

## **Recuperación funcional en animales implantados con polímeros sintetizados por plasma en el sistema nervioso central**

R Olayo<sup>1</sup>, C Ríos<sup>2</sup>, H Salgado-Ceballos<sup>3,5</sup>, J Morales<sup>1</sup>, MG Olayo<sup>4</sup>, A Díaz-Ruiz<sup>2</sup>, L Alvarez<sup>1</sup>, R Lozano<sup>1</sup>, A Escalona, C Morales<sup>1</sup>, GJ Cruz<sup>4</sup>.

1Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

2Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez S.S.A

3Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

4Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

5Centro de Investigación del proyecto CAMINA A.C..

[oagr@xanum.uam.mx](mailto:oagr@xanum.uam.mx)

### **1. Resumen**

Se ha establecido que en el tratamiento de lesiones de médula espinal (LME), las terapias combinadas serán la base para una recuperación significativa. Una de las terapias más documentadas para estas lesiones son los implantes celulares en sus múltiples variantes. En general, los estudios sobre implantes con recuperaciones funcionales significativas son muy pocos. Los estudios sobre implantes sintéticos con estas características también son muy escasos. En este trabajo se presenta un análisis de algunos de los parámetros que influyen en la recuperación funcional de ratas expuestas a LME por sección completa e implantadas con polímeros obtenidos por plasma. Se discuten las muestras histológicas de médula espinal teñidas con la técnica de Eosina/Hematoxilina obtenidas después de 8 semanas de la lesión y su correlación con la prueba de funcionalidad determinada por la escala BBB. También se discuten variables del material que afectan los resultados así como el significado y reproducibilidad de los datos.

### **2. Introducción**

La lesión de médula espinal (LME) es un problema de salud pública que afecta principalmente a la población económicamente activa. Se estima que la incidencia anual de daño a la médula espinal es en la población de EE. UU aproximadamente de 11,000 casos al año, sin incluir aquellos que mueren en el accidente [1]. Actualmente no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para reestablecer la función neurológica normal después de la LME, esto se debe a la complejidad para regular los mecanismos de daño secundario, así como la baja capacidad de regeneración espontánea de las células neuronales [2, 3]. Durante varios años se ha intentado establecer el posible efecto benéfico de los implantes en el tejido nervioso después de una LME con el fin de promover una posible recuperación funcional. En estudios experimentales de LME, se ha incrementado el uso de roedores como modelo animal [3-4].

Los polímeros semiconductores sintetizados por plasma e implantados en ratas adultas con lesión por sección completa de médula espinal (LPSCME) favorecen la protección del tejido nervioso adyacente a la lesión, así como en la recuperación funcional de los animales de forma significativa, al compararlos con animales lesionados pero sin implante [4]. En este trabajo se discuten diferentes evoluciones analizadas por medio de histologías y respuesta funcional buscando correlaciones que permitan el planteamiento de nuevas hipótesis de funcionamiento.

### **3. Experimental**

### 3.1 Polimerización e Implante

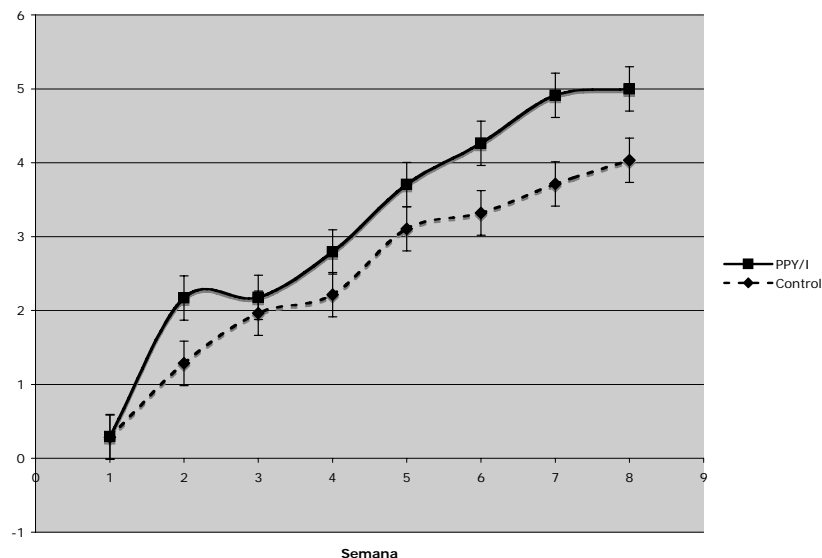
Se sintetizaron polímeros de pirrol/Iodo (PPy/I) y el copolímero pirrol/polietilenglicol (PPy/PEG) por medio de polimerización por plasma. Para esto se utilizó un reactor tubular de vidrio, con los siguientes parámetros: potencia 18W, radio frecuencia de 13.5MHz, presión  $1.5 \times 10^{-2}$  Torr, y temperatura 365K, el tiempo total de reacción fue de 300min. Las películas obtenidas se molieron y se compactaron para formar una pastilla (0.1cm de espesor) que se usó como implante en la LTME. Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Long Evans, entre 12–14 semanas de edad con peso corporal de entre 230-250g. Los animales fueron anestesiados y sometidos a un modelo de sección completa de la médula espinal utilizando tijeras de microcirugía y corroborando la desconexión completa con un gancho quirúrgico, al termino de la sección, justo en el sitio de lesión se introdujo en forma trasversal un trozo de polímero.

### 3.2 Evaluación funcional

La evaluación de la función motora de las extremidades posteriores de los animales se realizó por medio de la escala BBB (Basso, Beattie y Bresnahan), la cual evalúa la marcha tomando en consideración las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo a través de 22 grados de recuperación motora; donde el grado 0 representa la ausencia absoluta de movimiento y el grado 21 una marcha normal.

### 3.3 Imágenes Histológicas

Después de ocho semanas de la LPSC de la médula espinal los animales fueron perfundidos. Primero se anestesiaron con ketamina e hidrocloreuro de xilacina a dosis de 77.5 y 12.5mg/Kg. de peso corporal. Fueron perfundidos con formaldehído. Se retiro un segmento de la médula espinal de 1cm de largo aproximadamente centrado en el epicentro de la LPSC. Las muestras fueron microtomadas para el análisis histológico con la técnica de hematoxilina y eosina de Harris. Las imágenes de los segmentos de médula espinal fueron adquiridas y digitalizadas con una cámara sony 300FX, software IM 1000, y microscopio Leica V.4.01.



**Fig 1.** Evaluación Funcional de los diferentes implantes.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1 Evaluación funcional

Se trabajo con varios lotes de síntesis y se observo como aun cuando el material tiene características similares, pequeñas contaminaciones pueden alterar totalmente los resultados, así se comprobó cuando se tubo un lote con 1% de cloro que produjo malos resultados, el análisis elemental nos ha mostrado consistencia en los lotes siguientes, pero se ha visto la influencia de la presión con la que se compacta la pastilla, tiene una influencia negativa. En la Fig. 1 se presenta los resultados de las evaluaciones funcionales de un lote con baja compresión y sin contaminación, como se puede ver el PPy/I da mejores resultados sin embargo de los resultados se puede ver que nuestros controles pueden tener cierta conexión aun cuando se trata de evitarlo en la cirugía. El análisis de las histologías nos debe dar mayor información para interpretar estos resultados.

### 4.2 Estudios Histológicos

La Fig. 2 muestra las fotografías de tres cortes teñidos, para ratas diferentes, en esta secuencia es claro que la disgregación de la pastilla permite un mayor crecimiento del tejido y por lo tanto tiene una mejor respuesta en la evaluación funcional, a partir de experimentos como este se ha cambiado la forma de presionar las pastillas manteniendo un seguimiento cuantitativo de la presión que se les aplica y su resultado en el implante. Las fotografías tienen la misma amplificación y en la Figura 2a se puede ver que el material no se integra y a su alrededor se forman espacios que no permiten el crecimiento del tejido, en la Figura 2b la integración es mayor y finalmente en la Figura 2c las fracciones del polímero son pequeñas y el tejido a su alrededor no alcanza a mantener la cohesión en el momento del corte y se pierde material.

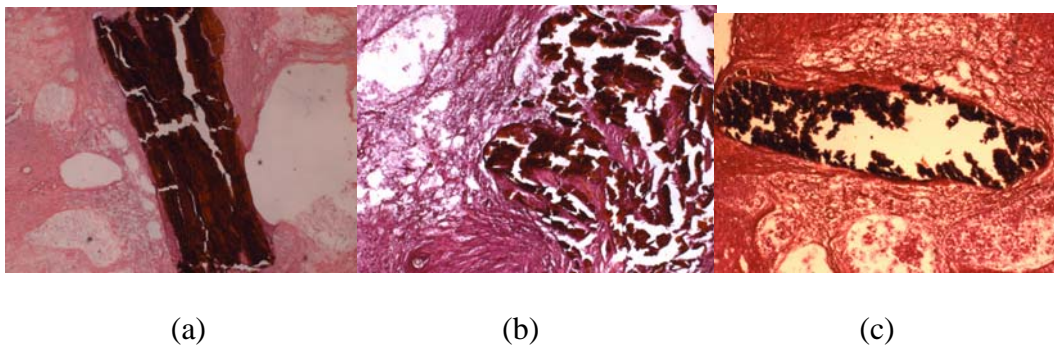


Fig.2 Cortes histológicos para implantes de PPy, con evaluaciones BBB a las 8 semanas de (a) 2, (b) 4 (c) 5

En la Figura 3 se ven medulas completas implantadas con PPy/PEG, en este caso la integración es bastante buena pero la funcionalidad es mas baja que con los otros dos polímeros. Las evaluaciones funcionales fueron: (a) 3, (b) 2, y (c) 1. Se puede apreciar que en el caso de (c) hay espacios vacíos, estos pueden deberse a la baja integración del polímero que se pierde en el proceso de corte con el microtomo, pero el espacio es lo suficientemente grande como para establecer que no todo era polímero y en realidad se tiene formación de quiste. En el caso (b) la integración es buena pero la evaluación funcional es baja, lo cual se interpreto como que en el tejido regene-

rado se tienen pocos axones funcionales, esto puede ser por que no están protegidos o lo que se tiene no es tejido nervioso.

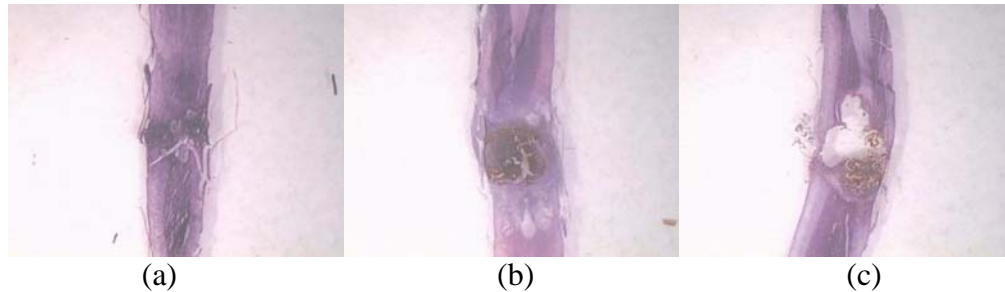


Figura 3. Fotografías de medulas de animales implantados con PPY/PEG

La Figura 4 muestra microfotografías de médulas con implante de PPY/I, en estos casos la integración es buena y en las últimos dos casos se conserva una fracción de polímero pequeña pero su integración es buena y la evaluación también.

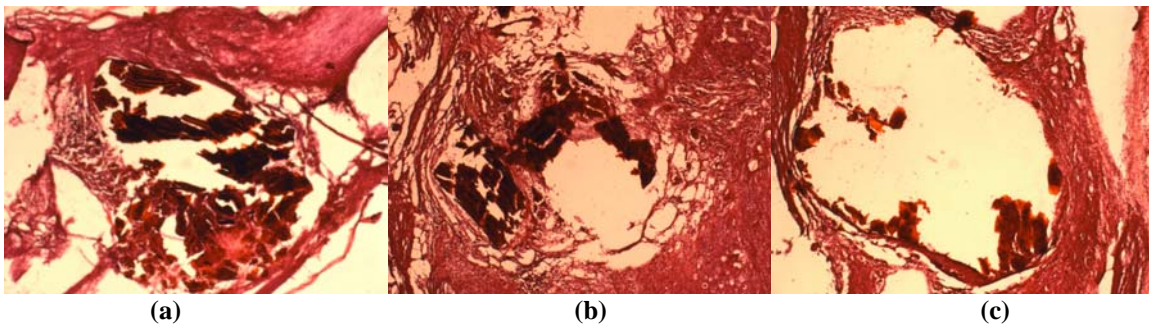


Figura 4 Microfotografías de la medula de animales implantados con PPY/I, con evaluación BBB a las 8 semanas de (a) 1, (b) 4, (c) 7

## 5. Conclusiones

La evaluación funcional se puede correlacionar con las histologías, sin embargo se ve la necesidad de tener estudios histológicos más completos de preferencia tridimensionales y de ser posible hacerlos en vivo para evitar la pérdida del tejido en la zona donde el polímero está integrado.

## 6. Referencias

1. National Spinal Cord Injury Statistical Center (NSCISC) at <http://www.spinalcord.uab.edu>, Birmingham, Alabama.
2. Christos Profyris, et al; Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury; *Neurobiology of Disease* 15 (2004), 415-436.
3. Clerie E. Hulsebosch; Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury; *Adv Physiol Educ* 26(2002), 238-255.
4. A. Díaz et al; Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, "in press".

**Agradecimientos** Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por el financiamiento parcial a este proyecto SEP-2004-C01-46467.