e implicaciones bioéticas (Nardone *et al.*, 2017; Sharif-Alhoseini *et al.*, 2017). Si bien no existe el modelo “ideal” que reproduzca todas las características vistas en la lesión medular clínica del ser humano, los modelos son susceptibles de evaluarse de manera homogénea en su recuperación funcional motora, con escalas definidas como la de Tarlov (discapacidad motora) y la BBB (Basso, Beathie, Bresnan) y se evidencian los mecanismos de regeneración por microscopía fotónica y electrónica (Paterniti *et al.*, 2018; Ramadan *et al.*, 2017).

## 2.6 Evaluación motora pre- y pos-lesión medular

En modelos de roedor se cuenta con “test” de evaluación de la función neurológica, bien validados y reproducibles. Los principales son el Test de campo abierto de Tarlov (Metz *et al.*, 2000; Sedy *et al.*, 2008) que evalúa de manera simple 6 estados funcionales con escala de 0 a 5 (Tabla 4), donde 0 es parálisis completa y 5 locomoción completa. Esta prueba incluye pruebas de desplazamiento en área, movilidad de patas traseras y cola, apoyo en pata, levantamientos y número de cruces.

**Tabla 4. Escala de discapacidad motora EM de Tarlov**

Escala de Discapacidad Motora (pos-lesión)	
0	Sin movimientos observables en miembros pélvicos.
1	Movimientos del miembro, pero sin apoyo plantar y sin soportar peso.
2	Apoyo plantar evidente, sin movimientos de locomoción.
3	Apoyo plantar y movimientos coordinados con el miembro contralateral y con el miembro torácico.
4	Movimientos normales. Levantamientos normales, sin sustentación sostenida.
5	Movimientos normales. Levantamientos normales, con sustentación sostenida.

(Metz *et al.*, 2000)

Otra prueba de evaluación neurológica del modelo roedor, con mayor detalle y precisión es el BBB o “Basso, Beathie, Bresnhan” (Basso *et al.*, 1995; Basso *et al.*, 2006). Esta prueba evalúa 21 puntos que permiten discriminar de manera más precisa el grado de motricidad del animal, por lo que se ha convertido en el estándar de oro (Tabla 5).

Existen otras pruebas sencillas e importantes, como la prueba de nado o la de pisada, que también pueden complementar la información y discriminar mejor el grado de recuperación (Xu *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2019).

**Tabla 5. Escala BBB (Basso, Beathie, Bresnan)**

<b>Escala de motricidad en roedores BBB (BASSO, BEATHIE, BRESNAN)</b>	
<b>0</b>	No se observan movimientos en extremidades posteriores (HL - Hind Limbs)
<b>1</b>	Movimiento ligero de una o 2 articulaciones (cadera o rodilla)
<b>2</b>	Movimiento extenso de una articulación
<b>3</b>	Movimiento extenso de 2 articulaciones
<b>4</b>	Movimiento ligero de 3 articulaciones
<b>5</b>	Movimiento ligero de 2 articulaciones y extenso de una tercera
<b>6</b>	Movimiento extenso de 2 articulaciones y ligero de una tercera
<b>7</b>	Movimiento extenso de 3 articulaciones
<b>8</b>	Posición plantar de pata sin soportar peso (movimiento adelante - atrás)
<b>9</b>	Posición plantar de pata soportando peso (movimiento adelante - atrás) consistente
<b>10</b>	Pasos con soporte plantar sin coordinación
<b>11</b>	Pasos con soporte de peso plantar coordinados en patas traseras no con delanteras
<b>12</b>	Soporte de peso frecuente y consistente y pasos plantares con coordinación ocasional
<b>13</b>	Soporte de peso frecuente y consistente pasos plantares con coordinación frecuente
<b>14</b>	Pasos plantares consistentes, coordinación consistente con rotación interna o externa de pata
<b>15</b>	Pasos plantares y coordinación consistente, sin rotación, pata paralela, sin apertura digital
<b>16</b>	Pasos plantares y coordinación HL consistente, pata paralela y con apertura digital ocasional
<b>17</b>	Pasos plantares y coordinación consistentes, pata paralela y apertura digital frecuente
<b>18</b>	Pasos plantares y coordinación HL consistentes, pata paralela y apertura digital, cola inmóvil
<b>19</b>	<i>Idem</i> anterior, cola abajo casi todo el tiempo
<b>20</b>	<i>Idem</i> anterior, inestabilidad del tronco cola arriba consistente
<b>21</b>	<i>Idem</i> anterior, estabilidad del tronco, cola arriba consistente

HL-Hind Limbs, patas traseras

### 3. JUSTIFICACIÓN

Desde la antigüedad se conoce que la lesión traumática de la médula espinal (“sección medular aguda”), frecuentemente asociado al trauma de la columna vertebral, deja como secuela obligada la imposibilidad de movimiento de las extremidades distales y/o proximales, dependiendo del nivel del trauma.

La sección de la médula espinal trae como consecuencia secuelas funcionales definitivas (paraplejía o cuadriplejía) debido al fracaso en la reconexión funcional axónica. Desde hace más de un siglo se ha tratado de buscar la manera de lograr la reconexión y, por lo tanto, la recuperación funcional. En décadas recientes ha resurgido dicho interés, con modalidades de índole farmacológico y de terapia regenerativa celular, con injertos de células madre, células de la mucosa olfatoria o de la glía envolvente del bulbo olfatorio. Aunque aún todas son de carácter experimental, en algunos casos comienza a trasladarse al terreno clínico con resultados prometedores (Bisbal, 2014; Bonner y Steward, 2015; Choi y Gladwin, 2015; Du *et al.*, 2011; Ramón-Cueto y Muñoz-Quiles, 2011). La lesión medular en México es de 1.8 por 100,000 habitantes por año, la mortalidad es del 25% de los lesionados, la prevalencia es creciente y más del 70% no logra ninguna recuperación funcional motora, quedando en cuadriplejía o paraplejía. La ausencia de alternativas terapéuticas de esta entidad ha representado un claro retraso en el tiempo. El manejo actual en fase aguda se limita a la asistencia de apoyo vital, descompresión ortopédica de la lesión ósea de la columna y “protección de la lesión secundaria” con esteroides a dosis moderadas, trombopprofilaxis y posterior rehabilitación física. Investigaciones recientes, retomando estudios antiguos de hace 100 años del Dr. Ramón y Cajal y de otros, han mostrado la posibilidad de inducir la reconexión axonal medular efectiva en sección aguda, con la recuperación funcional motora y sensitiva en modelos experimentales. Sin embargo, estas terapias experimentales actuales están fundamentadas en el uso único de la terapia celular y la monoterapia farmacológica por separado, con evidencia de utilidad parcial. Se sabe que fármacos como Epotilón o Taxol actúan en la reorganización citoesquelética, propiciando la regeneración axonal en neuronas centrales. Además, la Colchicina podría tener un efecto potenciador o modulador de la eficacia del Taxol, por lo que en conjunto podrían mejorar la eficacia de la regeneración

axonal. Por otro lado, el Ambroxol es un fármaco que propicia la sobreexpresión de varios genes de la “red de regeneración axonal”, entonces, se propone el uso de estos tres fármacos para probar su acción sinérgica. Más aún, el hecho de que la terapia celular con trasplante de glia envolvente olfatoria (GEO) tenga un claro efecto en la regeneración axonal y en la recuperación motora de modelos experimentales, permite también proponer su asociación a la terapia farmacológica múltiple, con lo que se esperaría que tal asociación coadyuvante logrará una mejoría en la recuperación motora de la lesión aguda de la medula espinal. Tales resultados justificarían su pronta migración al uso clínico en humanos.

#### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene la terapia celular regenerativa, asociada a la terapia farmacológica, mejor efecto que la monoterapia en la reconexión axonal y en la recuperación funcional posterior a una sección traumática de la médula espinal en un modelo experimental de roedor?

## 5. HIPÓTESIS

La combinación de la terapia celular y la farmacológica, en un modelo murino de lesión medular, induce la regeneración axonal y la recuperación motora con eficacia significativamente mayor que las monoterapias farmacológicas o celular por separado.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Demostrar la eficacia de recuperación anatómica y funcional motora de la terapia celular y farmacológica combinada en lesión medular aguda.

### 6.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la uniformidad de la lesión medular en un modelo de ratón, con mecanismo de sección y de contusión.
- Cuantificar el grado de recuperación neurológica motora en los distintos grupos experimentales.
- Caracterizar la evolución histológica de la lesión medular aguda sin tratamiento y bajo manejo celular y farmacológico combinado.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Tipo de estudio

El diseño es experimental, comparativo, controlado, prospectivo y longitudinal.

### 7.2 Manejo de animales y aspectos bioéticos

Todo el manejo de los animales se hizo bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) albinos de la cepa CD-1, entre 30 y 40 g de peso, y de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos de un bioterio de barrera (Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM), libres de parásitos y zoonosis. Se pusieron en periodo cuarentena y adaptación por 2 semanas. Se sometieron a prueba de evaluación motora basal con escalas Tarlov y BBB. Se les proporcionó alimento certificado en pellets y agua purificada ad-libitum. Al término de la experimentación después de 12 semanas de seguimiento y evaluación se sacrificaron con eutanasia a base de fenobarbital, para la obtención de los tejidos (médula espinal o bulbo olfatorio).

### 7.3 Definición de los grupos

Se estudiaron 9 grupos de 10 animales cada uno (Tabla 6), de los cuales 6 grupos fueron experimentales (lesión con tratamientos) 5 de ellos se subdividieron en 2 sub-grupos de 5 animales cada uno, según el mecanismo de lesión (sección o contusión). Los otros 4 grupos: lesión por sección con aplicación de polietilenglicol local y los grupos control, contusión sin tratamiento, sección sin tratamiento y el grupo Sham contaron de inicio con 10 animales.

**Tabla 6. Grupos de tratamiento y controles**

Descripción de los grupos experimentales y control	
Grupo	Tratamiento
1	Ambroxol-Taxol
2	Ambroxol-Taxol-Colchicina
3	Trasplante de bulbo olfatorio
4	Ambroxol-Taxol-Trasplante de bulbo olfatorio
5	Ambroxol-Taxol-Colchicina, con trasplante de bulbo olfatorio
6	Polietilenglicol local en sitio de sección
7	Grupo control sección medular sin terapia.
8	Grupo control contusión medular sin terapia.
9	Grupo Sham (laminectomía sin lesión)

#### 7.4 Modelo quirúrgico de lesión y tratamientos

La lesión medular se realizó con la técnica de laminectomía T10-T11 con sección cortante directa o contusión con un impactor (Harvard Instruments) por caída de peso con punta roma de goma de 15 g a 10 cm de altura, calibrada a 1000 dinas, bajo anestesia con Ketamina (2.5 mg/kg)-Xylacina (1.6 mg/kg) intraperitoneal.

Los medicamentos fueron aplicados vía sistémica (intraperitoneal) en los esquemas de: Paclitaxel y Colchicina los días 1 y 8; Ambroxol diario durante los primeros 15 días. Las dosis aplicadas fueron: Paclitaxel 0.5  $\mu\text{g/g}$ , Colchicina 0.01  $\mu\text{g/g}$  y Ambroxol 30  $\mu\text{g/g}$  del día 1 al 5 y 15  $\mu\text{g/g}$  del día 6 al 15. Estas dosis se calcularon en base a reportes de estudios experimentales previos y en base analógica a dosis terapéuticas en la farmacología médica. Los fármacos utilizados se obtuvieron de productos farmacéuticos como:

Los grupos control (Grupos 7, 8 y 9) se trabajaron inicialmente con la finalidad de realizar la estandarización del modelo, constatando la uniformidad en cuanto al grado de déficit neurológico producido y para validar el instrumento de valoración neurológica empleado (Valoración de campo abierto de Tarlov y escala BBB). Posteriormente, se continuó con los grupos de tratamiento, iniciando con el grupo 3 que implicó sólo el trasplante de bulbo olfatorio, el cual fue obtenido de ratones donadores y se aplicó la mitad del bulbo olfatorio a cada animal, por lo cual un animal donador sirvió para 4 procedimientos,

habiéndose empleado en total 10 animales donadores para todos los grupos experimentales con trasplante de bulbo olfatorio. Luego se trabajaron los grupos 1 y 2, para terminar con los grupos 4 y 5. Todos los grupos fueron evaluados funcionalmente con pruebas de campo abierto, con valoración de EM (escala neurológica simplificada de Tarlov) y la valoración neurológica BBB (Basso, Beattie y Bresnahan) (Basso, 1995; Ahmed *et al.*, 2019) en forma basal y a 1, 2, 4, 8 y 12 semanas. De forma complementaria se realizaron Video-Tracking en arena (campo abierto), utilizando el programa ToxTrac (Rodríguez *et al.*, 2018), lo cual permite valorar en un minuto: distancia recorrida, aceleración máxima y velocidad promedio, así como levantamientos en patas posteriores, dando una idea más precisa de la eficiencia y fuerza de la motricidad. Y se realizaron videos comparativos de los animales que obtuvieron la mejor respuesta de recuperación motora a las 12 semanas.

#### 7.5 Procesamiento muestras histológicas

Se realizó el estudio histológico a las 12 semanas para todos los grupos. Las muestras se tuvieron para procesamiento de inclusión en parafina para tinciones H y E y Tinción de Nissl, así como muestras preparadas con método de Cajal y de Castro, con fijación en Bicromato de potasio por 3 semanas e impregnación argéntica con nitrato de plata antes de su inclusión en parafina.

Se obtuvieron muestras fijadas en glutaraldehído y sometidas a doble fijación con tetraóxido de osmio e inclusión en resina para procesamiento para microscopía electrónica, solo de animales de 12 semanas de seguimiento.

La **Técnica de Impregnación Neurofibrilar Argéntica** se realizó en al menos 2 casos de cada grupo (Cajal, 1910; De Castro, 1960).

Las técnicas de **tinción con violeta de cresilo** para cuerpos neuronales de Nissl de igual manera se realizaron en al menos 2 casos de cada grupo. También de estas muestras se realizó tinción HyE.

La observación tuvo como objetivo el realizar la cuantificación de neuronas viables, gliosis reactiva, y presencia de células implantadas de glia olfatoria.

Se analizaron, por microscopía electrónica de transmisión, cortes finos 60 nm para evidenciar los conos de regeneración, con la evaluación del grado de mielinización y del crecimiento glial.

#### 7.6 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de correlación con cálculo de coeficiente de Sperman para comparar ambas escalas de valoración neurológica en los grupos Sham y control sin tratamiento (sección y contusión).

Los resultados de las valoraciones neurológicas (EM y BBB) se analizaron comparando las medias y el error estándar de las mismas, en su evolución de 1, 2, 4, 8 y 12 semanas, con especial interés en el estado a las 12 semanas; este análisis se realizó comparando curvas de evolución de las medias, Prueba de Anova de un Factor así como Prueba Post Hoc de Tuckey. Se utilizó el programa estadística SPSS versión 25. La comparación se realizó en forma triplicada, comparando los grupos en total, solo los casos de sección y solo los casos de contusión. También se realizó comparación de los valores evidenciados con Video Tracking (ToxTrac), de distancia, aceleración y velocidad promedio que arrojó dicha prueba en observaciones de 1 min.

La comparación descriptiva de la evolución histológica por grupos se realizó comparando los porcentajes de neuronas viables, el grado de gliosis y de mielinización.

## 8. RESULTADOS

Se operaron en total 90 ratones de laminectomía y se asignaron en grupos de 10 a cada modalidad de manejo, control 3 grupos y experimental 6 grupos. La edad al momento de la cirugía e inicio de terapéutica y seguimiento osciló entre 6 y 7 semanas. El peso promedio de los animales fue de 38 g. Con rango entre 33 y 45 g. Además se utilizaron 10 ratones como donadores de bulbo olfatorio. Los 16 ratones operados murieron antes del término del seguimiento, 8 en la primera semana (4 en transoperatorio de grupos control de sección y contusión y 4 más dentro de las primeras 72 h. Otros 8 murieron tardíamente (entre la 4ª y 8ª semana); cabe mencionar que 6 de estas correspondieron a los grupos TAC, TBO-TA, y TBO-TAC, por lo que como discutiremos posteriormente no podemos eliminar posible toxicidad como causa. De esta forma se tuvieron para evaluación final solo a 74 animales distribuidos en los 9 grupos (Tabla 7).

**Tabla 7. Número de animales perdidos por fallecimiento y N para evaluación a 12 semanas**

	SHAM	CONTUSIÓN	SECCIÓN	TA	TAC	BULBO	BULBO/TA	BULBO/TAC	PEG
Perdidos	0	2	2	1	3	1	3	3	0
N	10	8	8	9	7	9	7	7	10

TA-Taxol-Ambroxol    TAC-Taxol-Ambroxol-Colchicina    PEG-polietilenglicol

### 8.1 Estandarización de la técnica quirúrgica

Las escalas neurológicas de evaluación de Tarlov y BBBSe definió con precisión el nivel de laminectomía, localizando la primera costilla flotante del animal una vez abierta la piel y aponeurosis superficial; esta costilla fue seguida hasta la vértebra de inserción (T11) y se inició la laminectomía de la vértebra inmediata superior (T10), y se amplió a T11 para lograr una exposición suficiente de la médula para sección o contusión con impactor o sin lesión para el grupo Sham. En todos los casos se cerró con afrontamiento musculoaponeurótico con catgut crómico 4/0 y la piel con la misma sutura.

La sección realizada con microtijera se realizó previo despegamiento peridural con microgancho en 360 grados para garantizar el paso completo de las hojas de la microtijera y la sección completa.

En el caso de la contusión, se realizó fijación de las apófisis espinosas superior e inferior a la exposición y se utilizó un peso de 15 g punta roma de goma a 10 cm, calibrando el impactor a 100 kdynas, lo cual se verificó con un dinamómetro externo. Todo esto con la intención de propiciar una contusión no grave equivalente a lesión medular incompleta y no una contusión medular grave que equivale a una sección completa.

Inicialmente se encontró que al realizar la sección o contusión había un abrupto despertar y reactividad del animal, por lo cual se colocaron 2 gotas de lidocaína 2% sobre la médula expuesta, dejándose actuar por 30 segundos antes de la lesión, con lo cual no se observó dicho despertar y reactividad abrupta.

## 8.2 Realización de las escalas de valoración neurológica

Se realizaron por duplicado en días consecutivos, de preferencia a la misma hora y previa ambientación del animal en jaula libre y grande plástica por 3 min. Posteriormente se realizó prueba en arena de 60x60 cm con videograbación por 1 min, posterior análisis del video con programa ToxTrac, grabándose los resultados para posterior análisis.

Se realizó la prueba de correlación de Spearman para las mediciones de escala motora de Tarlov y de BBB de la semana 1 a 12, lo cual se muestra en la Tabla 8, y se ilustra individualmente en las figuras 1 y 2 siendo en todos los casos superiores a 0.95.

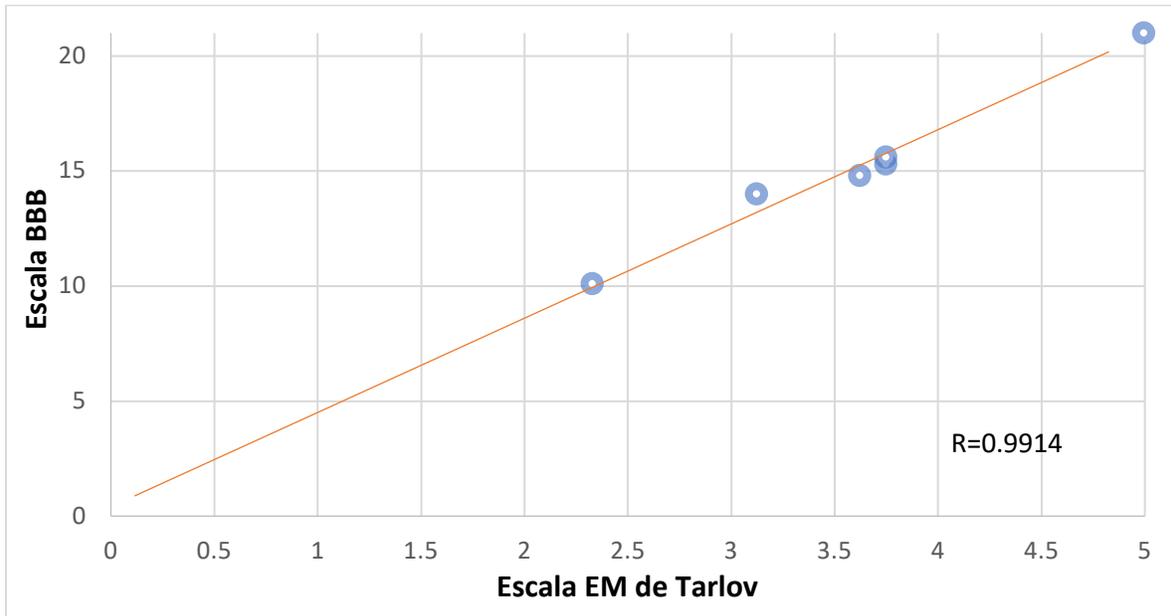
Se realizó la videograbación a las 12 semanas en arena plana y con inclinación, al animal que mejor grado de recuperación presentó en cada grupo, con fines de comparación.

**Tabla 8. Correlación de los valores de escalas neurológicas EM/BBB**

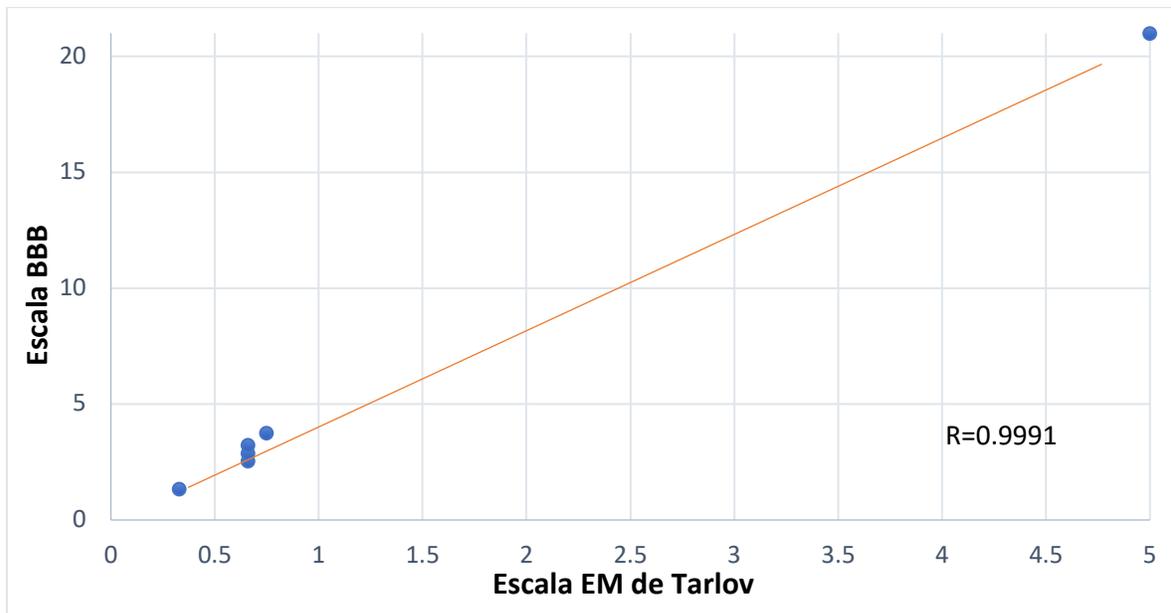
**Coeficientes de correlación entre EM / BBB semanas 1 a 12 (SPEARMAN)**

SHAM	CONTUSIÓN	SECCIÓN	TA	TAC	TBO	TBO/TA	TBO/TAC	PEG
1	0.9914*	0.9991*	0.9993*	0.991*	0.9861*	0.9954*	0.9929*	0.9875*

p<0.01



**Figura 1. Correlación entre escalas de evaluación en el grupo con contusión de la semana 0 a 12**



**Figura 2. Correlación de escalas de evaluación en el grupo de sección basal en la semana 12**

Por otro lado se evidenció que el grupo Sham prácticamente no manifestó déficit neurológico, con excepción de un animal cuyo BBB disminuyó de 21 a 20. Esto impactó en el promedio del grupo de manera prácticamente imperceptible, mientras que en el grupo control con contusión y sección sí se detectaron cambios importantes y significativos, correlacionables al grado de lesión. La contusión equivalente a lesión medular incompleta tuvo menor déficit inicial y recuperación parcial espontánea, mientras que la sección presentó gran déficit motor y prácticamente no hubo recuperación (Fig. 3 y 4). Existe una diferencia en el déficit motor entre los 3 grupos, encontrándose estadísticamente significativa con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con valor  $p < 0.001$  (Fig. 5).

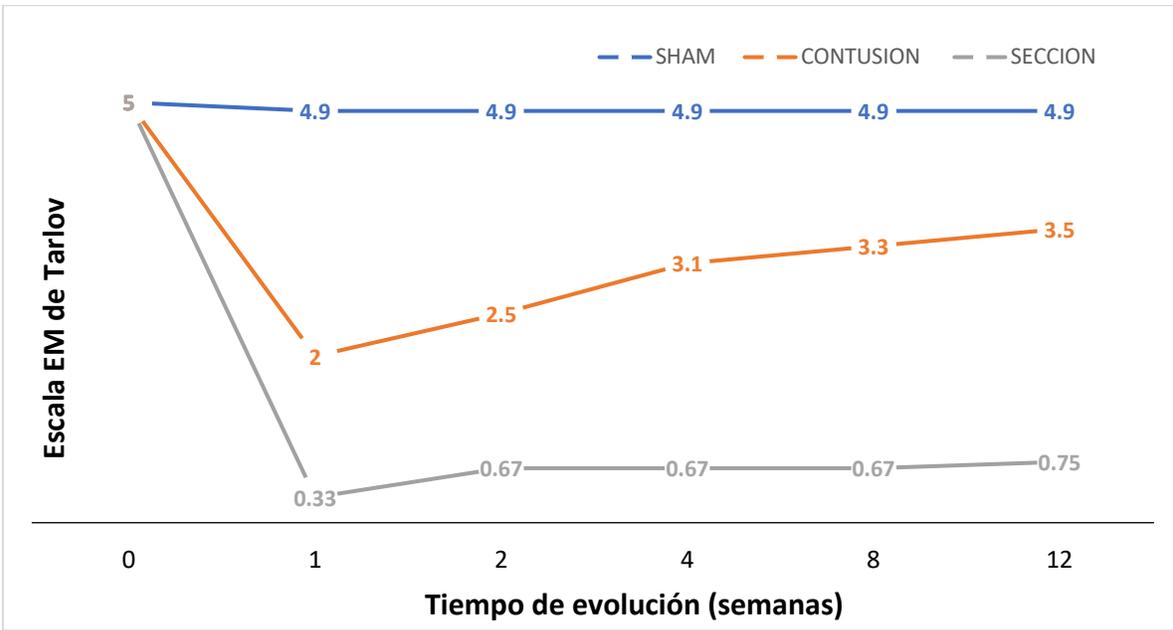


Figura 3. Déficit motor en grupos Sham, contusión y sección con escala EM de Tarlov

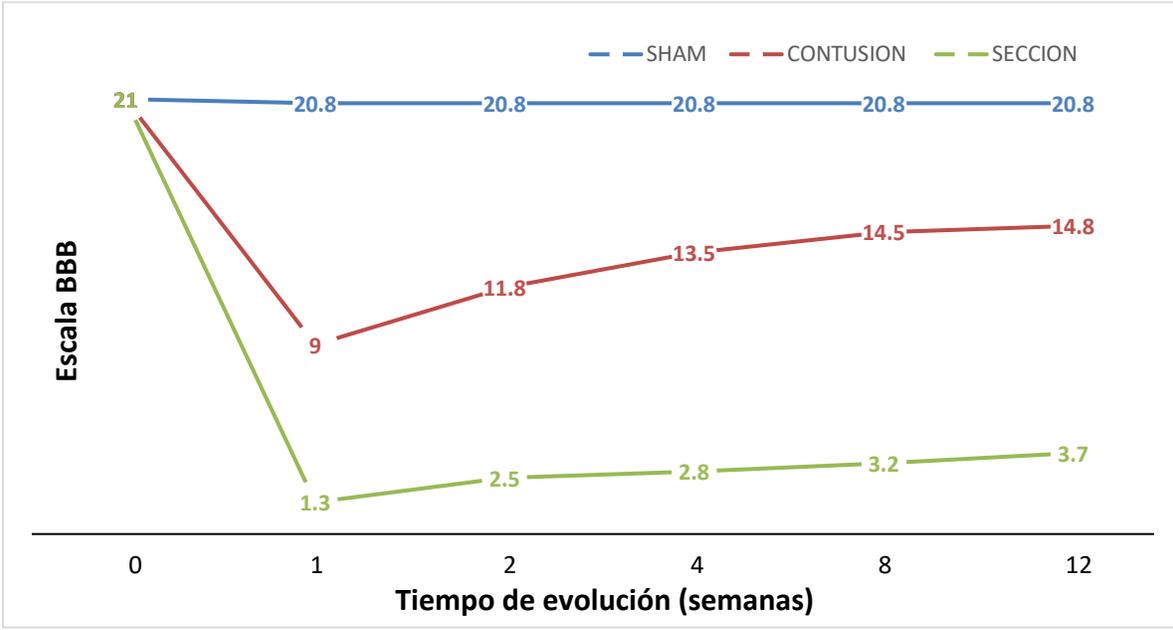
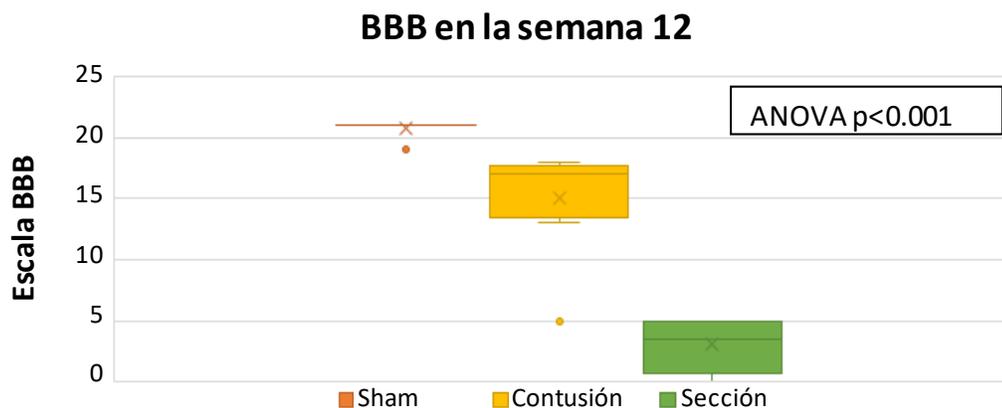


Figura 4. Déficit motor en grupos Sham, contusión y sección con escala BBB



**Figura 5. Prueba ANOVA entre grupos control respecto al déficit motor medido con escala BBB**

Se lograron reproducir lesiones consistentes y déficit neurológico proporcional a la lesión (sección y contusión no severa), también se sostiene que la laminectomía por sí sola no produce déficit neurológico y que las escalas de evaluación del déficit empleada, EM de Tarlov y BBB, fueron consistentes y con fuerte correlación.

### 8.3 Recuperación motora

En cuanto al segundo objetivo específico y total para nuestro objetivo general, el comparar la recuperación motora obtenida en los diferentes grupos de tratamiento y en los controles, la información la describimos en las siguientes tablas (9 a 14) y la podríamos resumir de la siguiente manera:

Se muestra el promedio de la valoración neurológica motora EM de Tarlov, tanto basal, como en semanas 1 a 12. En cada uno de los grupos para el caso de sección medular completa (Tabla 9) y para cada grupo con lesión por contusión (Tabla 10), aclarando que el grupo tratado con polietilenglicol sólo se sometió a sección y por eso solo aparece en la Tabla 9 y no en la 10.

En cuanto a la evaluación de escala motora simplificada de Tarlov (Tabla 9), en el grupo de sección en todos los grupos de tratamiento hay diferencia evidente respecto al grupo

control, siendo mayores en los grupos con trasplante de bulbo olfatorio asociado a fármacos. Mientras que existe bastante uniformidad en la evolución de las medias en todos los grupos de tratamiento de los casos sometidos a contusión, con poca desviación respecto al grupo control, con la excepción de los grupos con asociación de trasplante de bulbo olfatorio y fármacos donde a las 12 semanas se alcanzaron recuperaciones de 4 y 4.3, respectivamente (Tabla 10).

En las Tablas 11 y 12 mostramos la evolución de recuperación motora medida con escala BBB en los diferentes grupos de sección y contusión, respectivamente.

**Tabla 9. Recuperación motora medida con escala EM de Tarlov en sección medular**

EM DE TARLOV EN SECCIÓN MEDULAR, media +/- (error estándar)								
N	10	8	4	3	4	3	3	10
SEMANA	SHAM	CONTROL S/TX	TA	TAC	TBO	TBO-TA	TBO-TAC	POLIETILENGLICOL
0	5	5	5	5	5	5	5	5
1	4.9 (.1)	0.33(.16)	1.4(.40)	1.75(.25)	1.6 (.51)	2(.31)	1.8(.58)	2.7(.29)
2	4.9 (.1)	0.66(.16)	2.4(.67)	2.66(.66)	1.8 (.58)	2.75(.25)	2.5 (.64)	3.1 (.20)
4	4.9 (.1)	0.66(.16)	2.6(.51)	3 (.57)	2.4 (.60)	3.25(.25)	3.25(.47)	3.1 (.20)
8	4.9 (.1)	0.66(.16)	3(.54)	3.3 (.57)	3 (.70)	3.33(.30)	3.25(.47)	3.4 (.25)
12	4.9 (.1)	0.75(.17)	3(.54)	3.3 (.57)	3.2 (.89)	3.33(.33)	3.5 (.47)	3.5 (.30)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, colcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

**Tabla 10. Recuperación motora medida con EM de Tarlov en contusión medular**

EM DE TARLOV EN CONTUSIÓN MEDULAR, media +/- (error estándar)							
N	10	8	5	3	5	4	4
SEMANA	SHAM	CONTROL S/TX	TA	TAC	TBO	TBO-TA	TBO-TAC
0	5	5	5	5	5	5	5
1	2.7 (.29)	2 (.26)	2.2 (.20)	2.3 (.33)	2.75 (.29)	3.2 (.20)	3 (.05)
2	3.1 (.20)	2.5 (.26)	3 (.31)	3 (.33)	3.25 (.40)	3.2 (.20)	3.6 (.20)
4	3.1 (.20)	3.1 (.22)	3.3 (.47)	3.3 (.33)	3.5 (.28)	3.6 (.24)	4.3 (.20)
8	3.4 (.25)	3.3 (.22)	3.5 (.44)	3.3 (.66)	3.5 (.30)	3.7 (.24)	4.3 (.25)
12	3.5 (.30)	3.5 (.18)	3.5 (.29)	3.3 (.66)	3.75 (.48)	4 (.25)	4.3 (.30)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, colcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

**Tabla 11. Recuperación motora medida con escala BBB en sección medular**

BBB EN SECCIÓN MEDULAR, media +/- (error estándar)								
N	10	8	4	3	4	3	3	10
SEMANA	SHAM	CONTROL S/TX	TA	TAC	TBO	TBO-TA	TBO-TAC	POLIETILEN-GLICOL
0	21	21	21	21	21	21	21	21
1	20.8(.2)	1.33(.55)	5.4 (1.5)	7.7 (1.3)	8 (2.2)	10.4(1.6)	7.6 (0.3)	10.5 (0.6)
2	20.8(.2)	2.55(.68)	8.6 (2.6)	9.6 (3.2)	8.8(2.6)	13.2(1.1)	10.7(1.3)	12.4 (0.6)
4	20.8(.2)	2.88(.79)	11.6(2.3)	11.6(2.3)	10.6(2.6)	14.2(1.0)	12.7(1.1)	12.6 (0.6)
8	20.8(.2)	3.22(.86)	13 (2.2)	12.6(2.9)	12.6(3.1)	15.3(1.2)	14 (0.6)	13.9 (0.7)
12	20.8(.2)	3.75(.86)	14 (2.4)	14.3(2.3)	14 (2.6)	16 (1.7)	15.2(0.7)	14.5 (0.7)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, colcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

**Tabla 12. Recuperación motora medida con escala BBB en grupos de contusión medular**

BBB EN CONTUSIÓN MEDULAR, media +/- (error estándar)							
N	10	8	5	3	5	4	4
SEMANA	SHAM	CONTROL S/TX	TA	TAC	TBO	TBO-TA	TBO-TAC
0	21	21	21	21	21	21	21
1	20.8(.2)	9 (1.2)	9.6 (.67)	10 (1.0)	11.7 (1.8)	14.4 (0.5)	14.3 (0.3)
2	20.8(.2)	11.8 (0.8)	13.6 (1.3)	15 (0.1)	13.7 (1.6)	15.6 (0.7)	15.6 (1.3)
4	20.8(.2)	13.5 (1.0)	13.7 (1.4)	15.6(0.7)	15 (1.6)	15.8 (1.1)	17 (1.1)
8	20.8(.2)	14.5 (0.8)	15 (0.9)	16 (1.0)	15.2 (1.5)	16 (1.4)	17 (0.6)
12	20.8(.2)	14.8 (0.7)	15 (0.5)	16 (1.1)	15.7 (1.2)	16.5 (1.3)	17.6(0.7)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, colcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

Podemos observar de igual manera una muy importante diferencia en el grupo de sección, donde todos los grupos de tratamiento presentan significativa recuperación respecto al grupo control (Tabla 11), mientras que, en los grupos con contusión, aunque hay superioridad de promedios de los grupos de tratamiento, esta es marginal respecto al grupo control.

Se realizó una comparación asociando al total de los grupos, con contusión y sección asignados a cada grupo, denominándose genéricamente de Lesión medular, con el grupo resultante de asociar los grupos control de contusión y sección sin tratamiento. Dicha comparación se hizo para ambas escalas EM y BBB (Tablas 13 y 14).

Aquí podemos apreciar que en ambas escalas se aprecia diferencia en todos los tipos de tratamiento respecto a los controles de lesión sin tratamiento, siendo más importante en los grupos de trasplante de bulbo olfatorio asociado a fármacos.

**Tabla 13. Recuperación motora con escala EM en lesión medular (agrupa sección y contusión)**

EM LESIÓN MEDULAR (CONTUSIÓN/SECCIÓN) media +/- (error estándar)								
SEMANA	10 SHAM	16 LESIÓN S/TX	9 TA	6 TAC	9 TBO	7 TBO-TA	7 TBO-TAC	10 POLIETILEN- GLICOL
0	5	5	5	5	5	5	5	5
1	4.9	1.1 (0.2)	1.8 (0.3)	2 (0.3)	2.1(0.0)	2.6(0.0)	2.4(0.3)	2.7 (.29)
2	4.9	1.5 (0.2)	2.7 (0.5)	2.8(0.5)	2.5(0.0)	3.0(0.2)	3.0(0.4)	3.1 (.20)
4	4.9	1.8(0.1)	2.9 (0.5)	3.1(0.5)	2.9(0.0)	3.4(0.0)	3.7(0.3)	3.1 (.20)
8	4.9	2.0(0.19)	3.2 (0.5)	3.3(0.6)	3.2(0.0)	3.5(0.0)	3.7(0.3)	3.4 (.25)
12	4.9	2.1(0.1)	3.2 (0.5)	3.3(0.6)	3.5(0.0)	3.6(0.0)	3.9(0.4)	3.5 (.30)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, calcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

**Tabla 14. Recuperación motora con escala BBB en lesión medular (agrupa sección y contusión)**

BBB LESIÓN MEDULAR (CONTUSIÓN / SECCIÓN) media+/- (error estándar)								
SEM	SHAM	LESIÓN S/TX	TA	TAC	TBO	TBO-TA	TBO-TAC	POLIETILENGLICOL
0	21	21	21	21	21	21	21	21
1	20.8	5.1(.85)	7.5(1.1)	8.8(1.2)	8.8(2.0)	12.4(1.1)	11.0(0.3)	10.5(0.6)
2	20.8	7.1(.75)	11.1(2.0)	12.8(1.6)	11.2(2.0)	14.4(0.9)	13.1(1.0)	12.4(0.6)
4	20.8	8.1(.80)	12.6(1.0)	13.6(1.5)	12.8(2.0)	15.0(1.3)	14.8(1.2)	12.6(0.6)
8	20.8	8.8(.90)	14.0(1.6)	14.3(2.0)	13.9(2.0)	15.6(1.3)	15.5(0.6)	13.9(0.7)
12	20.8	9.2(.80)	14.5(1.0)	15.1(1.7)	14.8(2.0)	16.2(1.5)	16.4(0.7)	14.5(0.7)

S/TX=sin tratamiento, TA=Taxol-Ambroxol, TAC=Taxol-Ambroxol, calcicina, TBO= Trasplante de bulbo olfatorio

Como puede apreciarse, hay una marcada diferencia entre el grupo control (sección sin tratamiento) y todos los grupos experimentales (sección y tratamiento), siendo estos últimos bastante uniformes, pero con tendencia a ser mejor la recuperación en los grupos con TBO-TA, TBO-TAC y PEG (Fig. 6). Por otro lado, estas diferencias disminuyen entre el grupo control contusión sin tratamiento y los grupos contusión con tratamiento solo con fármacos; pero también se insinúa leve superioridad de los tres: TBO-TA, TBO-TAC y polietilenglicol (Fig. 7).

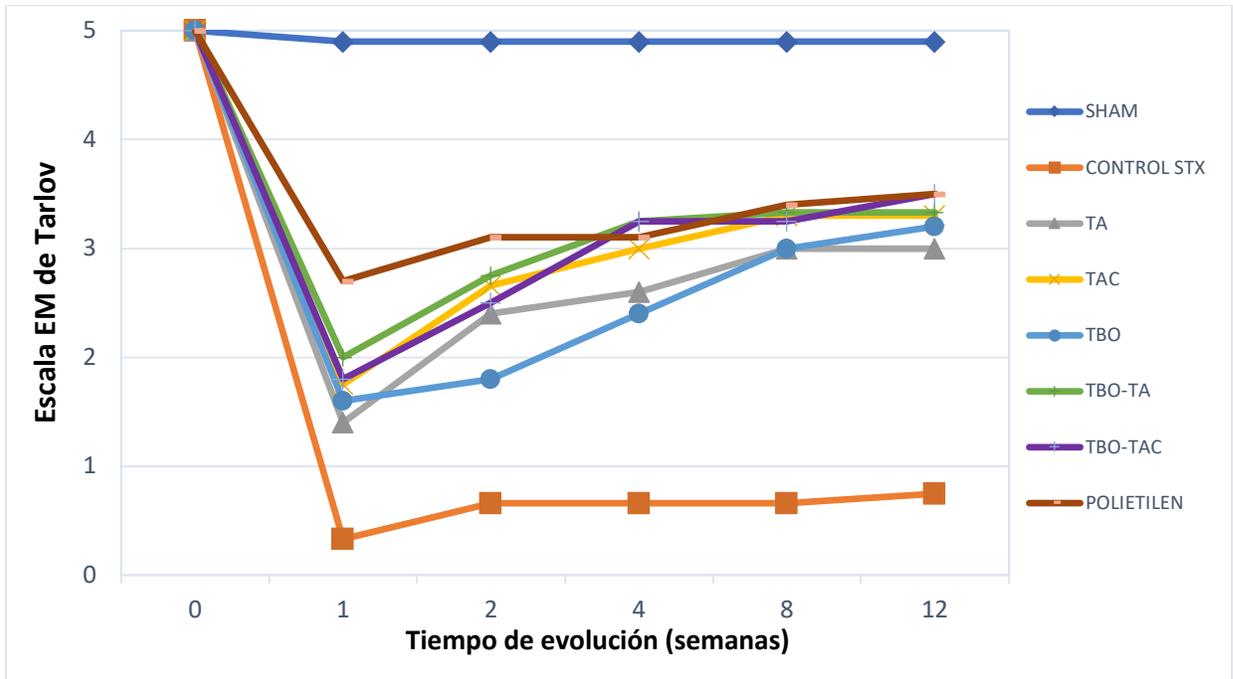


Figura 6. Evolución en escala motora de EM de Tarlov basal a la semana 12 en todos los grupos de sección

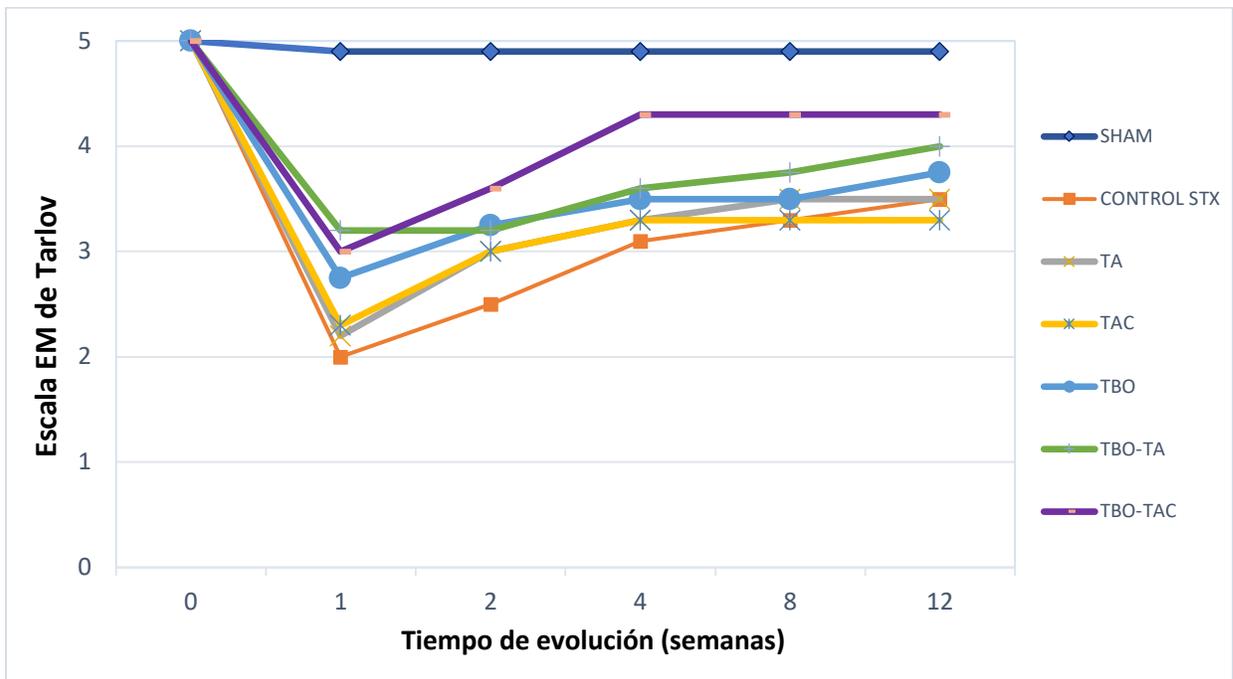
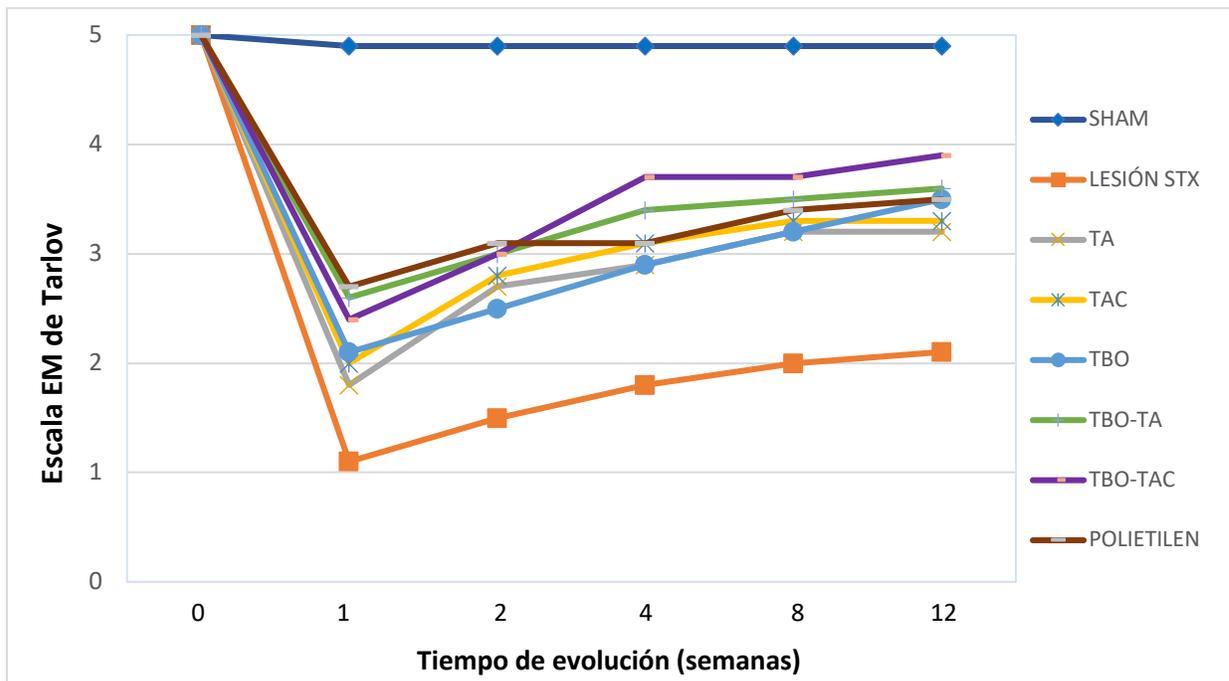


Figura 7. Evolución en escala motora EM de Tarlov basal a 12 semanas en grupos de contusión medular

En un intento de análisis general de "Lesión Medular", agrupamos tanto los casos de contusión como de sección para cada grupo (Tabla 13, Fig. 8). Como puede notarse, aquí sí se logra ver clara diferencia entre los grupos control (sección y contusión sin tratamiento y los grupos con tratamiento, manteniéndose la ligera ventaja de recuperación de los 3 grupos señalados. Los resultados obtenidos con la evaluación con escala BBB, ya mostrados en las Tablas 11, 12 y 14, se representan de manera gráfica en las figuras 9, 10 y 11.



**Figura 8. Evolución en EM de Tarlov basal a 12 semanas en "Lesión Medular" (conjunta contusión y sección medular)**

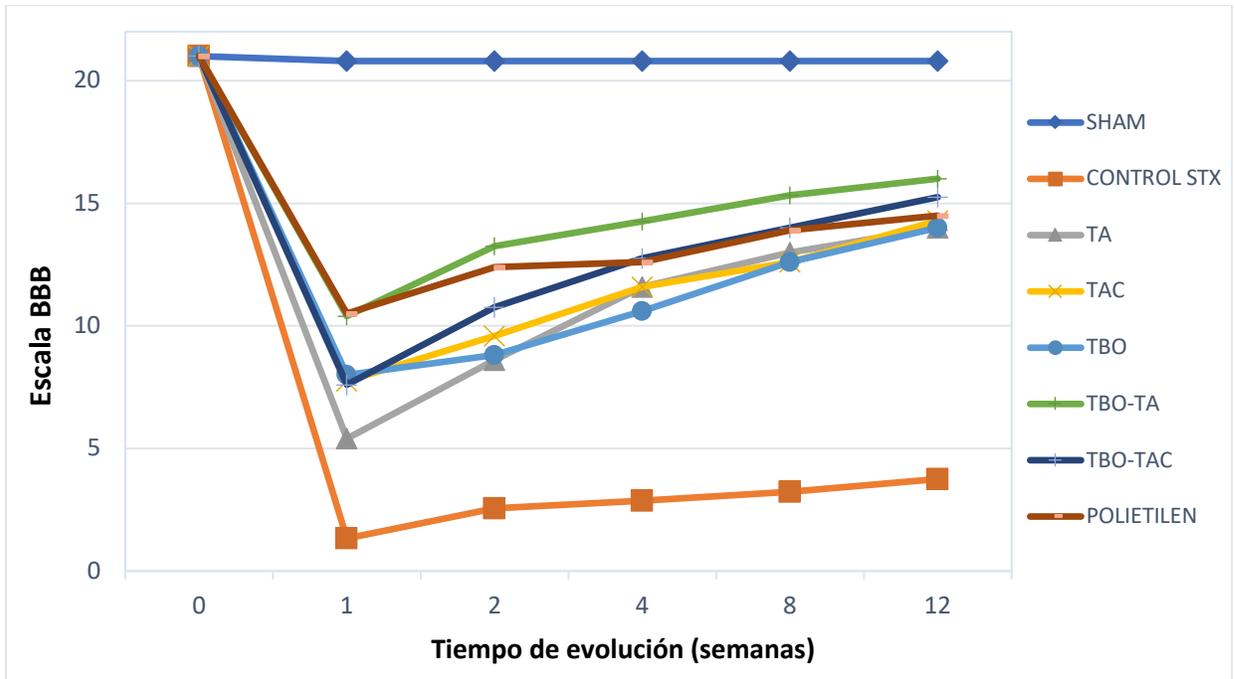


Figura 9. Evolución con escala BBB basal a 12 semanas en los grupos de sección medular

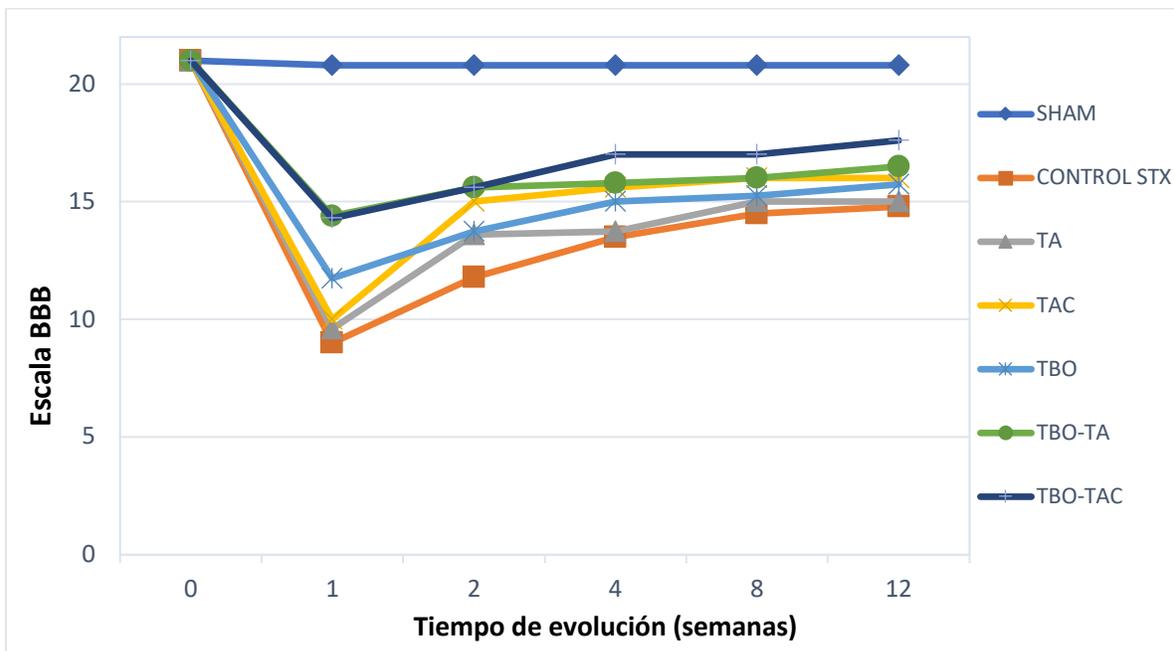


Figura 10. Evolución con escala BBB basal a 12 semanas en grupos de contusión medular

Como se puede observar, también en los grupos de sección medular existe una diferencia muy notoria y significativa entre el grupo control (sección sin tratamiento) y los grupos con tratamiento, mientras que en los grupos con contusión, solo hay una superioridad poco visible. En ambos casos, se nota una leve superioridad de los grupos de tratamiento TBO-TA, TBO-TAC y polietilenglicol, respecto a otras modalidades de tratamiento.

La información dada en la Tabla 13, donde se conjuntan los grupos de sección y contusión medular con y sin tratamiento en un solo grupo de "Lesión medular", comparando su recuperación valorada con la escala BBB, se presenta a continuación en la figura 12. De nueva cuenta, se hace evidente una diferencia entre grupos control de lesión sin tratamiento y los distintos grupos de tratamiento, pero se torna más estrecha la diferencia entre estos últimos.

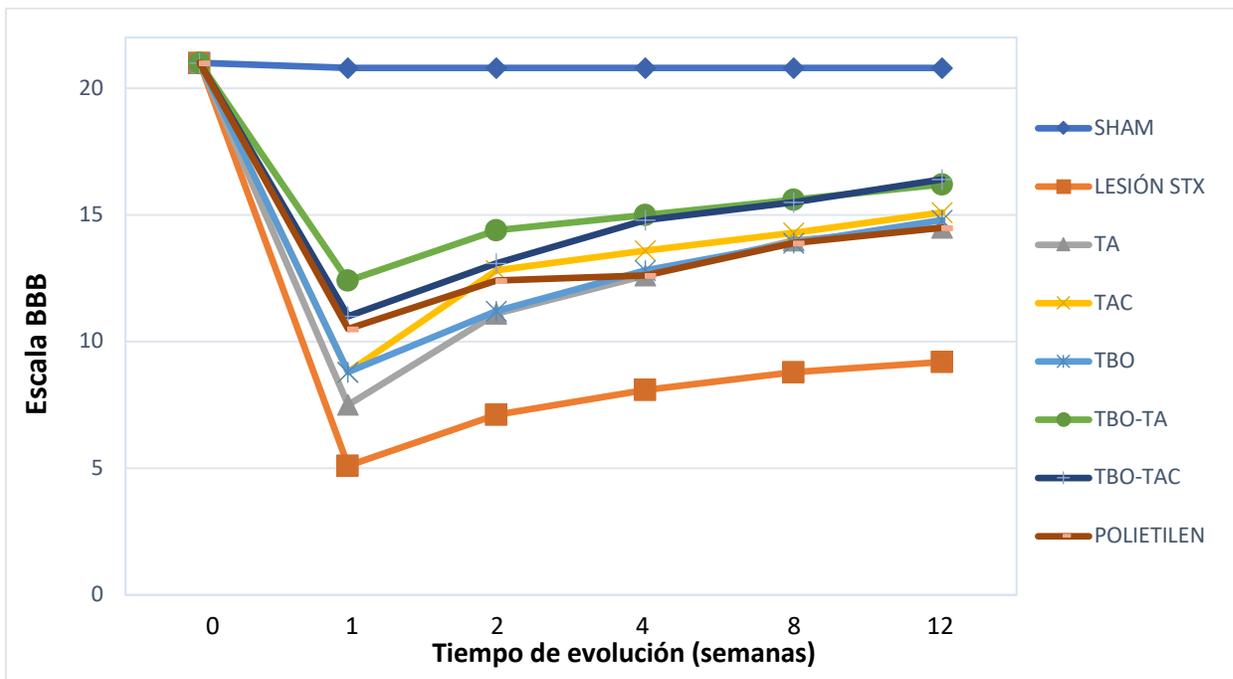
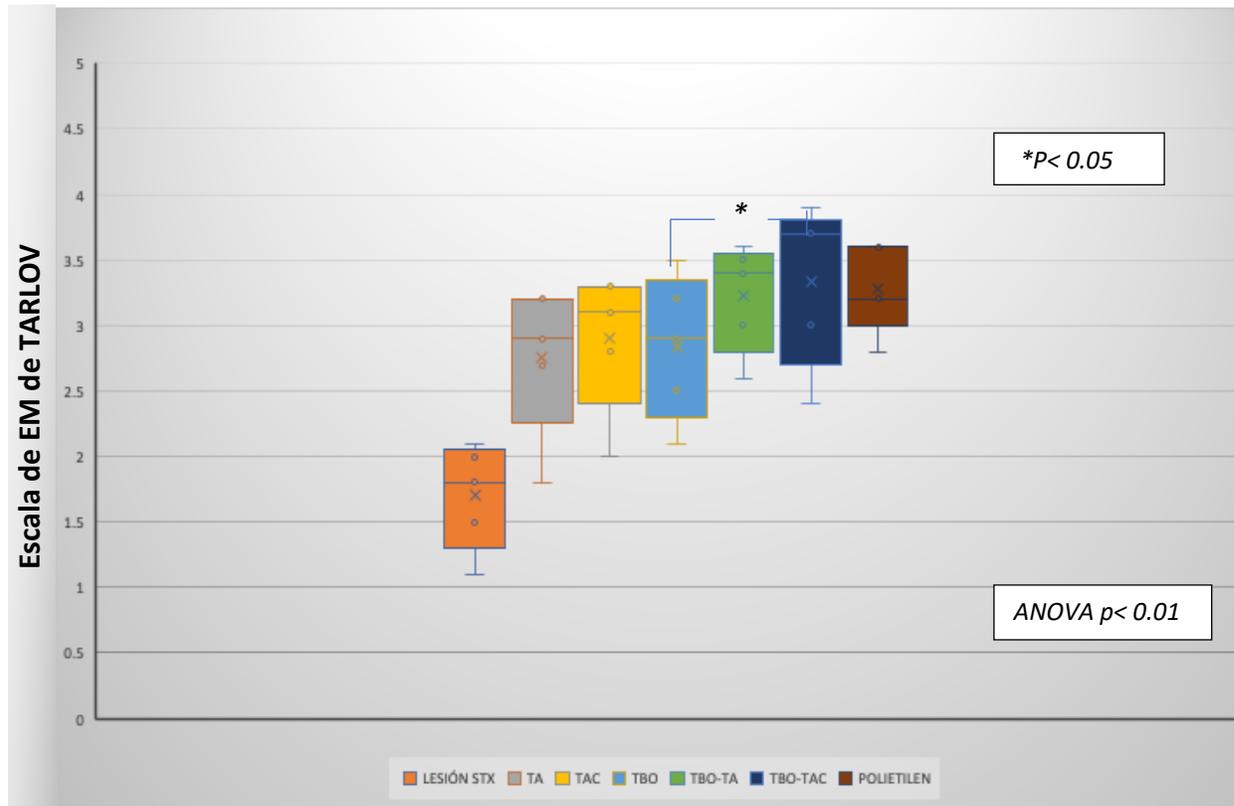


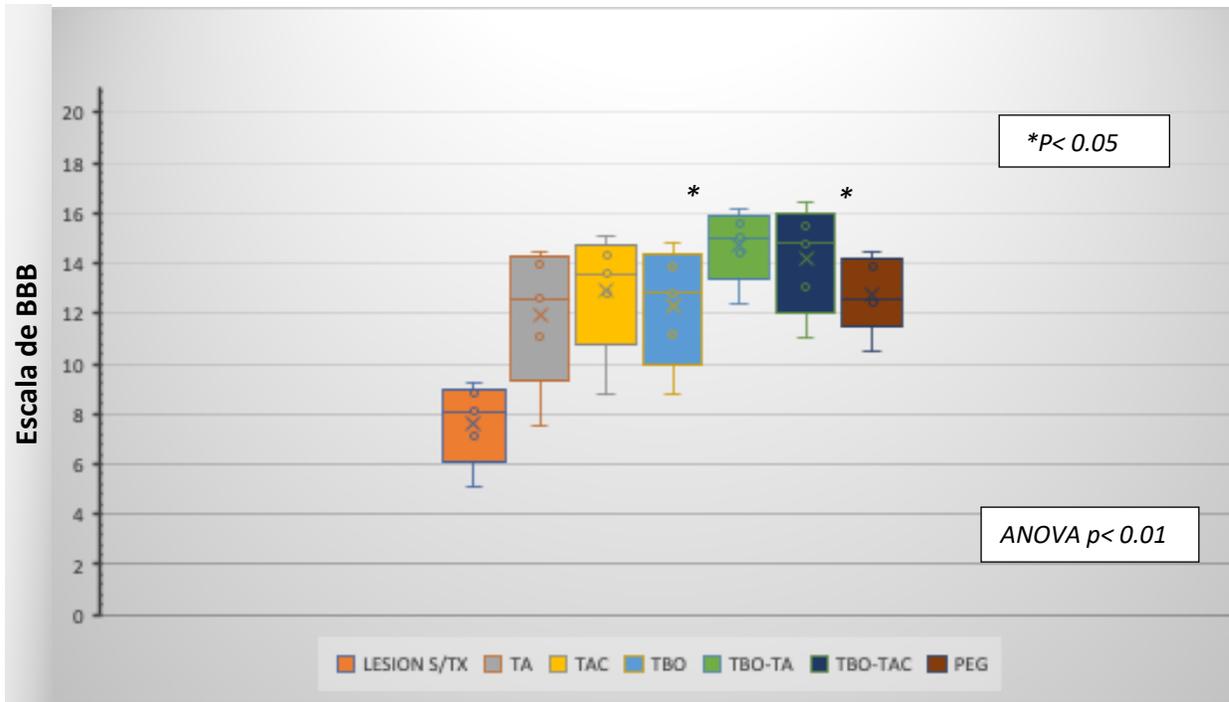
Figura 11. Evolución con escala BBB en los grupos de "Lesión Medular" (conjunta contusión y sección)

Por último, se presenta en los gráficos 12 y 13 la distribución de las evaluaciones EM de Tarlov (Fig. 12) y la evaluación BBB (Fig. 13) con sus medias y desviaciones estándar, y el cálculo del análisis de varianza ANOVA, enfatizando donde se encontraron las diferencias significativas.



**Figura 12. ANOVA de la evaluación motora de EM de Tarlov en lesión medular**

Los resultados de la prueba de ANOVA en EM (Fig. 12), como en BBB, en los diferentes grupos, demostraron significancia estadística con homogeneidad de las varianzas en la Prueba de Levene y en el post Hoc de Tukey, donde se aprecia diferencia estadísticamente significativa en todos los grupos de tratamiento respecto al control  $< 0.01$ , y solo diferencia estadísticamente significativa en nivel del 5% entre los grupos TBO-TA y TBO TAC, en comparación a los otros grupos de tratamiento (se ilustra en figura 13).



**Figura 13. ANOVA de BBB en lesión medular**

En cuanto a la aplicación del video tracking a la evaluación en arena, debemos puntualizar que representa mucha utilidad, pues permite valoraciones detenidas y repetidas por la reproducción del mismo, proporciona tanto datos cuantificables estadísticos, sobre todo Distancia recorrida en mm, aceleración máxima alcanzada, velocidad promedio y número de levantamientos en patas traseras; además, su revisión detenida en el video permite al evaluador determinar si son transitorios y débiles o firmes y sostenidos. También proporciona datos gráficos del trayecto con su demarcación Fig. 14 y 15)

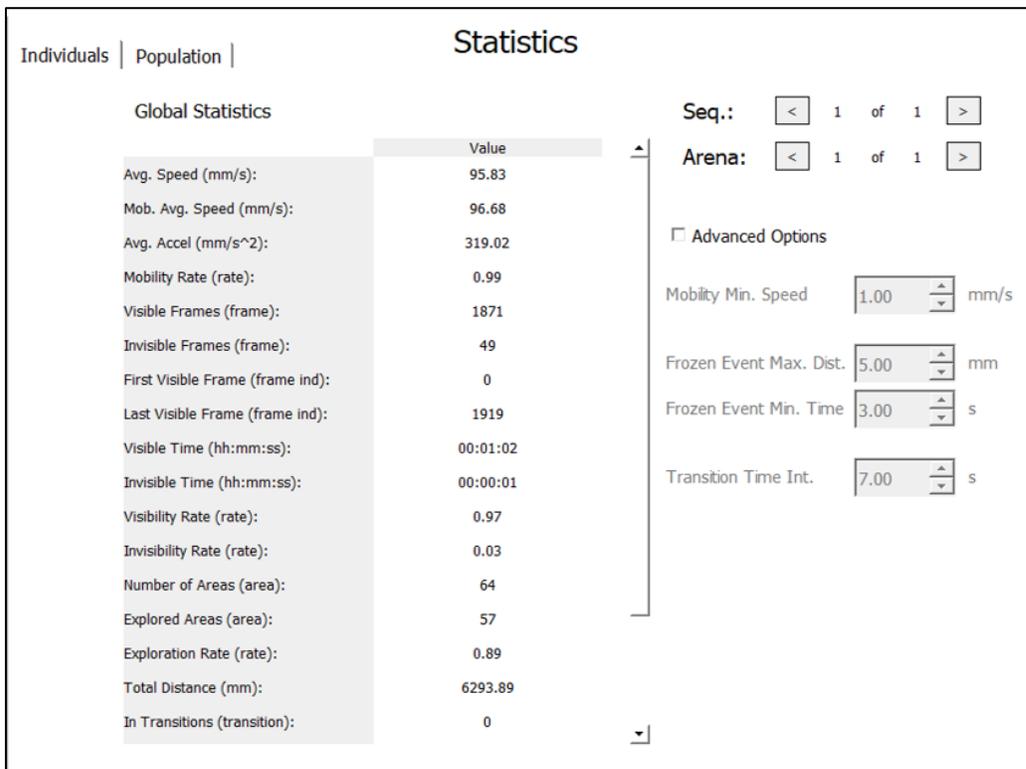
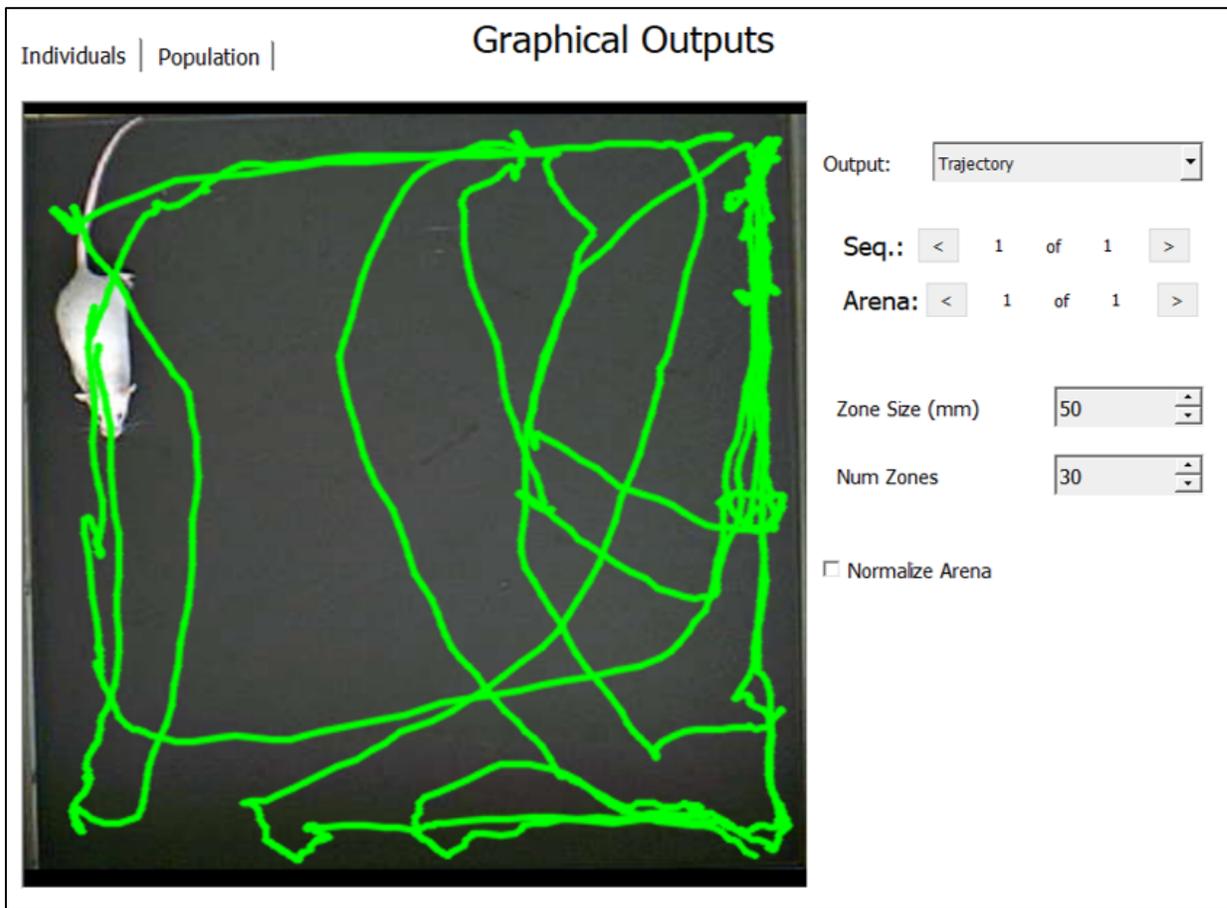
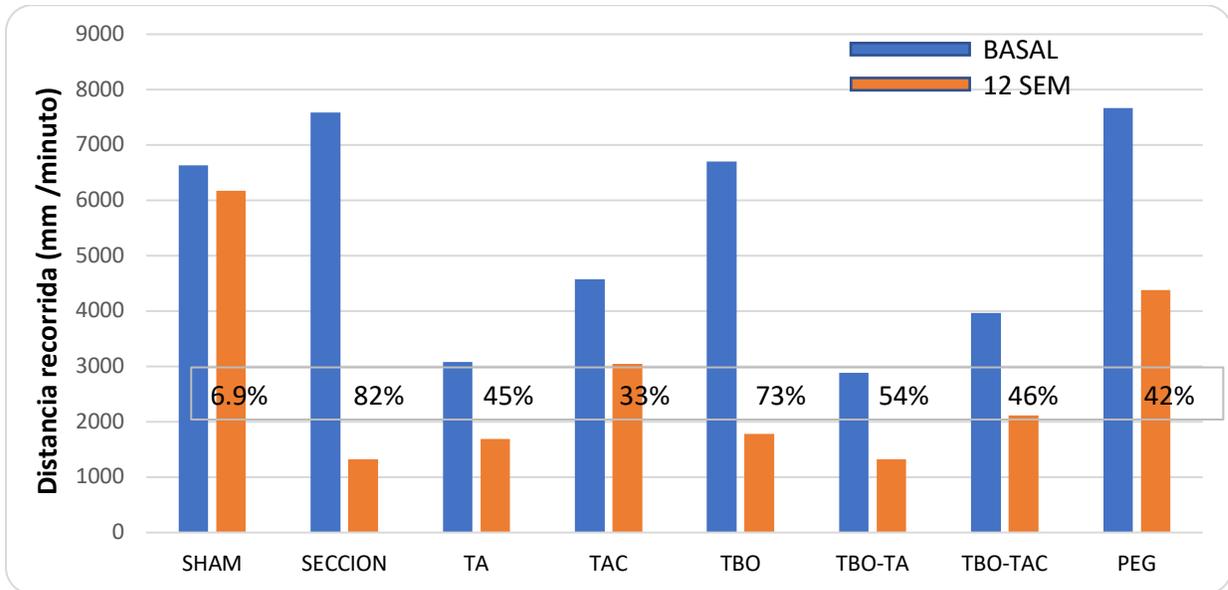


Figura 14. Información estadística que proporciona un videotracking con el programa ToxTrac



**Figura 15. Pantalla de información gráfica del programa ToxTrac**

De esta información es relevante realizar el análisis de la distancia recorrida basal y compararla a la distancia recorrida por los animales a las 12 semanas, así como el promedio de levantamientos firmes en patas traseras en evaluaciones estándar de 1 min. Se calculó el valor absoluto y el porcentaje de decremento en cada uno de los grupos, lo cual es de mayor valor para discernir diferencias sutiles en la “fuerza motriz” de los animales y no solo la evaluación numérica de una escala. En el grupo de sección sin tratamiento el decremento fue mayor al 80%, y en los grupos de tratamiento a excepción del TBO donde fue también alto de 73%, se mantuvo alrededor del 40% (Fig. 16-18).



**Figura 16. Distancia recorrida basal y a las 12 semanas, enfatizando su porcentaje de decremento en animales seccionados**

El decremento fue notoriamente menor en los grupos de contusión y véase que en el grupo de trasplante de bulbo olfatorio -TAC (TBO-TAC) fue tan bajo como 4% (Fig. 17). En animales control sin tratamiento no hubo ninguna recuperación de levantes y en los grupos con tratamiento una recuperación entre el 20 y el 50%, siendo mayor en los grupos asociados a esquema TAC con y sin trasplante de bulbo olfatorio (Fig. 18).

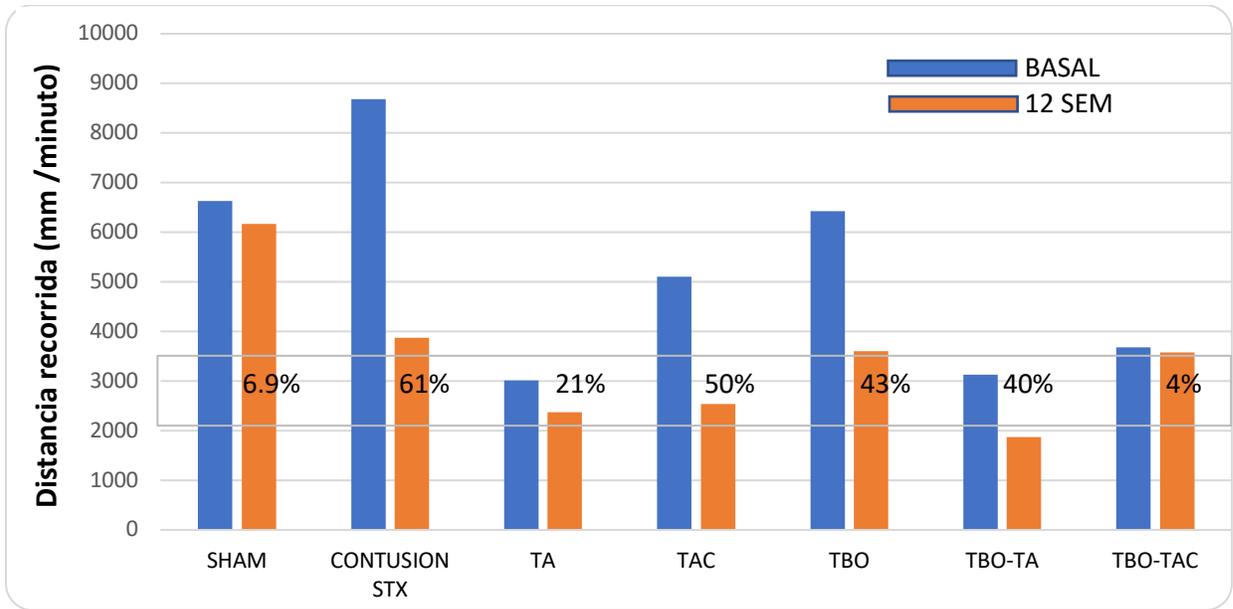


Figura 17. Decremento en la distancia recorrida basal y a las 12 semanas en animales contundidos

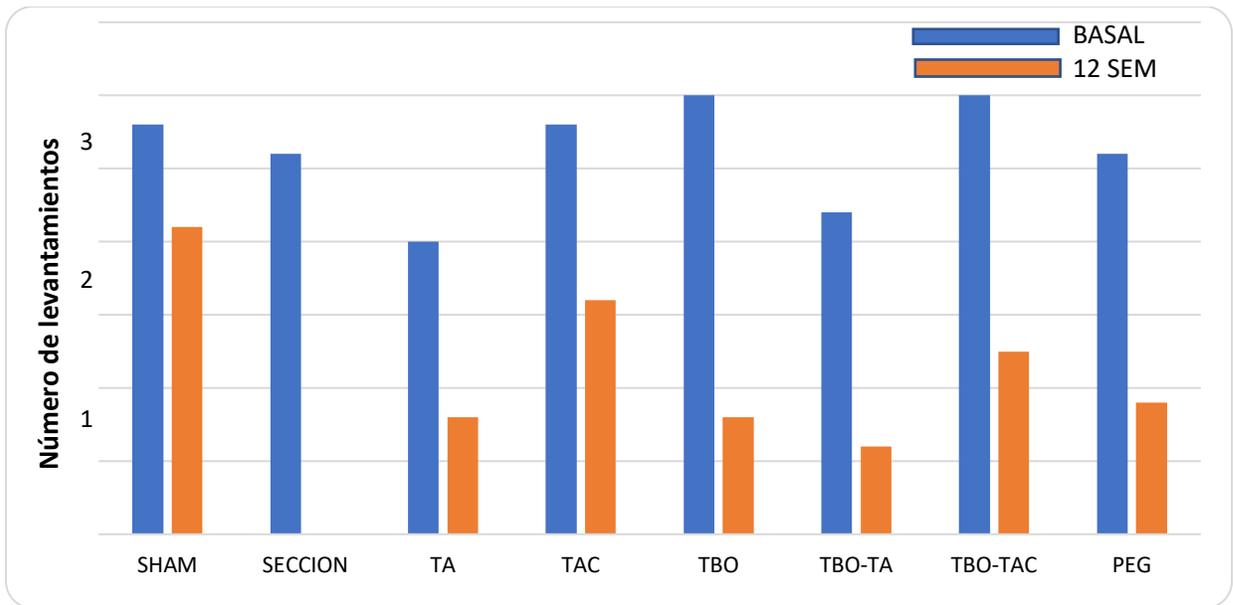


Figura 18. Número de levantamientos sostenidos en patas traseras en animales seccionados

#### 8.4 Resultados de los cortes histológicos

Se compararon los cortes histológicos de al menos 3 casos por grupo, para cortes en parafina con tinciones HyE, Nissl y Golgi-Cajal, todos en sentido longitudinal a la médula, pasando por la zona de lesión y al menos 2 por grupo para cortes transversos en resina para microscopía electrónica.

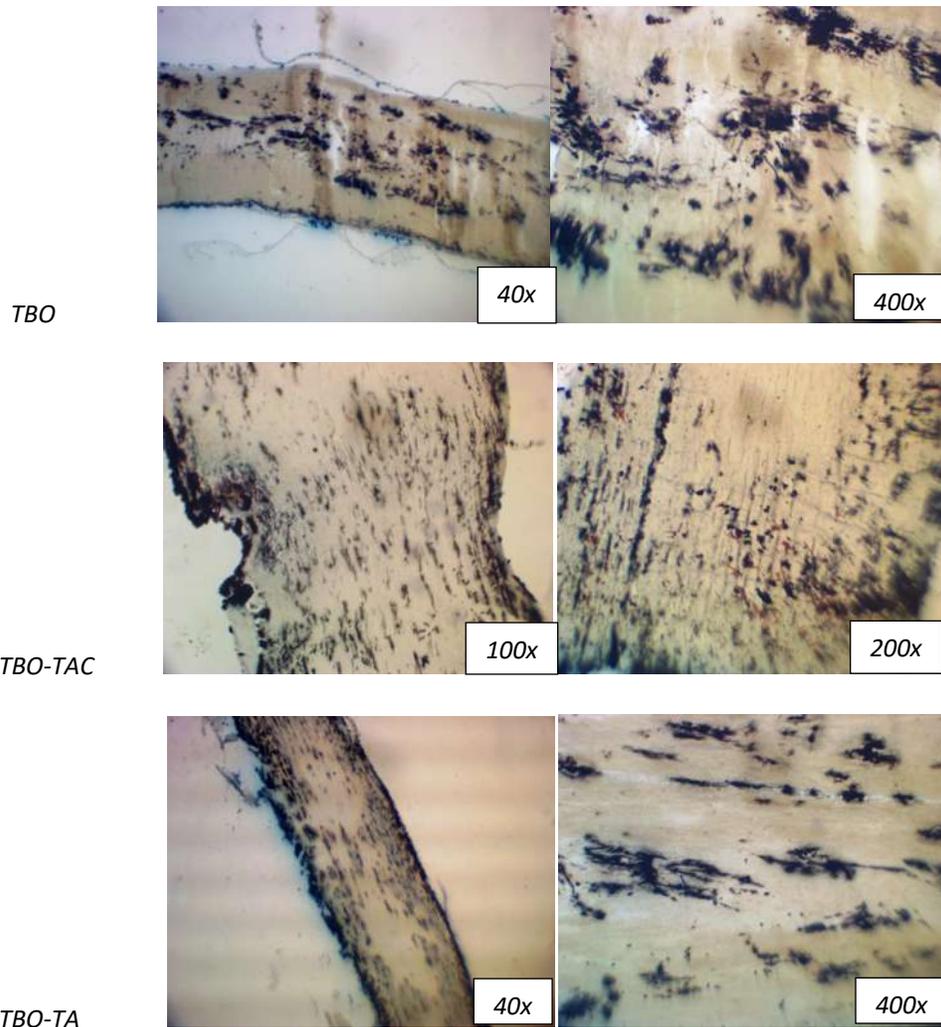
Los resultados son semicuantitativos, comparando lo visualizado en 4 campos a 10x y 8 campos a 40 x, para la microscopia fotónica y en 5 áreas de rejilla de cobre N-100 a 4 y 6 mil aumentos en el microscopio electrónico de transmisión.

Los parámetros analizados en microscopía fotónica fueron: Gdo. gliosis reactiva, Neuronas no atróficas, Prolongaciones cruzando sitio de lesión y en microscopía electrónica: Desmielinización, globos de degeneración y células de glía mielinizantes (Tablas 15 y 16).

**Tabla 15. Resultados semicuantitativos de análisis de cortes histológicos con HyE, Nissl y Golgi Cajal**

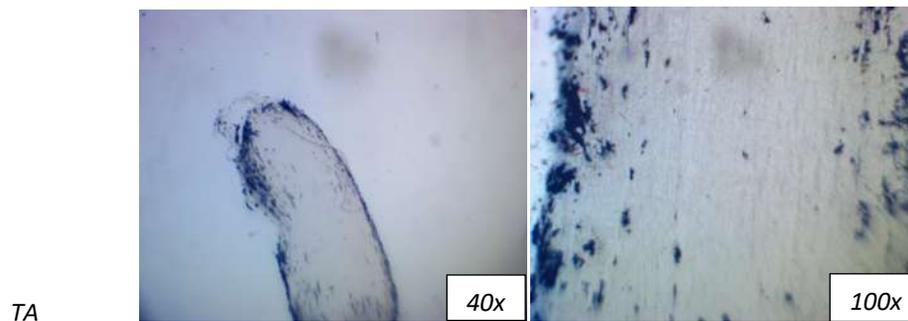
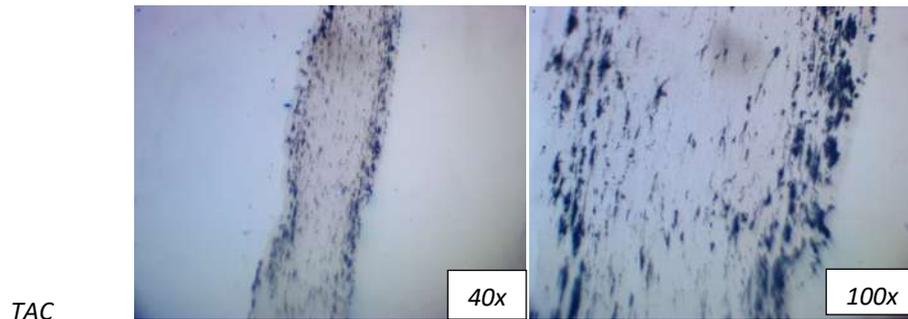
GRUPO	GLIOSIS	NEURONAS NO ATRÓFICAS	NEURITAS CRUZANDO LÍNEA SECCIÓN
SHAM	-	++++	++++
SECC. S/TX	+++	+	-
TA	++	++	++
TAC	++	++	++
TBO	++	+++	+++
TBO-TA	++	+++	+++
TBO-TAC	+	+++	+++
PEG	++	++	++

Como puede apreciarse, en el grupo control sin tratamiento el grado de gliosis cicatrizal y reactiva es muy intenso (+++) y en los grupos de tratamiento menor, siendo aún menor en el grupo TBO-TAC. En todos los grupos de tratamiento se observó buena conservación neuronal y migración neurítica entre ++ y +++ de intensidad, siendo mayor en los grupos que asociaron TBO con o sin fármacos (Fig. 19 - 27).



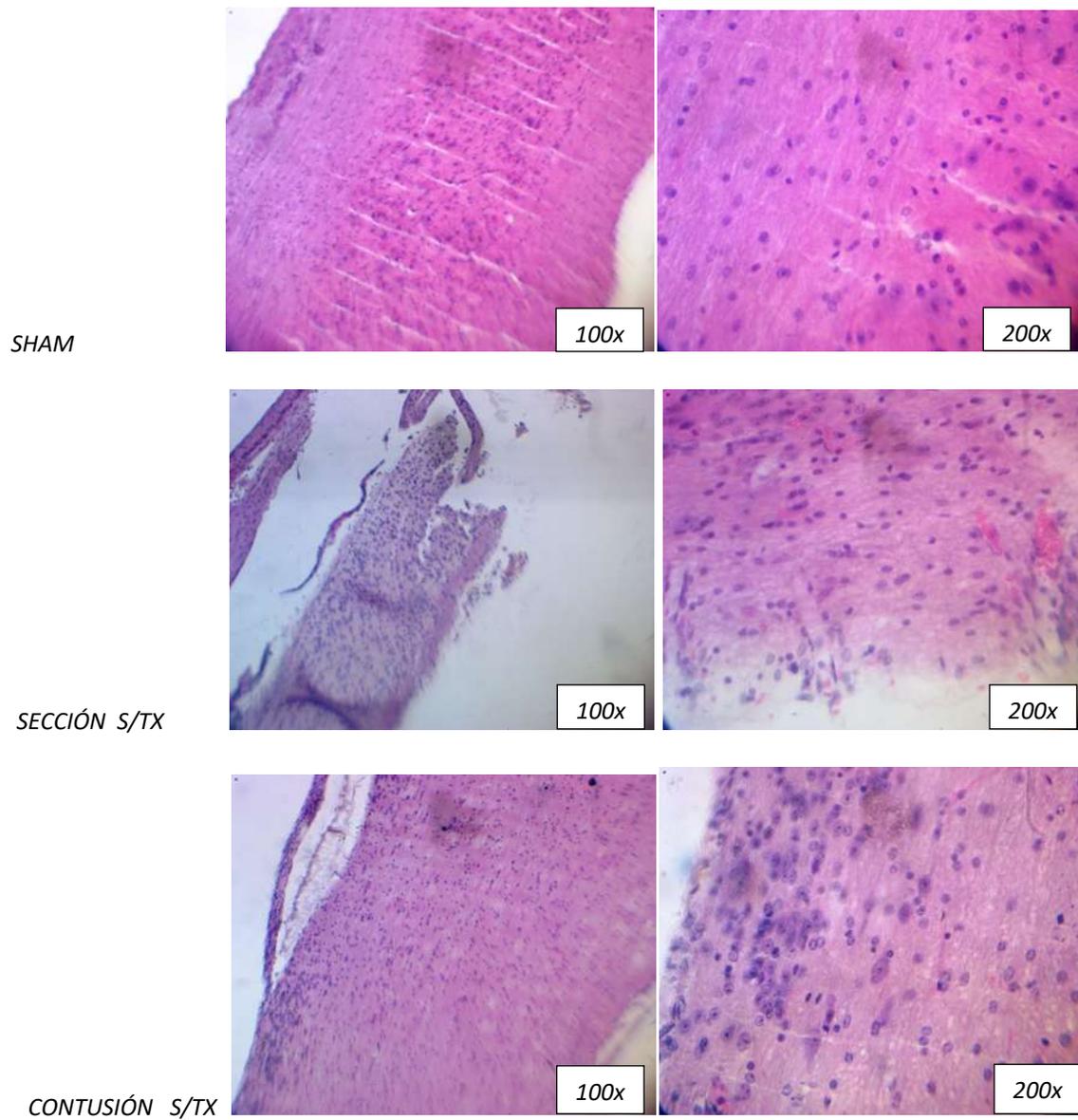
**Figura 19. Tinción de Golgi - Cajal que evidencia células gliales y neuritas traspasando sitio de sección**

TBO- Trasplante bulbo olfatorio, se observa gran cantidad de células gliales. TBO-TAC, células gliales y gran cantidad de neuritas puente, TBO-TA células gliales y menor número de neuritas puente.



**Figura 20. Tinción Golgi - Cajal que evidencia células gliales y neuritas en grupos de solo fármacos**

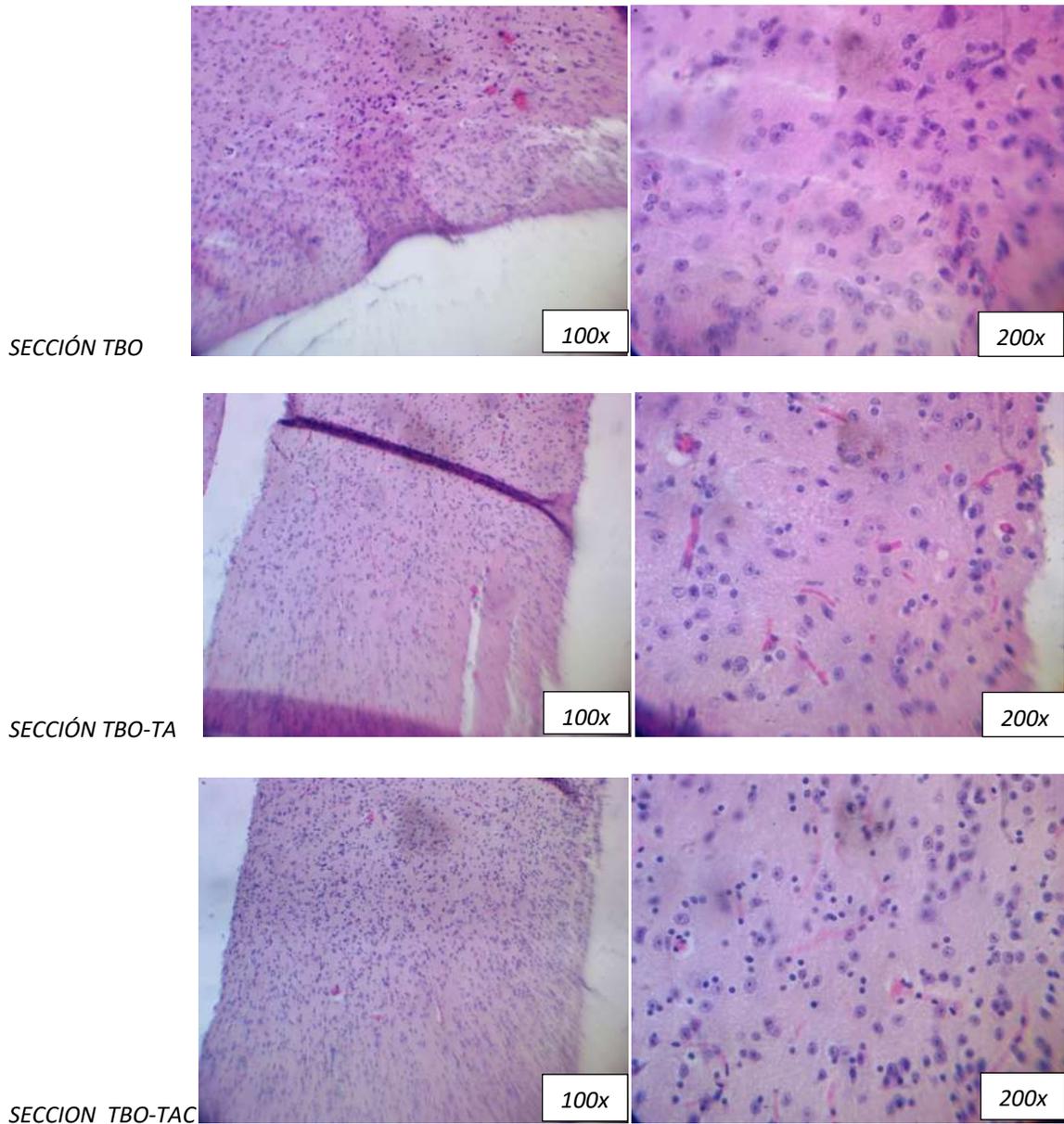
TAC (Taxol, Ambroxol, Colchicina)- se evidencian células gliales en mucha menor proporción a los grupos asociados a trasplante de bulbo olfatorio y regular número de neuritas puente. TA (Taxol-Ambroxol)- mínimas células gliales y escasas neuritas puente.



**Figura 21. Cortes con tinción HyE en grupos Sham, sección y contusión sin tratamiento (controles)**

En el grupo Sham, se delimitan perfectamente los cordones y las zonas de sustancia gris con cuerpos neuronales. La distribución glial es normal. En la sección se observa infiltración glial reactiva en todo el espesor de la médula y en la contusión hay un gradiente de infiltración glial de la zona contundida mas densa, a la zona contralateral. Tanto en la sección,

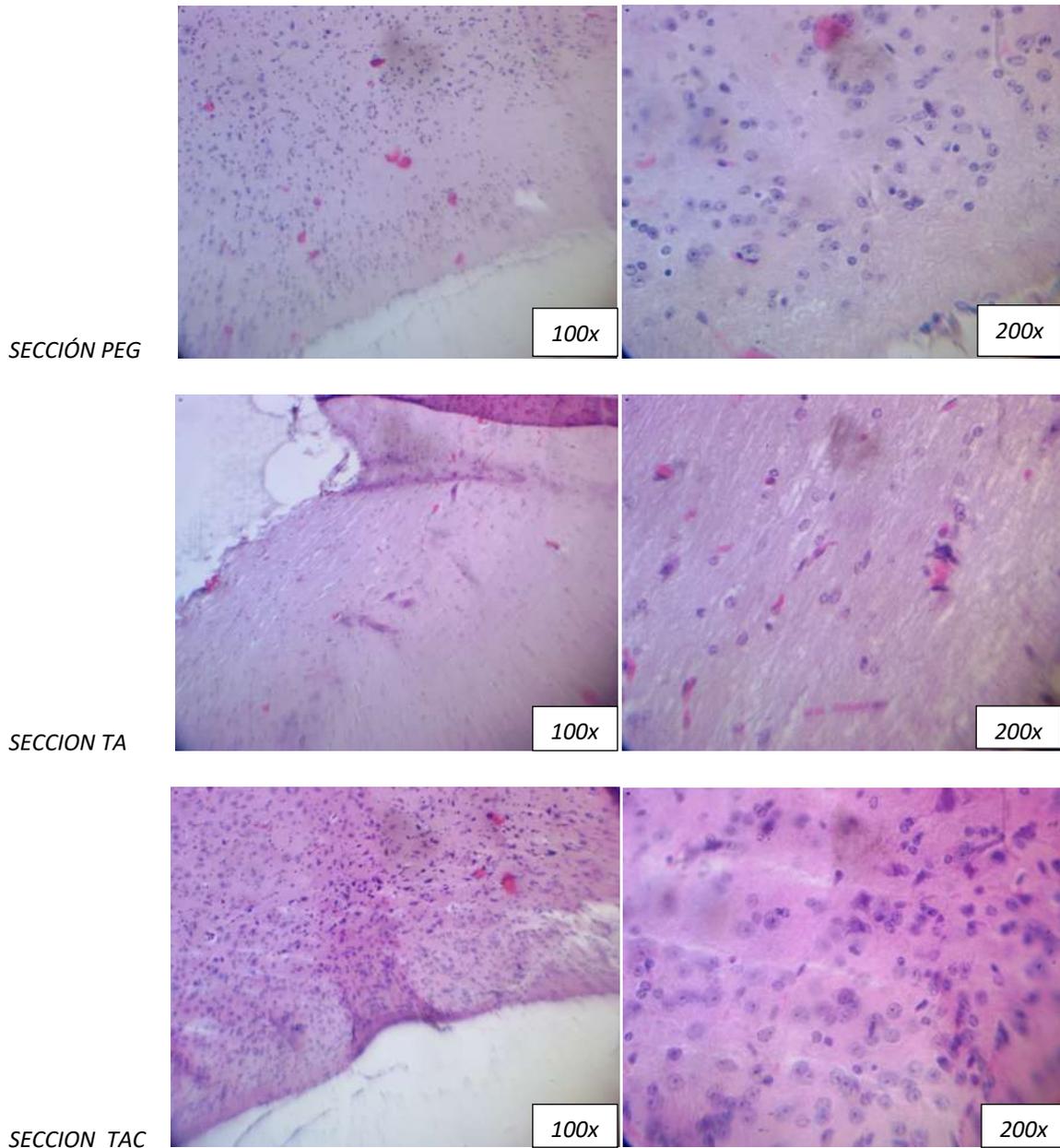
como en la contusión no se observa claramente la diferencia entre cordones y sustancia gris neuronal.



**Figura 22. Cortes HyE en grupos TBO, TBO-TA, TBO-TAC mostrando glía no reactiva y rearreglos vascular y de cordones**

TBO (trasplante de bulbo olfatorio) muestra abundantes células gliales no reactivas, evidencia de permanencia de viabilidad de la glía olfatoria trasplantada, con mínima proliferación vascular y un ordenamiento de cordones. TBO-TA (trasplante bulbo olfatorio-con Taxol y Ambroxol): se observa mayor proliferación vascular, regular número de células de glía

no reactiva. TBO-TAC trasplante de bulbo-Taxol, Ambroxol y Colchicina: con rearreglo y proliferación vascular, densa glía no reactiva y homogeneidad en los cordones.

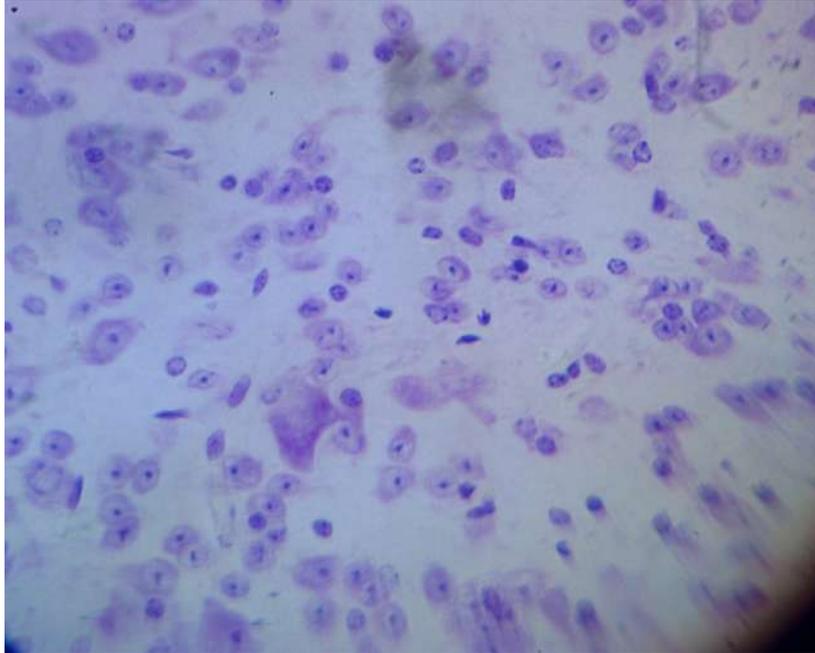


**Figura 23. Tinción HyE de cortes en grupos PEG, TA y TAC**

PEG (polietilenglicol). Se observa gran regularidad y continuidad de cordones, con células gliales autólogas escasas y diferenciación de cordones y materia gris neuronal. TA (Taxol, Ambroxol): se observa continuidad y arreglo de cordones, con menor celularidad. TAC

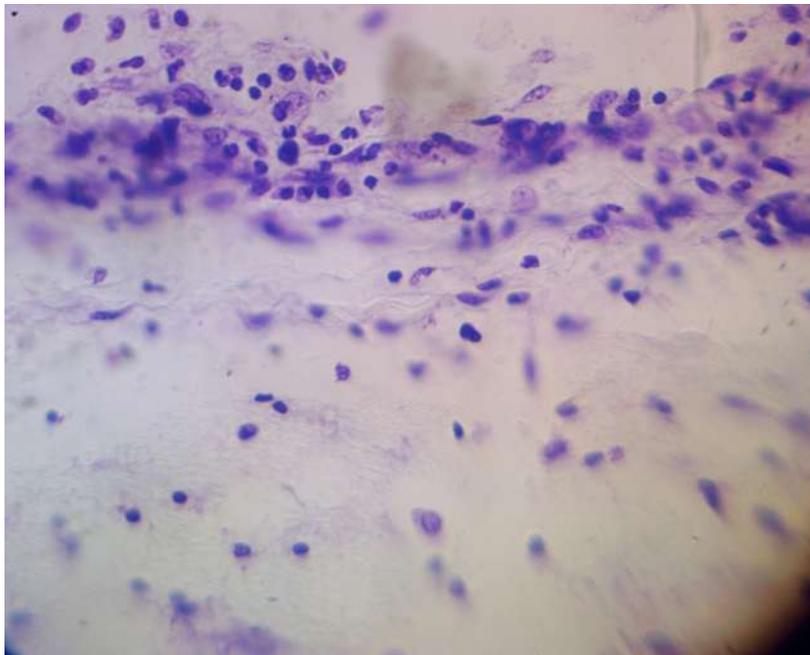
(Taxol, Ambroxol, Colchicina) mayor celularidad, neuronas y glia autóloga y continuidad con arreglo de cordones.

400x



SHAM 40X

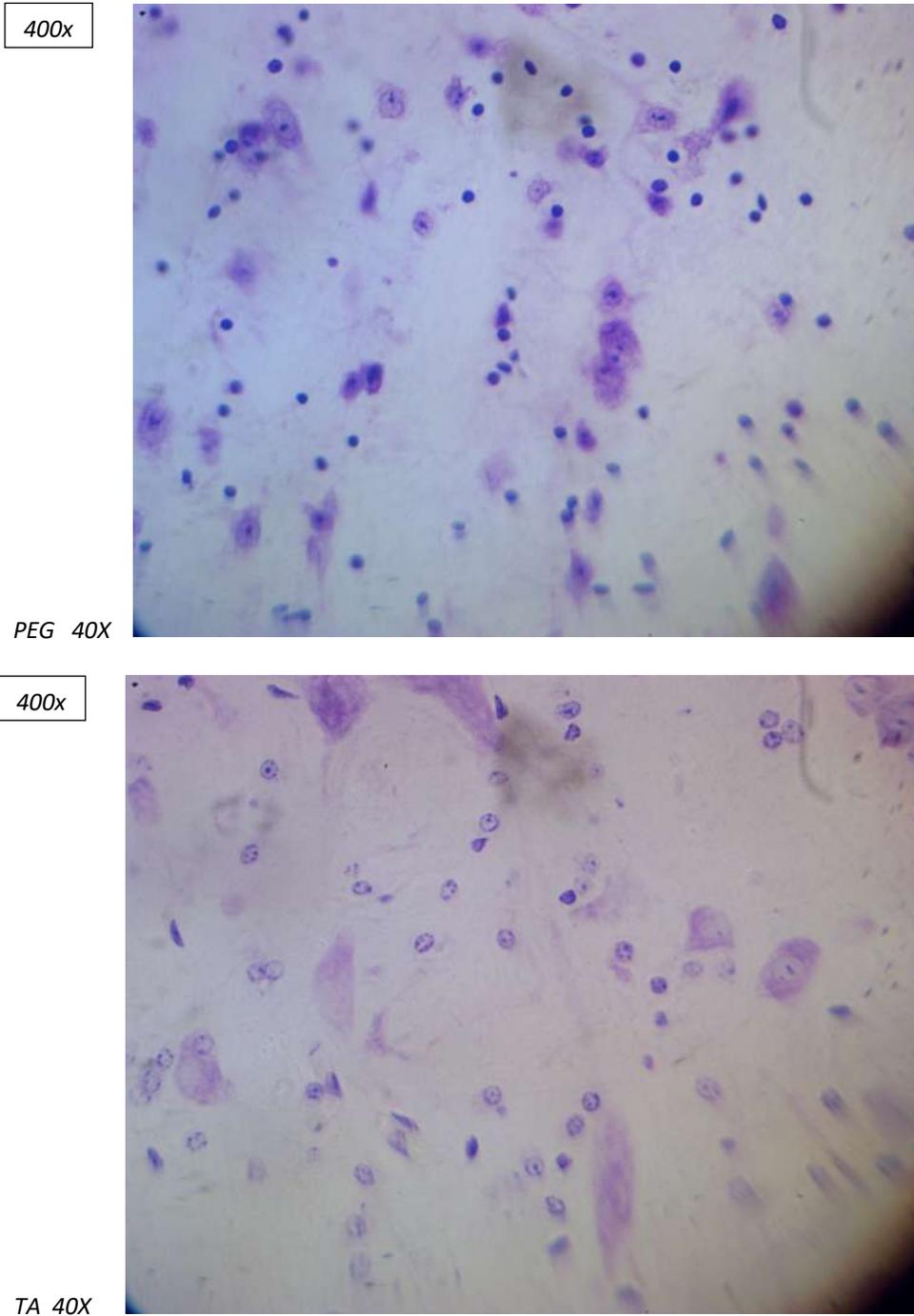
400x



SECCIÓN S/TX

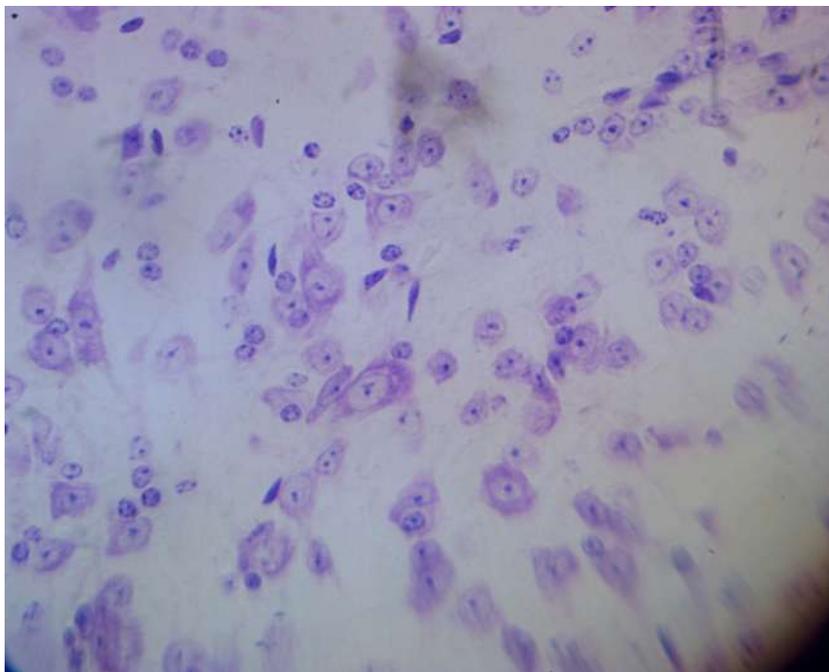
**Figura 24. Tinción Nissl en grupos Sham y sección sin tratamiento**

Se observa la densidad neuronal y glial normal en el grupo Sham, contrasta con la pobre población neuronal y la presencia de glía cicatrizal reactiva en el grupo de sección.

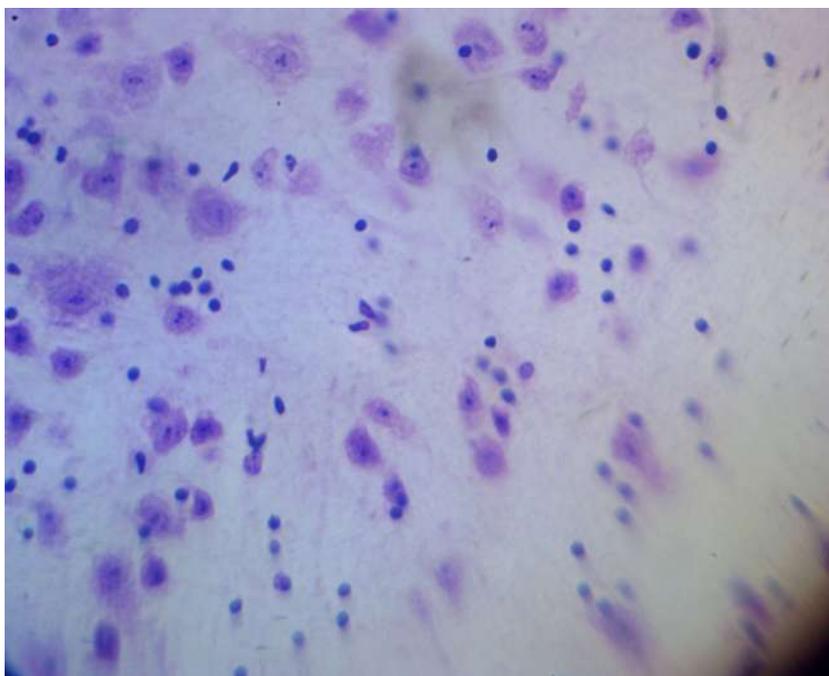


**Figura 25. Tinción de Nissl en grupos PEG y TA**

En el grupo PEG (polietilenglicol) se observan neuronas viables, glía satélite normal y muy poca reactiva.



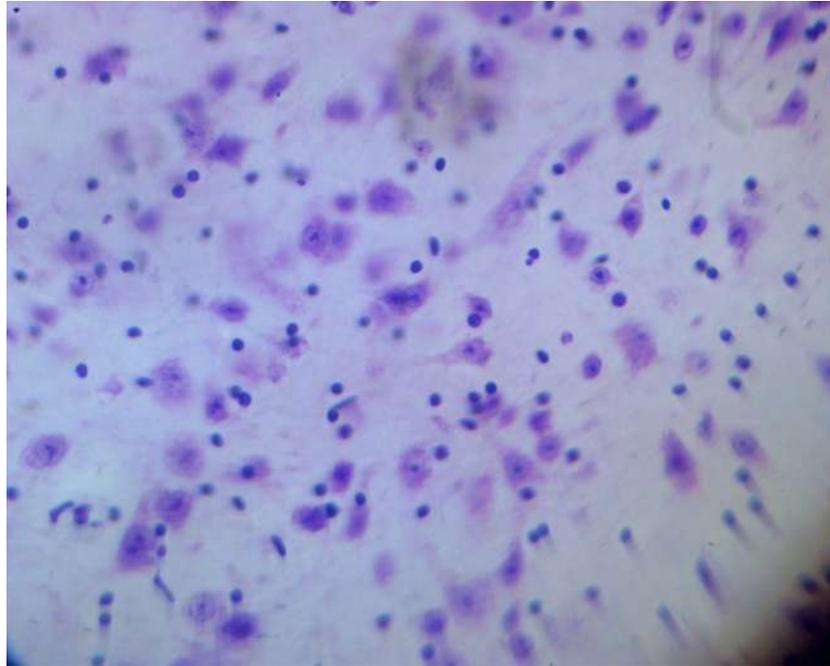
TAC 40 X



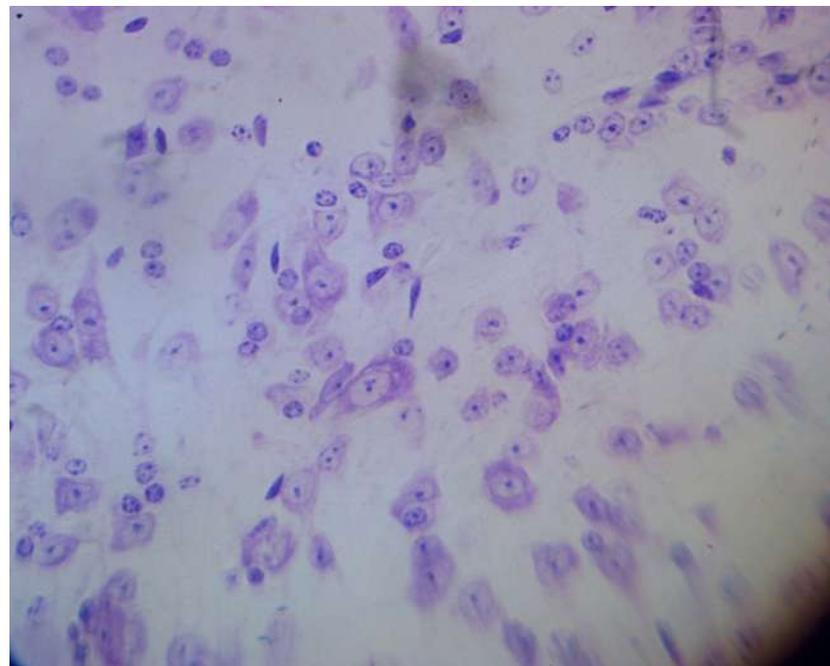
TBO 40 X

**Figura 26. Tinción de Nissl en grupos TAC y TBO**

En TAC (Taxol-Ambroxol-Colchicina) se observan mayor número de neuronas viables y glía satélite normal, mínima reactiva, en TBO (trasplante de bulbo) se observa mayor cantidad de glía autóloga (trasplantada) y abundantes neuronas viables.



*TBO-TA 40 X*



*TBO-TAC 40X*

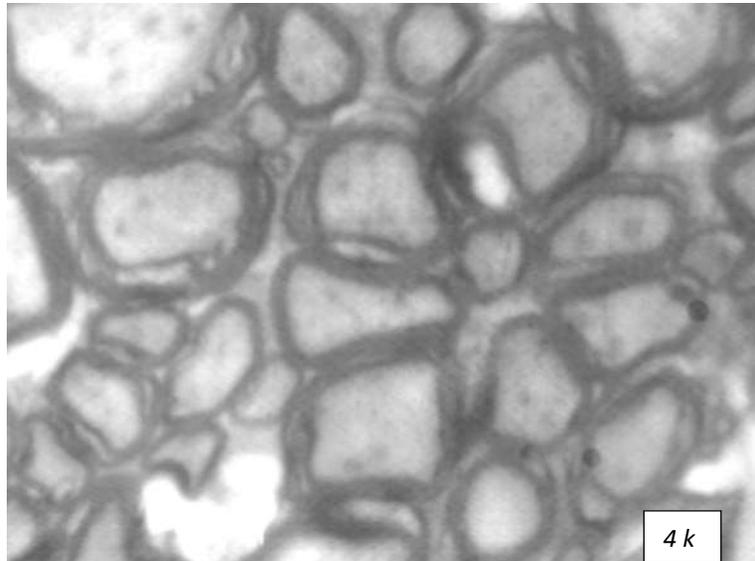
**Figura 27. Tinción de Nissl grupos TBO-TA y TBO-TAC**

TBO-TA (trasplante de bulbo olfatorio-Taxol y Ambroxol) TBO-TAC (trasplante de bulbo olfatorio-Taxol, Ambroxol y Colchicina). En ambos grupos se observa importante glía autóloga (trasplantada) y neuronas viables en importante número, siendo mas abundantes en el grupo con triple fármaco.

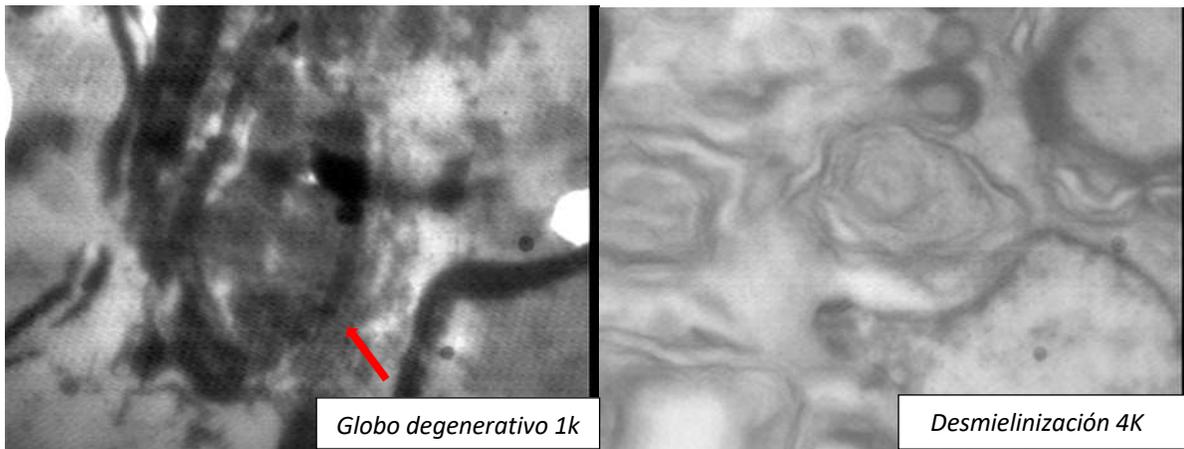
**Tabla 16. Resultados semicuantitativos de análisis de cortes en microscopía electrónica de transmisión**

<b>Grupo</b>	<b>GLOBOS DE DEGENERACIÓN</b>	<b>GDO DE REMIELINIZACIÓN</b>
SHAM	-	NO APLICA (MIELINA INTEGRAL) +++++
SECCIÓN S/TX	++++	-
TA	++	+
TAC	++	+
TBO	+	++
TBO-TA	+	+++
TBO-TAC	+	+++
PEG	++	++

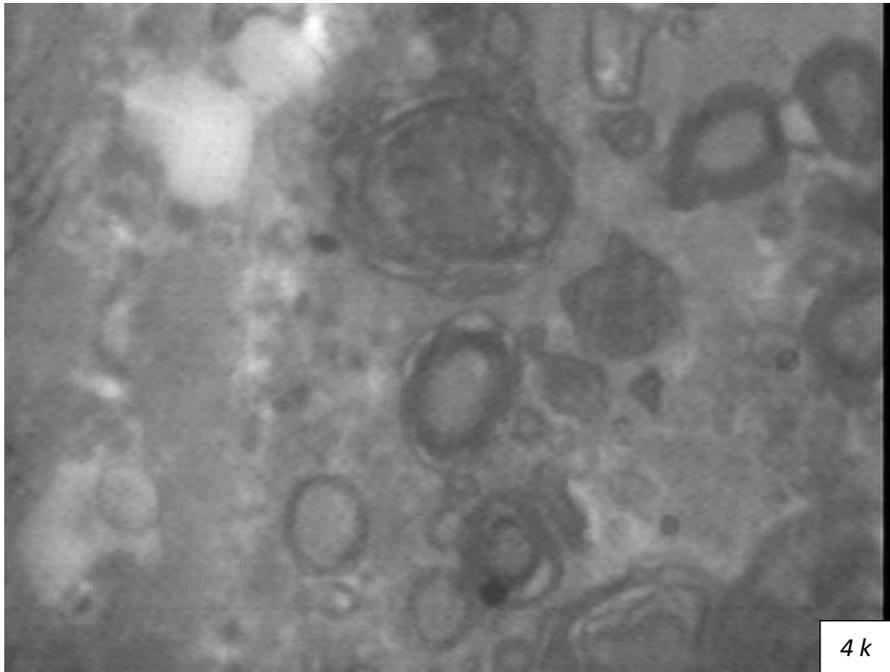
En el grupo control sin tratamiento la abundancia de globos de degeneración y la no remielinización fueron la regla, mientras que en los grupos de tratamiento se observaron de escasos (+) a moderados (++) globos de degeneración, siendo menores en grupos que asociaron TBO a fármacos. El grado de mielinización de fibras fue de escaso a importante + a +++, siendo mayor en los grupos que asociaron TBO a fármacos (Fig. 28 - 35).



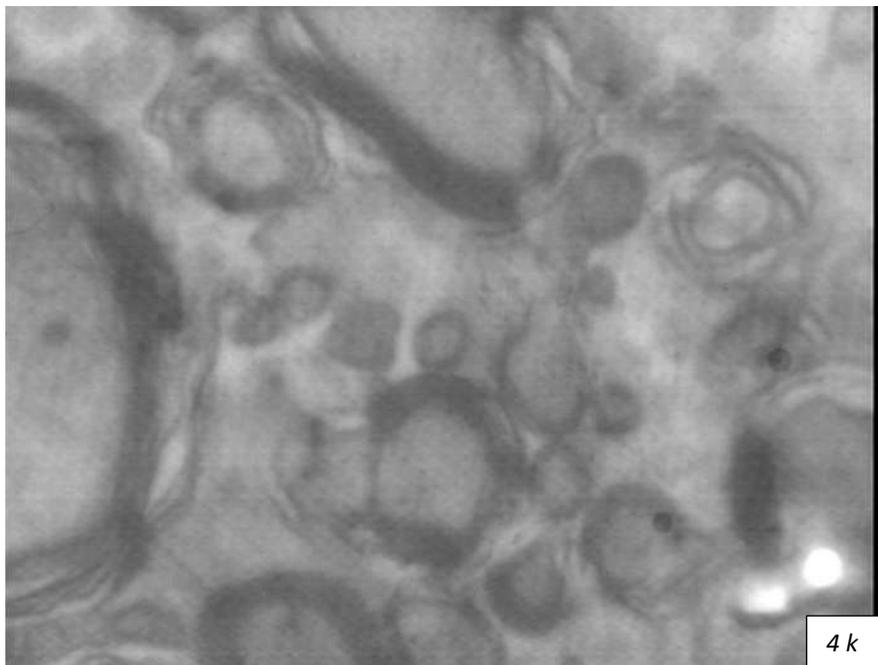
**Figura 28. Grupo Sham, mielinización normal, sin globos de degeneración**



**Figura 29. Sección sin tratamiento desarreglo de fibras, desmielinización y globos de degeneración**



**Figura 30. Grupo TA remielinización parcial escasa**



**Figura 31. Grupo TAC que evidencia mielinización escasa a moderada y un globo de de degeneración**

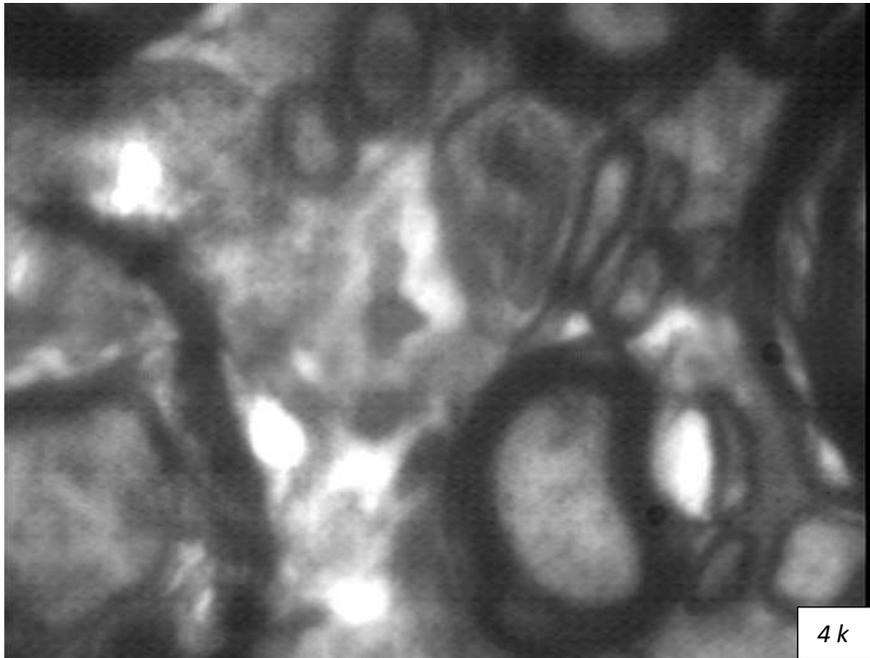


Figura 32. Grupo TBO con mielinización moderada (++) que evidencia fibras delgadas con mielinización inicial (regeneración)

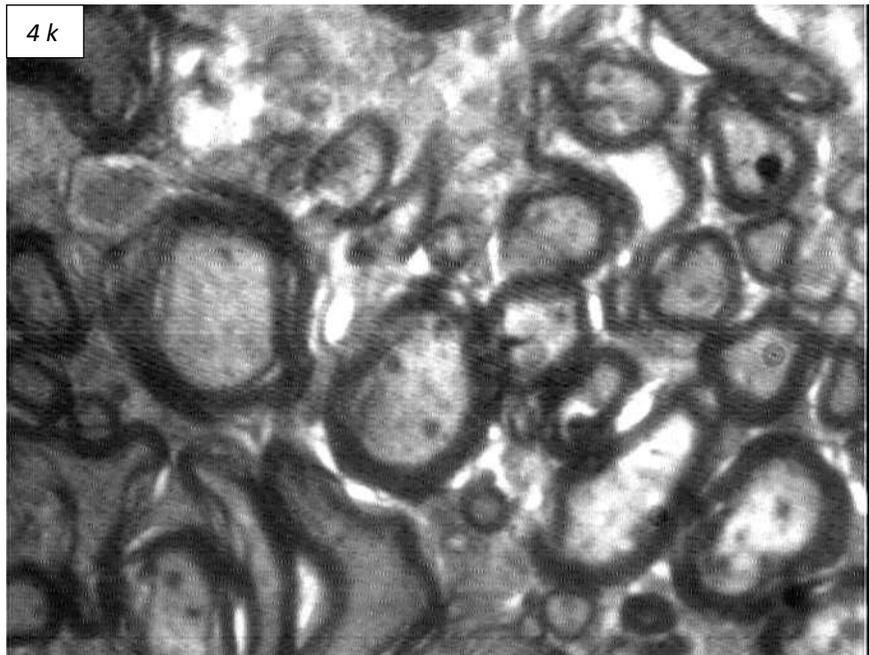
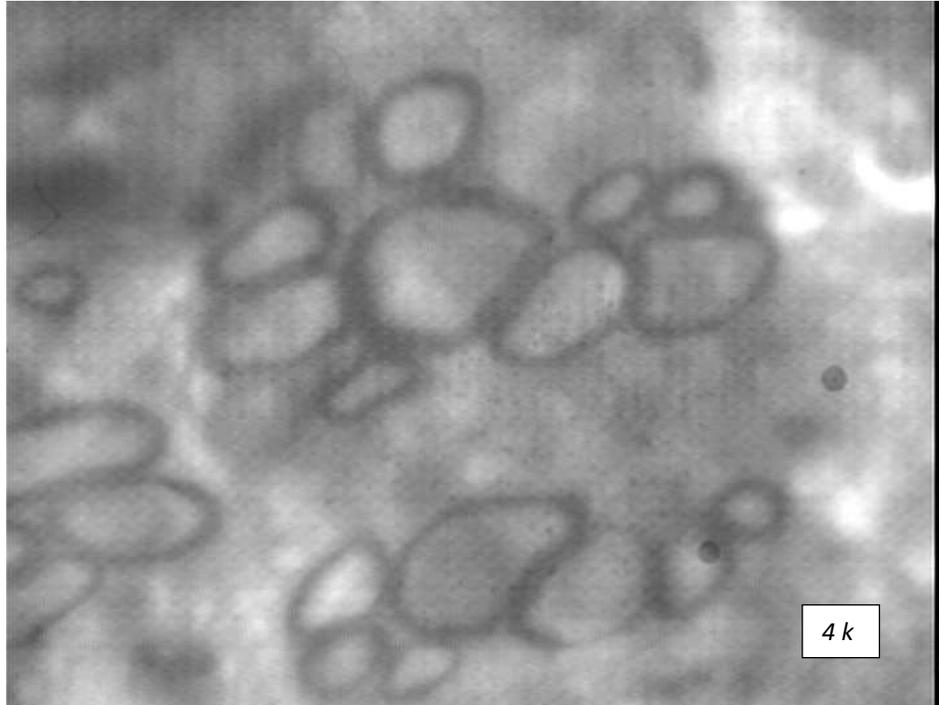
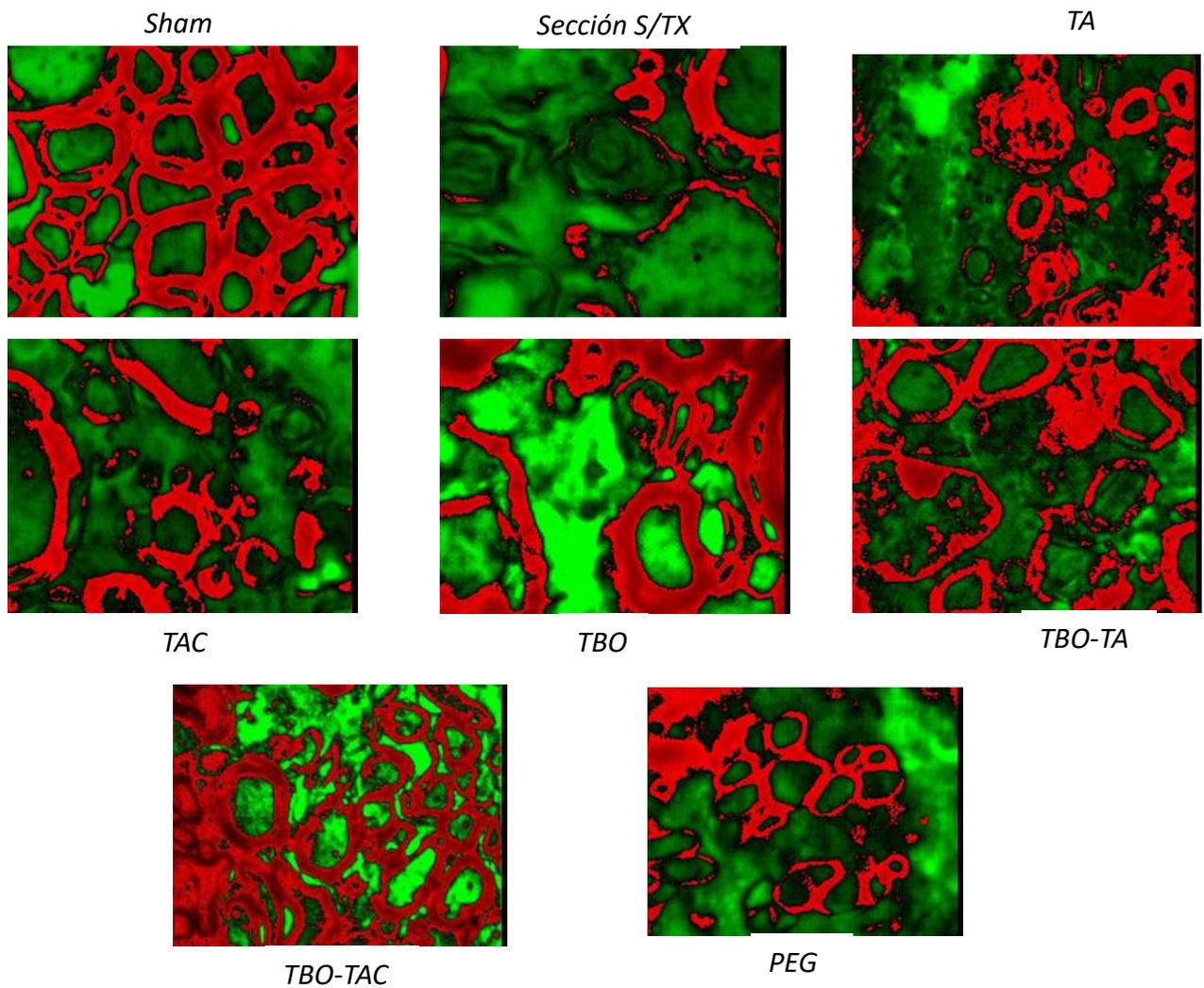


Figura 33. Grupo TBO-TAC con grado de mielinización importante (+++) y nuevas fibras delgadas mielinizadas (regeneración)



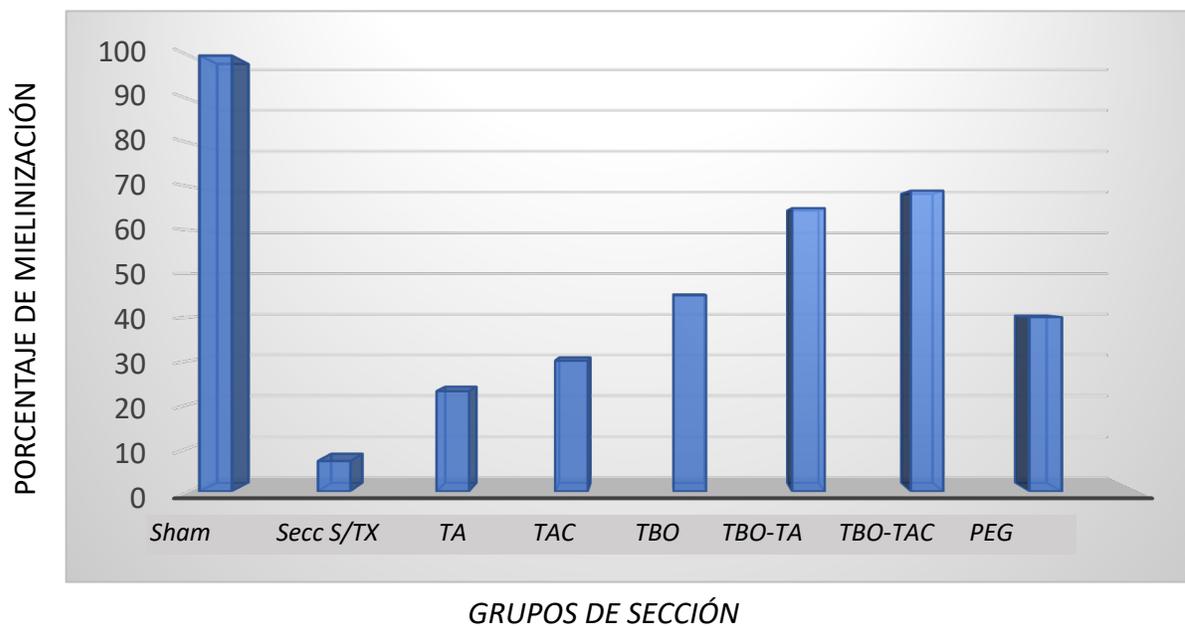
**Figura 34. Grupo PEG que evidencia moderada mielinización y algunas fibras delgadas**

Se realizó un análisis de imagen de cada grupo, en micrografías electrónicas a 4000x, utilizando el programa Fiji (Image J) utilizando conversión binaria, LUT red-green (rojo-verde) y analizando la intensidad de histograma para color rojo marcando mielina (Fig. 35).



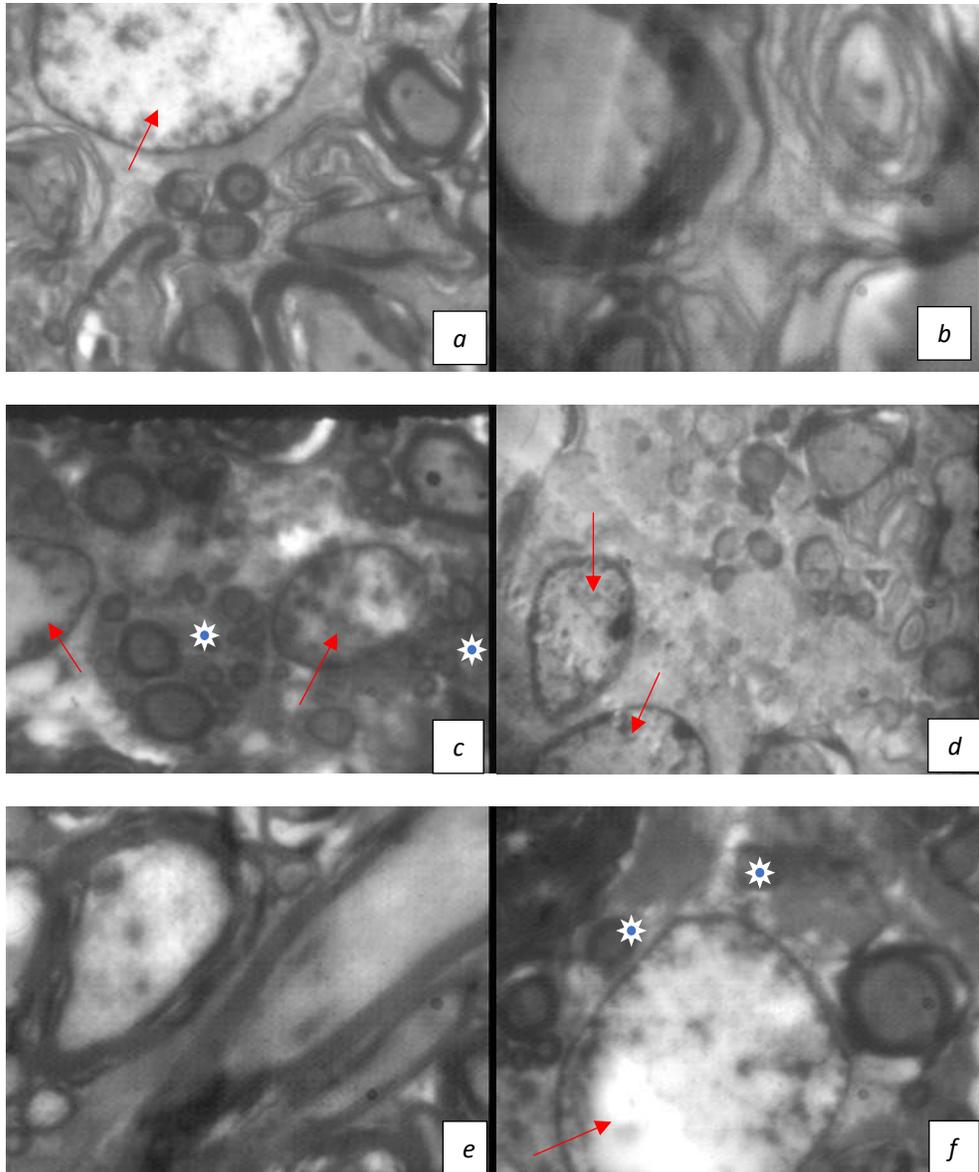
**Figura 35. Grado de mielinización detectado por intensidad de máscara (color rojo) en microscopía electrónica y análisis de imagen Fiji-ImageJ**

Se aprecia gran desmielinización en grupo sección sin tratamiento y la mejor remielinización y celularidad mielinizante, oligodendrocítica se aprecia en el grupo TBO-TAC. Cuando dicha intensidad se compara con el grupo Sham, considerado arbitrariamente como el 100%, los porcentajes respectivos pueden verse en la siguiente figura (Fig. 36).



**Figura 36. Porcentaje de mielinización comparado al 100% del grupo Sham**

Como se puede ver en la gráfica, el porcentaje de mielinización en el grupo sección sin tratamiento solo alcanzó 5 a 10%; para TBO solo poco más de 40%, y TBO-TAC alcanzó casi el 70%; lo cual concuerda con los resultados funcionales y reafirma que el grado de mielinización es un marcador importante de regeneración y recuperación funcional, lo que ha sido discutido por muchos autores (Sofroniew, 2020; Bradke, 2020). En la figura 37 se muestran los detalles de la microscopía electrónica en trasplante de bulbo olfatorio asociado a triple fármaco TBO-TAC.



**Figura 37. Detalles de microscopía electrónica en trasplante de bulbo olfatorio asociado a triple fármaco TBO-TAC**

De la figura anterior, en (a) se aprecia núcleo de célula glial, rodeada de fibras parcialmente desmielinizadas y otras con gran mielinización; (b) comparación entre fibra mielinizada y parcialmente desmielinizada; (c y d) núcleo de células gliales (flechas rojas) y fibras mielinizadas recientes regenerativas (asteriscos blancos); (e) corte trasverso y longitudinal de axón bien mielinizado con algunas fibras delgadas de elongación; y en (f) núcleo de célula glial (flecha) y fibras regenerativas mielinizadas (asterisco).

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

Podemos enumerar los siguientes resultados:

1.- El modelo de lesión medular en ratón es estandarizable, es consistente en el grado de déficit neurológico producido y a su vez flexible a través de variar el grado de contusión para lograr lesiones parciales y no completas. Aunque técnicamente demandante, es un modelo conveniente por la facilidad de manejo de estos animales, así como la ausencia de autofagia, que en modelos de rata produce mayor pérdida de animales e interferencia en la real evaluación de recuperación motriz.

2.- Las escalas de Evaluación Motora simplificada de Tarlov (EM) y la más sofisticada escala de Basso, Bethie, Bresnan (BBB) son aplicables, correlacionando ambas en la expresión de la recuperación motriz. Ambas son dominables, pero sin duda la BBB demanda mayor tiempo y acuosidad de observación.

3.- Todos los grupos experimentales de tratamiento (lesión con tratamiento) fueron superiores en recuperación motora comparándolos a los grupos control (lesión sin tratamiento) con una diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0.01$  en el análisis ANOVA). Los grupos de combinación de trasplante asociado a fármacos TA (Taxol-Ambroxol) y TAC (Taxol-Ambroxol-Colchicina) demostraron superioridad respecto a otros grupos de tratamiento con significativa estadística ( $p < 0.05$ ). Estas diferencias fueron más acentuadas en el grupo de sección y más tenues en los grupos de contusión, sin perder su significancia. Por lo que con esto **podemos apoyar nuestra hipótesis de trabajo**.

Si comparamos solo los grupos TA vs. TAC (adición o no de Colchicina) vemos que en la escala BBB tanto en sección como contusión y en la escala EM en sección, existe ventaja de TAC sobre TA (Tablas 9 a 14) y (Fig. 13 y 14) que aunque no muy llamativa, resulta ser significativa  $p < 0.05$  (Tabla 17); por lo cual se sigue proponiendo la asociación de la Colchicina a dosis baja, aun ante su teórico efecto contrario a Paclitaxel, por lo que quedará por definir sus posibles y reales mecanismos en la lesión axonal y medular.

4.- Si bien la demostración de recuperación motora con las escalas señaladas se evidenció, la información recabada con las estadísticas del video tracking a través del programa ToxTrac, nos demuestra decremento en la calidad y rendimiento de dicha motricidad respecto a lo basal, siendo menores las distancias recorridas y menor el promedio de levantamientos en patas traseras, lo que apunta a la necesidad de no solo lograr recuperación numérica sino de calidad en la motricidad; por eso consideramos que estos modelos además de evaluarse con las escalas, deben ser evaluados con tecnología de video tracking, o con pruebas de escalada..

5.- Se evidenció una mayor elongación neurítica y mayor grado de remielinización y un mayor número de neuronas conservadas con las técnicas utilizadas, en asociación a un mejor grado de recuperación motriz. El estudio histológico confirma que la recuperación funcional está fundamentada en la regeneración, prolongación y remielinización de axones. El trasplante de células gliales del bulbo olfatorio parece permanecer cuando menos hasta las 12 semanas, habiéndose dado un buen grado de recuperación histológica y funcional.

## 10. DISCUSIÓN

El presente estudio tiene la particularidad de ser un estudio que pretende el tratamiento en fase aguda de la lesión medular en un modelo animal, combinando la terapia celular con fármacos como Paclitaxel, Ambroxol y Colchicina. La terapia celular, especialmente con bulbo olfatorio o células de glia envolvente olfatoria purificadas de la mucosa nasal o del bulbo mismo se ha estudiado como monoterapia en lesión crónica, y poco en aguda (Ramón-Cueto *et al.*, 2011) con resultados aún no satisfactorios. Los fármacos citados y algunos otros han sido estudiados como monoterapia en estudios *in vitro* y sin evaluaciones de recuperación funcional (Bixby *et al.*, 2015; Cursio y Bradke, 2018), enfocados más en morfología de recuperación y elongación de neuritas. Además de que su aplicación de los fármacos en dichos estudios, ha sido tópica-local y en nuestro estudio la aplicación es sistémica intraperitoneal.

Respecto a los fármacos, Paclitaxel ha sido estudiado en modelos de sección medular describiendo más su capacidad de elongación neurítica, y pocas veces evaluando el grado de recuperación funcional motriz en el animal. En los pocos trabajos en ratón y rata, usando como medida de recuperación motriz la escala BBB, los resultados han sido tenues, promediando en los mejores casos un valor de 10/21 en dicha escala. (Steward y Willinberg, 2017). Con la escala de simplificación los resultados también tenues de 1 a 2/5. (Blanco *et al.*, 2015)

El Ambroxol, fármaco propuesto por Chandran *et al.* en 2016, como un estimulante del programa genético de regeneración axonal, solo se empleó en dicho estudio demostrando utilidad en elongación neurítica de nervio óptico, no hay otro estudio, ni su utilización en modelos de sección medular, por lo cual nuestro estudio es el primero en usarlo. Nuestro estudio es el primero en utilizar a la Colchicina en el modelo de sección medular; este fármaco con efecto farmacológico opuesto al Paclitaxel respecto a su acción en microtúbulos, cuenta con otros efectos clínicamente conocidos, antiinflamatorio, anticicatrizal y como inductor de óxido nítrico sintasa, mecanismo propuesto en varios estudios de tratamiento antineurítico y en

lesiones de nervio periférico (Dubey, 2018; Vanhatalo, 1997; Colbourn, 1999; Cougnon-Aptel, 1999). Se ha insinuado un posible papel de Colchicina en la dinámica de filamentos de actina, quizá por su interacción con microtúbulos en desestabilización, lo cual es un proceso reconocido en la formación de los botones de regeneración axonal y el dinamismo y elongación a través de filopodios (Blanquie y Bradke, 2018). En nuestro estudio se utilizó en dosis mínimas, buscando explorar su efecto sin llegar a bloquear el efecto estabilizador del Paclitaxel.

El estudio logró en primer lugar, estandarizar y dominar los aspectos técnicos del modelo en ratón, con sus detalles de manejo técnico, anestésico y de cuidados, lográndose una pérdida aceptable de animales en transoperatorio 4.4%, muy aceptable cuando se compara con otros estudios donde se reportan hasta un 15% de pérdidas transoperatorias (Ahmed *et al.*, 2019). Las pérdidas dentro de las primeras 72 horas, posiblemente como consecuencia de alteraciones secundarias al trauma, fueron 4.4 %, también aceptable contra otros reportes de pérdidas tempranas de hasta 10% (Ahmed *et al.*, 2019). Las pérdidas tardías posterior a 2 semanas, atribuibles a infección o posible toxicidad fueron del 8.8%, no hubo casos de autofagia (autoingestión de cola o patas traseras), que se han descrito en modelos de rata hasta en un 20% (Steward, 2017).

En cuanto a las escalas de evaluación de discapacidad motora, se encontró una correlación positiva entre ambas escalas en todas las semanas, de la 1 a la 12, lo que indica que su valor como herramienta de evaluación es similar si se realizan de manera cuidadosa (Tabla 8 y Fig. 1 y 2). Encontramos la escala motora simplificada de Tarlov más fácil y reproducible aún para personas con poca experiencia. Por otra parte, la escala BBB, puede tornarse compleja para personal poco experto.

También se logró uniformidad en el grado de lesión producido con la sección completa y en la contusión moderada (Fig. 3 y 4). Insistimos en la importancia de utilizar una contusión moderada para diferenciar la sección completa de una lesión parcial por contusión, ya que si la contusión se realiza de manera severa, otros modelos han demostrado que se comportan como sección completa (Blanco *et al.*, 2015).

Respecto a la recuperación motora en los distintos grupos de tratamiento vs. controles sin tratamiento, lo que constituye parte medular de nuestro trabajo, podemos comentar lo siguiente:

Se logró evidenciar que todos los grupos de tratamiento tienen una recuperación mayor con valores estadísticamente significativos respecto a los grupos control sin tratamiento. Esto fue mucho más evidente en el grupo de sección completa (Tablas 9, 11 y Fig. 6, 9) donde todos los grupos superan con significancia estadística a los controles. En los grupos de contusión, la diferencia fue estadísticamente significativa solo para los grupos con combinación de trasplante de bulbo olfatorio y fármacos TA y TAC. Conjuntando casos de sección y contusión en el rubro de “lesión medular” de todos los grupos, tanto control sin tratamiento como los de tratamiento, se hace visible la diferencia a favor de los tratados y cobra significancia estadística para todos los grupos de tratamiento (Tablas 13, 14 y Fig. 7, 11 y 13), conservando ligera ventaja los grupos de combinación de trasplante de bulbo olfatorio y 3 fármacos (TAC), lo anterior indica que existe un claro sinergismo entre las modalidades terapéuticas empleadas, ya que cada una actúa con su propio mecanismo, como estabilización de citoesqueleto para Paclitaxel, estímulo del programa genético de regeneración axonal para Ambroxol, neurotrofismo y neutralización de factores inhibitorios del microambiente para las células de glía olfatoria provenientes del injerto de bulbo olfatorio y probablemente acción de Colchicina en el dinamismo de los filamentos de actina o acción antiinflamatoria en el microambiente de cicatrización glial. Todo ello en concordancia con la tendencia actual de combinar abordajes para un problema multifacético como lo es la sección medular en su fisiopatogenia (Griffin y Bradke, 2020).

En el cuadro siguiente (Tabla 17) presentamos un comparativo de nuestros resultados con algunas series de lesión medular experimental tratada con PEG con reporte de recuperación motora:

**Tabla 17. Resultado de series de lesión medular experimental tratadas con polietilenglicol**

AUTOR	N	MODELO	TERAPIA	CONTROL	BBB	TARLOV
Blanco <i>et al.</i> , 2016	15	Rata /contusion	PEG	Sham / S/TX	-----	2.5/5 (48 h)
Borgens <i>et al.</i> , 2000	20	Rata /contusion	PEG	S/TX	-----	2/5 (60 días)
Torres <i>et al.</i> , 2021	10	Ratón/sección	PEG	Sham / S/TX	15/21	3.5/5 (12 sem)

Como podemos ver, tuvimos mejor resultado con escala simplificada de 3.5/5 en seguimiento a 12 semanas, que Blanco y Borgens, llamando la atención en la serie de blanco que sus resultados los reporta en recuperación a 48 h, por lo cual dudamos de que realmente se haya realizado contusión moderada.

En el siguiente cuadro (Tabla 18), comparamos resultados con terapia de trasplante de bulbo olfatorio solo o en combinación a fármacos (nuestras series).

**Tabla 18. Resultados comparativos con implante celular solo o en combinación con fármacos**

AUTOR	N	MODELO	TERAPIA	CONTROL	BBB	TARLOV	TIEMPO
Arellanes <i>et al.</i> , 2015	6	Rata /contusión	TBO	Sin control	-----	3/5	12 sem.
Torres <i>et al.</i> , 2021	5	Ratón/contusión	TBO	Sham / S/TX	16/21	3.8/5	12 semanas
Torres <i>et al.</i> , 2021	4	Ratón/contusión	TBO / TAC	Sham / S/TX	18/21	4.3/5	12 semanas
Ramón-Cueto, 2000	9	Rata /sección	Celulas GEO	Sham / S/TX	---- (12/21)*	---- 2-3/5 *	7 meses
Torres <i>et al.</i> , 2021	4	Ratón/sección	TBO / TAC	Sham / S/TX	16/21	3.8/5	12 semanas

TBO- trasplante de bulbo olfatorio TAC (Taxol-Ambroxol-Colchicina) GEO (glía envolvente olfatoria cultivada)

- Ramón-Cueto reporta resultados en la evaluación de escalada de pendiente, pero en sus descripciones, se podría promediar en sus 9 ejemplares con tratamiento de injerto un BBB aproximado promedio de 12/21 y Tarlov de 2 a 3/5.

Como puede verse, la terapia combinada de trasplante de Bulbo con asociación de 3 fármacos (Taxol-Ambroxol-Colchicina) presenta superioridad.

También se ha propuesto por muchos autores el que el implante de bulbo olfatorio íntegro, podría proporcionar una base celular extra con potencial neurotrofismo o neurogénesis *per se*. Por lo que el implante de células de GEO, pudiera ser de menor efecto.

Si comparamos solo los grupos TA vs. TAC (adición o no de Colchicina) vemos que en la escala BBB, tanto en sección como contusión, y en la escala EM en sección existe ventaja de TAC sobre TA (Tablas 9 a 14 y Fig. 12 y 13) que aunque no muy llamativa resulta ser significativa  $p < 0.05$  (Tabla 17), por lo cual se sigue proponiendo la asociación de la Colchicina a dosis baja, aún ante su teórico efecto contrario a Paclitaxel, por lo que quedará definir sus posibles y reales mecanismos en la lesión axonal y medular. ¿Efecto antiinflamatorio?, Como lo propone Vanhantalo y colaboradores desde 1998 con la inhibición de óxido nitrosintasa; ¿modulador de la dinámica de actina?, como lo propone Dubey *et al.* en 2018; ¿antifibrótico?, como lo han sugerido múltiples estudios. (Colburn *et al.*, 1999; Cougnon-Aptel *et al.*, 1999).

Con la Información del video tracking podemos observar que a pesar de una recuperación de movilidad cuantificable por escalas EM Tarlov y BBB de manera significativa, existe en todos los grupos un decremento importante de la distancia recorrida basal hacia la semana doce, así como una recuperación de levantes en patas traseras bajo, apenas promediando entre el 25 y el 50% (Fig. 18 y 19), por lo que el valor de esta medición nos podría hablar de que la “calidad” o “fuerza” de dicha motricidad recuperada y medida en las escalas aún no es la deseable y sin duda plantea la falta de “algo más” que pudiera mejorarlo. Ese “algo más” sin duda se llama rehabilitación, un reciente trabajo de Torres-Espín y colaboradores, empleando rehabilitación complementaria en un modelo de sección medular en rata lo demuestra (Torres-Espin *et al.*, 2018).

Los hallazgos histológicos mostraron de alguna forma correlación al resultado funcional, ya que se observó un grado de mielinización en nuevas fibras, traspasando el sitio de lesión, células de glía mielinizantes y mayor número de neuronas viables en los grupos con tratamiento respecto al control, siendo semicuantitativamente mayores en los grupos que asociaron trasplante de bulbo y fármacos asociados, TBO-TA y TBO-TAC.

## 11. CONCLUSIÓN

La asociación de implante celular de glía envolvente olfatoria proveniente de bulbo olfatorio heterólogo, asociado a Paclitaxel, Ambroxol y Colchicina, demostró recuperación funcional motriz en grado superlativo, además de sólida evidencia histológica de reconexión y regeneración axonal en el modelo de ratón.

**Perspectivas:**

Este estudio y sus hallazgos, abren una buena posibilidad de migración a su aplicación clínica, demostrando que la asociación de terapias que estén dirigidas a blancos terapéuticos distintos en el proceso fisiopatológico de la regeneración axonal y la plasticidad de reconexión, tanto celular como farmacológica, son el futuro de una terapia eficaz de recuperación del paciente con lesión medular.

El uso combinado de fármacos y su aplicación parenteral, los hace totalmente aplicables tempranamente en el momento agudo de una lesión medular. El criterio clínico prevalente de una exploración temprana (dentro de las primeras 24 h) de una lesión medular, como lo recomiendan las guías clínicas de la ASIA, haría también al implante de células de glía envolvente olfatoria viable y práctico. Una necesidad pronta es desarrollar la disposición de células de glía preservadas en banco, para su disposición expedita y factible en una lesión aguda. Ya sea con un banco de bulbos olfatorios criopreservados de origen cadavérico o el desarrollo de cultivos de células inmortalizadas de glía envolvente olfatoria.

## 12. REFERENCIAS

- Al-Ali H., Beckerman R. B., Bixby J. .L., Lemmon V. P. (2017). In vitro models of axon regeneration. *Experimental Neurology* (2017) 287, 423-434.
- Ahmed, R. U., Alam, M., & Zheng, Y. P. (2019). Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*, 5(3), e01324. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01324>
- Arellanes-Chávez, C. A., Bojórquez, A. M., & Martínez, E. R. (2015). Olfactory bulb transplantation in complete spinal cord injury: axonal regeneration and locomotor recovery. *Coluna/Columna*, 14(1), 50–52. <https://doi.org/10.1590/s1808-1851201514010r128>
- Badhiwala J. H., Ahuja C. S., Fehlings M.G. (2019). Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 30(1), 1-18.
- Basso D.M. (2004). Behavioral Testing After Spinal Cord Injury: Congruities, Complexities, and Controversies. *Journal of Neurotrauma*, 21(4), 395-404. <http://doi.org/10.1089/089771504323004548>
- Basso D.M., Fisher L.C., Anderson A.J., Jakeman L.B., McTigue D.M., Popovich P.G. (2006) Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains *Journal of Neurotrauma* vol 23 (5):635-59.
- Bisbal Velasco, V. (2014). Trasplante de Precursores Neurales derivados de Médula Espinal Adulta en el Rescate Funcional de Lesiones Medulares Crónicas. 145. Retrieved from [http://dspace.ceu.es/bitstream/10637/7391/1/Trasplante de precursores neurales derivados de médula espinal adulta en el rescate funcional de lesiones medulares crónicas\\_Tesis\\_Viviana Bisbal Velasco.pdf](http://dspace.ceu.es/bitstream/10637/7391/1/Trasplante%20de%20precursores%20neurales%20derivados%20de%20médula%20espinal%20adulta%20en%20el%20rescate%20funcional%20de%20lesiones%20medulares%20crónicas_Tesis_Viviana%20Bisbal%20Velasco.pdf)
- Bixby, J. L., Bates, M., Ruschel, J., Flynn, K. C., Hellal, F., Sliwinski, C., ... Elliott, D. A. (2015). Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science*, 348(6232), 347–352. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2958>
- Blanco, C. J., Marín, E., Vidal Figueredo, R., Calaudi, P., Sánchez, G., Consejero, E., & Pellegrino, F. (2015). Modelo de lesión medular aguda en ratas. *Neurología*, (March), 21–30.
- Blanco,C.J., Acerbo,M., Calaudi, P., Consejero,E., Martín,E., Sánchez,G., Vidal Figueredo,R. & Pellegrino,F. (2016) Respuesta medular a la aplicación de polietilenglicol luego del trauma medular agudo experimental en la rata. In *Vet* vol 19 (1):1-15

- Blanquie, O., & Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.024>
- Bonner, J. F., & Steward, O. (2015). Repair of spinal cord injury with neuronal relays: From fetal grafts to neural stem cells. *Brain Research*, 1619, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.006>
- Borgens, R. B., & Blight, A. R. (1999). Functional reconnection of severed mammalian spinal cord axons with polyethylene glycol. *J. Neurotrauma*, 16.
- Borgens, R., & Shi, R. (2000). Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *FASEB Journal*, 14.
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., Sofroniew, M. V., & Angeles, L. (2017). Astrocyte roles in TBI. *Exp Neurol.*, 275(0 3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020.Astrocyte>
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Chandran, V., Coppola, G., Nawabi, H., Omura, T., Versano, R., Huebner, E. A., ... Geschwind, D. H. (2016). A Systems-Level Analysis of the Peripheral Nerve Intrinsic Axonal Growth Program. *Neuron*, 89(5), 956–970. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.034>
- Chen, H., Quick, E., Leung, G., Hamann, K., Fu, Y., Cheng, J. X., *et al.* (2009). Polyethylene Glycol protects injured neuronal mitochondria. *Pathobiology*, 76, 117–128.
- Choi, D., & Gladwin, K. (2015). Olfactory ensheathing cells: Part ii - Source of cells and application to patients. *World Neurosurgery*, 83(2), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2013.07.016>
- Cioni, J. M., Koppers, M., & Holt, C. E. (2018). Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.025>
- Colburn, R. W., & DeLeo, J. A. (1999). The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Research Bulletin*, 49(6), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00075-1)
- Cougnon-Aptel, N., Whiteside, G. T., & Munglani, R. (1999). Effect of colchicine on neuropeptide Y expression in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience Letters*, 259(1), 45–48. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00900-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00900-8)

- Curcio, M., & Bradke, F. (2018). Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), 495–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062508>
- David, S., & Aguayo, A. J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science (New York, N.Y.)*, 214(4523), 931–933. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6171034>
- DeBrot, A., & Yao, L. (2018). The combination of induced pluripotent stem cells and bioscaffolds holds promise for spinal cord regeneration. *Neural Regeneration Research*, 13(10), 1677–1684. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.238602>
- Dell’Anno, M. T., & Strittmatter, S. M. (2017). Rewiring the spinal cord: Direct and indirect strategies. *Neuroscience Letters*, 652, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.002>
- Du, B. L., Xiong, Y., Zeng, C. G., He, L. M., Zhang, W., Quan, D. P., ... Zeng, Y. S. (2011). Transplantation of artificial neural construct partly improved spinal tissue repair and functional recovery in rats with spinal cord transection. *Brain Research*, 1400, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.019>
- Dubey, P., Jorgenson, K., & Roy, S. (2018). Actin Assemblies in the Axon Shaft – some Open Questions. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.06.012>
- Estrada-Mondaca S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid M, Ibarra-Ponce de León C, Velasquillo Martínez C, Vacanti CA, Belkind-Gerson J.(2017).Lesión de Médula Espinal y Medicina Regenerativa. *Salud Pública de México*;49(6):437-444.
- Fawcett, J. W. (2018). The Paper that Restarted Modern Central Nervous System Axon Regeneration Research. *Trends in Neurosciences*, 41(5), 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.02.012>
- Ferguson, S. M. (2018). Axonal transport and maturation of lysosomes. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.020>
- Goldner, R., & Yaron, A. (2017). TIR Axons Apart: Unpredicted NADase Controls Axonal Degeneration. *Neuron*, 93(6), 1239–1241. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.005>
- Gomes, E. D., Mendes, S. S., Leite-Almeida, H., Gimble, J. M., Tam, R. Y., Shoichet, M. S., ... Salgado, A. J. (2016). Combination of a peptide-modified gellan gum hydrogel with cell therapy in a lumbar spinal cord injury animal model. *Biomaterials*, 105, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.019>

- Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 66(7), 1267-1301. <https://doi.org/10.1002/glia.23282>.
- Griffin JM and Bradke F. (2020) Therapeutic repair for spinal cord injury:combinatory approaches to address a multifaceted problem. *EMBO Molecular Medicine* 12:e11505,1-29. DOI [10.15252/emmm.201911505](https://doi.org/10.15252/emmm.201911505)
- Gumy, L. F., & Hoogenraad, C. C. (2018). Local mechanisms regulating selective cargo entry and long-range trafficking in axons. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.007>
- Haggerty, A. E., Marlow, M. M., & Oudega, M. (2017). Extracellular matrix components as therapeutics for spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 652, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.053>
- Hao, M., Ji, X. R., Chen, H., Zhang, W., Zhang, L. C., Zhang, L. H., ... Lu, N. (2018). Cell cycle and complement inhibitors may be specific for treatment of spinal cord injury in aged and young mice: Transcriptomic analyses. *Neural Regeneration Research*, 13(3), 518–527. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226405>
- He, Z., & Jin, Y. (2016). Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron*, 90(3), 437–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.022>
- Hill, C. E. (2017). A view from the ending: Axonal dieback and regeneration following SCI. *Neuroscience Letters*, 652, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.002>
- Hilton, B. J., & Bradke, F. (2017). Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development? *Development (Cambridge)*, Vol. 144, pp. 3417–3429. <https://doi.org/10.1242/dev.148312>
- Ji, S. J., & Jaffrey, S. R. (2014). Axonal transcription factors: Novel regulators of growth cone-to-nucleus signaling. *Developmental Neurobiology*, 74(3), 245–258. <https://doi.org/10.1002/dneu.22112>
- Li, M., Mei, X., Lv, S., Zhang, Z., Xu, J., Sun, D., ... Li, Y. (2018). Rat vibrissa dermal papilla cells promote healing of spinal cord injury following transplantation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3929–3939. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5916>
- Li, P., Teng, Z. Q., & Liu, C. M. (2016). Extrinsic and Intrinsic Regulation of Axon Regeneration by MicroRNAs after Spinal Cord Injury. *Neural Plasticity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1279051>

- Lin, L., Lin, H., Bai, S., Zheng, L., & Zhang, X. (2018). Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration. *Neurochemistry International*, 115, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.007>
- Madison, R. D., Sofroniew, M. V., & Robinson, G. A. (2009). Schwann cell influence on motor neuron regeneration accuracy. *Neuroscience*, 163(1), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.073>
- Mahar, M., & Cavalli, V. (2018). Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 19, pp. 323–337. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0001-8>
- Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N., & Yaron, A. (2013). Axonal Pruning Is Actively Regulated by the Microtubule-Destabilizing Protein Kinesin Superfamily Protein 2A. *Cell Reports*, 3(4), 971–977. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.005>
- Maor-Nof, M., Romi, E., Shalom, H. S., Ulisse, V., Raanan, C., Nof, A., ... Yaron, A. (2016). Axonal Degeneration Is Regulated by a Transcriptional Program that Coordinates Expression of Pro- and Anti-degenerative Factors. *Neuron*, 92(5), 991–1006. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.061>
- Marino R, Barros T, Bioering-Sorensen F, *et al.* (2003). International standards for neurological classification of spinal cord injury (6th ed). *Journal of Spinal Cord Medicine*, 26(Suppl 1): S49-S56.
- Metz, G. A. S., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M. E., & Fouad, K. (2000). Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, 883(2), 165–177. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02778-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02778-5)
- Nardone, R., Florea, C., Höller, Y., Brigo, F., Versace, V., Lochner, P., ... Trinka, E. (2017). Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology*, 123, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.06.004>
- Nirschl, J. J., Ghiretti, A. E., & Holzbaur, E. L. F. (2017). The impact of cytoskeletal organization on the local regulation of neuronal transport. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 18. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.100>
- Ortmann, S., & Hellenbrand, D. (2018). Glial cell line-derived neurotrophic factor as a treatment after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 13(10), 1733. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.238610>

- Park, J. H., & Roll-Mecak, A. (2018). The tubulin code in neuronal polarity. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.001>
- Paterniti, I., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2018). An in vivo compression model of spinal cord injury. *Methods in Molecular Biology*, 1727, 379–384. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_29)
- Pease-Raissi, S. E., Pazyra-Murphy, M. F., Li, Y., Wachter, F., Fukuda, Y., Fenstermacher, S. J., ... Segal, R. A. (2017). Paclitaxel Reduces Axonal Bclw to Initiate IP3R1-Dependent Axon Degeneration. *Neuron*, 96(2), 373-386.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.034>
- Quinzaños-Fresnedo, J., & Sahagún-Olmos, R. C. (2016). Micro RNA and its role in the pathophysiology of spinal cord injury — A further step towards neuroregenerative medicine. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 83(5), 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2015.10.013>
- Raddatz, B. B., Lehmbecker, A., Kalkuhl, A., Deschl, U., Baumgärtner, W., & Ulrich, R. (2015). Transcriptional analysis of glial cell differentiation in the postnatal murine spinal cord. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 42, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.02.005>
- Rama, S., Zbili, M., & Debanne, D. (2018). Signal propagation along the axon. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.017>
- Ramadan, W. S., Abdel-Hamid, G. A., Al-Karim, S., & Abbas, A. T. (2017). Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of secondary compressed spinal cord injury in a rat model. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 55(1), 11–20. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0001>
- Ramón-Cueto, A. (2011). Olfactory ensheathing glia for nervous system repair. *Experimental Neurology*, 229(1), 1. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.03.011>
- Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., & Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25(2), 425–435. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80905-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80905-8)
- Ramón-Cueto, A., & Muñoz-Quiles, C. (2011). Clinical application of adult olfactory bulb ensheathing glia for nervous system repair. *Experimental Neurology*, 229(1), 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.10.001>

- Ruschel, J., & Bradke, F. (2018). Systemic administration of epothilone D improves functional recovery of walking after rat spinal cord contusion injury. *Experimental Neurology*, 306(December 2017), 243–249
- Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P. L. and Andersson, M. (2018). ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3):460–464
- Sandner, B., Puttagunta, R., Motsch, M., Bradke, F., Ruschel, J., Blesch, A., & Weidner, N. (2018). Systemic epothilone D improves hindlimb function after spinal cord contusion injury in rats. *Experimental Neurology*, 306, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.01.018>
- Scott-Solomon, E., & Kuruvilla, R. (2018). Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91(January), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.013>
- Šedý, J., Urdžíková, L., Jendelová, P., & Syková, E. (2008). Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(3), 550–580. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.10.001>
- Sengottuvel, V., Leibinger, M., Pfreimer, M., Andreadaki, A., & Fischer, D. (2011). Taxol Facilitates Axon Regeneration in the Mature CNS. *Journal of Neuroscience*, 31(7), 2688–2699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4885-10.2011>
- Sharif-Alhoseini, M., Khormali, M., Rezaei, M., Safdarian, M., Hajighadery, A., Khalatbari, M. M., ... Rahimi-Movaghar, V. (2017). Animal models of spinal cord injury: A systematic review. *Spinal Cord*, 55(8), 714–721. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.187>
- Simon, D. J., Pitts, J., Hertz, N. T., Yang, J., Yamagishi, Y., Olsen, O., ... Tessier-Lavigne, M. (2016). Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation of Somatic Pro-apoptotic Signaling. *Cell*, 164(5), 1031–1045. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.032>
- Snyder, E. Y., & Walz, W. (2017). *Stem Cell Technologies in Neuroscience* (Vol. 126). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7024-7>
- Sofroniew, M. V. (2018). Perspective Dissecting spinal cord regeneration. *Nature*, 6(7705), 3–10. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Steward, O., & Willenberg, R. (2017). Rodent spinal cord injury models for studies of axon regeneration. *Experimental Neurology*, 287, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.029>

- Tang, N. H., & Jin, Y. (2018). Shaping neurodevelopment: distinct contributions of cytoskeletal proteins. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.022>
- Tedeschi, A., & Bradke, F. (2017). Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 42. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.005>
- Thornton, M. A., Mehta, M. D., Morad, T. T., Ingraham, K. L., Khankan, R. R., Griffis, K. G., ... Phelps, P. E. (2018). Evidence of axon connectivity across a spinal cord transection in rats treated with epidural stimulation and motor training combined with olfactory ensheathing cell transplantation. *Experimental Neurology*, 309(July), 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.015>
- Torres-Espín, A., Beaudry, E., Fenrich, K., & Fouad, K. (2018, August 15). Rehabilitative Training in Animal Models of Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5906>
- Tracy, T. E., & Gan, L. (2018). Tau-mediated synaptic and neuronal dysfunction in neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.027>
- Valakh, V., Frey, E., Babetto, E., Walker, L. J., & DiAntonio, A. (2015). Cytoskeletal disruption activates the DLK/JNK pathway, which promotes axonal regeneration and mimics a preconditioning injury. *Neurobiology of Disease*, 77, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.014>
- Vanhatalo, S., Lumme, A., & Soinila, S. (1998). Colchicine differentially induces the expressions of nitric oxide synthases in central and peripheral catecholaminergic neurons. *Experimental Neurology*, 150(1), 107–114. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6733>
- Xu, N., Åkesson, E., Holmberg, L., & Sundström, E. (2015). A sensitive and reliable test instrument to assess swimming in rats with spinal cord injury. *Behavioural Brain Research*, 291, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.004>
- Yang, J., Wu, Z., Renier, N., Simon, D. J., Uryu, K., Park, D. S., ... Tessier-Lavigne, M. (2015). Pathological axonal death through a Mapk cascade that triggers a local energy deficit. *Cell*, 160(1–2), 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.053>
- Zhang, J., Yang, D., Huang, H., Sun, Y., & Hu, Y. (2018). Coordination of necessary and permissive signals by PTEN inhibition for CNS axon regeneration. *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00558>

- Zhao, X., Peng, Z., Long, L., Chen, N., Zheng, H., Deng, D. Y. B., & Wan, Y. (2018). Lentiviral vector delivery of short hairpin RNA to NgR1 promotes nerve regeneration and locomotor recovery in injured rat spinal cord. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23751-2>
- Ziegler, M. D., Hsu, D., Takeoka, A., Zhong, H., Ramón-Cueto, A., Phelps, P. E., ... Edgerton, V. R. (2011). Further evidence of olfactory ensheathing glia facilitating axonal regeneration after a complete spinal cord transection. *Experimental Neurology*, 229(1), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.007>

## 13. ANEXOS

### 13.1 Oficio de aprobación por el Comité de Bioseguridad y Bioética del IIQB-UMSNH



Morelia, Michoacán, México  
1º de Marzo de 2021

#### A quien corresponda:

Por este medio informo a usted que el proyecto de investigación titulado: "Terapia celular regenerativa con coadyuvancia farmacológica múltiple para la recuperación motora en un modelo de sección medular aguda en roedores", fue aprobado por el Comité de Bioseguridad y Bioética del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (fecha de aprobación: 15/10/2019; Protocolo No. IIQB-CIBE-02-2019). Esta investigación cumple con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) "Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio"

Agradezco de antemano la atención a la presente.

Atentamente:

**Dr. José López Bucio**

Presidente del Comité de Bioseguridad y Bioética  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
e-mail: [jbucio@umich.mx](mailto:jbucio@umich.mx)