



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# Evaluación de terapias de neurorehabilitación experimental para la recuperación de la destreza manual tras una lesión medular.

TESIS DOCTORAL    PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS  
OLAIA BAYLO MARÍN    DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, INMUNOLOGÍA Y FISIOLÓGIA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

DIRECTOR: GUILLERMO GARCÍA ALÍAS | Tutor: Xavier Navarro Acebes



## ***Prólogo***

### ***El uso de las manos***

Está generalmente aceptado que el rasgo más distintivo de la humanidad es nuestra inteligencia, que ubicamos principalmente en el cerebro. Por tanto, el cerebro es el órgano que más asociamos con nuestra condición humana. Sin embargo, el cerebro ha evolucionado junto con las conductas y el resto de los órganos. Durante su evolución, dos elementos externos han tenido una gran importancia: la posición erguida y la mano.

Mucho antes siquiera de ser homínidos, la necesidad de buscar alimento y prevenirse de los peligros afianzó en nuestros antepasados animales la conducta de erguirse para explorar el entorno. Este hecho, al fijarse en la anatomía de los homínidos, supuso dos impactos muy importantes: una mayor percepción que se tradujo en una corteza sensorial más desarrollada y la liberación de las manos, disponiéndolas para otros usos distintos a la locomoción. Gracias a nuestra capacidad para usar las manos pudimos realizar trabajos de artesanía para la fabricación de herramientas que nos facilitaron el día a día, permitiéndonos evolucionar como especie al *homo faber*, locución latina que significa “el hombre que hace o fabrica”. Hacer tareas detalladas con las manos obligó a nuestro cerebro a evolucionar hasta ser una estructura capaz de idear proyectos. Esta evolución junto con el tiempo libre y la mejor calidad de vida que supuso el uso de herramientas, permitió a este *homo faber* desarrollar la inteligencia humana y denominarse biológicamente *Homo Sapiens*, que significa “el hombre que piensa”. El desarrollo del intelecto es el que nos ha posicionado en la primera posición de la escala evolutiva, sobreviviendo no solo en base a nuestro instinto. El escritor latino Appius Claudius Caecus (340 a.C. -273 a.C) se refirió a la capacidad humana como *Homo faber suae quisque fortunae*, dicho en castellano “cada persona es el creador de su propio destino”. Por lo que el uso de las manos es la condición fundamental de toda vida humana y, como apuntaba Caecus, se podría decir que la humanidad se ha creado con sus propias manos.

***Agradecimientos:*** A mi tutor y mi director de tesis por darme la esta oportunidad y a mi familia y amigos por su cariño y apoyo incondicional.

## ÍNDICE

<i>Estructura de la tesis</i> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1 La médula espinal</b> .....	9
1.1 Estructura externa.....	9
1.2 Estructura interna .....	12
<b>2 Lesión de médula espinal</b> .....	23
2.1 Incidencias y causas .....	23
2.2 Tipos de lesión medular .....	24
2.3 Eventos biológicos tras la LME .....	27
<b>3 Afectación de la extremidad superior</b> .....	28
3.1 Modelos de lesión medular cervical.....	29
<b>4 Estrategias terapéuticas para la reparación de la médula espinal</b> .....	31
4.1 Procedimentales .....	32
4.2 Farmacológicas.....	32
4.3 Celulares.....	33
4.4 Promotoras de la función del tejido preservado .....	34
<b>5 Rehabilitación</b> .....	35
5.1 Cómo la rehabilitación promueve la recuperación .....	35
5.2 Ejercicio específico de la tarea (Task-specific) .....	37
5.3 Métodos de rehabilitación .....	38
5.4 Factores que influyen en la eficacia de la rehabilitación .....	41
<b>HIPÓTESIS</b> .....	45
<b>OBJETIVOS</b> .....	46
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
<b>1 Aprobaciones</b> .....	47
<b>2 Animales</b> .....	47
2.1 Sprague Dawley (rata).....	48
2.2 Long Evans (rata) .....	48
2.3 C57BL/6N (ratón) .....	48
<b>3 Evaluación Funcional</b> .....	49
3.1 Escala de Irvine, Beatties and Breshnahan (IBB).....	49
3.2 Evaluación destreza manual Reaching & Grasping.....	52
3.3 Cuantificación R&G.....	55
3.4 Cuantificación locomoción.....	60
3.5 Evaluación de la apertura digital durante la locomoción.....	61
<b>4 Tareas de rehabilitación</b> .....	61
4.1 Pipas en la gradilla. Rata Long Evans .....	61
4.2 Reaching & Grasping. Ratones .....	63
4.3 Rehabilitación de R&G, Staircase y Cheerios .....	63
<b>5 Lesión de médula espinal</b> .....	68
5.1 Lesión de médula espinal cervical. Ratas .....	68
5.2 Lesión de médula espinal cervical. Ratones .....	71
<b>6 Histología</b> .....	73

<b>7</b>	<b>Análisis Estadístico.....</b>	<b>76</b>
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>1</b>	<b>Evaluación de la rehabilitación en la recuperación de la destreza manual en ratas con contusión cervical.....</b>	<b>77</b>
1.1	Determinación de los parámetros para infligir una LME que reduzca la destreza manual.....	77
1.2	Efectos de una rehabilitación a largo plazo en la recuperación de la destreza manual.....	86
<b>2</b>	<b>Implementación de un programa de rehabilitación en ratones con lme para promover la recuperación de la destreza manual.....</b>	<b>103</b>
2.1	Caracterización de un modelo de contusión cervical en la médula espinal de ratón .....	103
2.2	Efectos de rehabilitación específica en la recuperación de la destreza manual en ratones con contusión cervical .....	106
<b>3</b>	<b>Evaluación del efecto de diferentes terapias de rehabilitación en la recuperación de la destreza manual disminuida tras una contusión medular cervical en ratas.....</b>	<b>110</b>
3.1	Entrenamiento de R&G .....	111
3.2	Lesión de médula espinal por contusión.....	112
3.3	Rehabilitación.....	115
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>1</b>	<b>Rehabilitación para la recuperación de la destreza manual .....</b>	<b>124</b>
<b>2</b>	<b>Contención de problemas en los protocolos de rehabilitación; La optimización continúa.....</b>	<b>128</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>130</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>132</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>148</b>
	<b>Anexo 1 – Adaptación del diseño del Motorized Pellet Dispenser.....</b>	<b>149</b>

## Sinopsis - Castellano

El daño producido por una lesión de la médula espinal genera déficits sensoriales y motores que perduran a lo largo de la vida del individuo. Las secuelas que provoca son terribles, ya que la reducción de movilidad y de sensación disminuyen drásticamente la calidad de vida de los pacientes. En la actualidad se están estudiando distintas intervenciones experimentales que promuevan la reconectividad entre el cerebro y los segmentos medulares por debajo de la lesión.

Esta tesis recopila una serie de estudios experimentales en roedores orientados a evaluar los efectos de la rehabilitación de las extremidades delantera en la recuperación de la destreza manual tras una contusión en la médula cervical. Los estudios están orientados para su futura traslación a pacientes humanos.

Los resultados obtenidos muestran que una lesión por contusión moderada en el segmento C5 de la médula espinal de ratas y de ratones genera déficits crónicos en la habilidad para extender la pata y agarrar objetos. Animales lesionados, con y sin rehabilitación, presentan una pérdida crónica de la destreza manual. La rehabilitación diaria para agarrar semillas de una gradilla no induce a la mejora de esta habilidad con el tiempo. No obstante, reduce la variabilidad de los errores cometidos al alcanzar y agarrar objetos, indicando la plasticidad que genera en el sistema neuromuscular. Dada la ausencia de recuperación funcional, en el siguiente estudio se evaluó si la rehabilitación debiera de ser específica al movimiento a mejorar. No obstante, los resultados muestran que ratones lesionados con rehabilitación específica, para alcanzar y agarrar objetos, mejoraron su destreza manual durante el proceso de rehabilitación, tanto como lo hicieron los animales sin rehabilitación. Por último, se evaluó si no sólo el tipo de rehabilitación, sino además la intensidad a la que se realiza pudiera favorecer la recuperación manual. Efectivamente, los resultados indican que, a diferencia de otros tipos de rehabilitación de las extremidades delanteras, la rehabilitación específica e intensiva de los movimientos de alcance y agarre promueve una mayor recuperación. En su conjunto, los estudios muestran como la rehabilitación promueve la plasticidad del sistema neuromotor, y cómo las características de cada rehabilitación tienen un impacto sobre la evolución de la recuperación de la función manual.

## Sinopsis - Català

El dany produït per una lesió de la medul·la espinal genera dèficits sensorials i motors que perduren al llarg de la vida de l'individu. Les seqüeles que provoca són terribles, ja que la reducció de mobilitat i sensació disminueixen dràsticament la qualitat de vida dels pacients. Actualment s'estan estudiant diferents intervencions experimentals que promoguin la reconnectivitat entre el cervell i els segments medul·lars per sota la lesió.

Aquesta tesi recopila una sèrie d'estudis experimentals en rosegadors orientats a avaluar els efectes de la rehabilitació de les extremitats davanteres en la recuperació de la destresa manual després d'una contusió a la medul·la cervical. Els estudis estan orientats a la seva futura translació a pacients humans.

Els resultats obtinguts mostren que una lesió per contusió moderada al segment C5 de la medul·la espinal de rates i de ratolins genera dèficits crònics en l'habilitat per estendre la pota i agafar objectes. Animals lesionats, amb i sense rehabilitació, presenten una pèrdua crònica de la destresa manual. La rehabilitació diària per agafar llavors d'una gradeta no indueix a millorar aquesta habilitat amb el temps. No obstant això, redueix la variabilitat dels errors comesos en assolir i agafar objectes, indicant la plasticitat que genera al sistema neuromuscular. Atesa l'absència de recuperació funcional, al següent estudi es va avaluar si la rehabilitació devia ser específica al moviment a millorar. No obstant, el resultats mostraren que ratolins lesionats amb rehabilitació específica, per assolir i agafar objectes, van millorar la seva destresa manual durant el procés de rehabilitació, tant com ho van fer els animals sense rehabilitació. Finalment, es va avaluar si no només el tipus de rehabilitació, sinó també la intensitat a què es realitza pogués afavorir la recuperació manual. Efectivament, els resultats indiquen que, a diferència d'altres tipus de rehabilitació de les extremitats davanteres, la rehabilitació específica i intensiva dels moviments d'abast i subjecció promou una recuperació més gran. En conjunt, els estudis mostren com la rehabilitació promou la plasticitat del sistema neuromotor, i com les característiques de cada rehabilitació tenen un impacte sobre l'evolució de la recuperació de la funció manual.

## Abstract - English

The damage produced by a spinal cord injury generates sensory and motor deficits which persist throughout the individual's life. The consequences caused are terrible since the reduction of the patients' mobility and sensation drastically diminishes their quality of life. Different experimental interventions are being studied to promote the re-connectivity between the brain and the spinal segments below the injury.

This thesis compiles a series of experimental studies in rodents aimed at evaluating the effects of forelimbs rehabilitation on the recovery of manual dexterity after a contusion to the cervical spinal cord. The studies are oriented for its future translation to human patients.

The results obtained show that a moderate contusion to the C5 spinal segment of rats and mice generates chronic disabilities to reach and grasp objects. Injured animals, with and without rehabilitation, showed a chronic loss of manual dexterity. Daily rehabilitation to reach and grasp seeds beneath a grid did not lead to reaching and grasping improvement over time. However, it reduced the variability of the errors performed when reaching and grasping. The results evidenced the plasticity generated in the neuromuscular system. Given the absence of functional recovery, the following study was aimed to evaluate whether or not, the rehabilitation should be specific to the movement to be improved. However, the results showed that injured mice with specific rehabilitation to reach and grasp objects, improved their manual dexterity during the rehabilitation process, as much as the animals without rehabilitation did. Finally, we evaluated if not only the type of rehabilitation, but also the intensity at which it is carried out could influence manual recovery. Indeed, the results indicate that, unlike other types of forelimb rehabilitation, intensive task-specific rehabilitation promotes greater recovery on reaching and grasping. In the overall, the studies shows that rehabilitation promote plasticity of the neuromotor system, and evidence how the characteristics of each rehabilitation type have an impact on the evolution of the recovery of manual function.



## Estructura de la tesis

Esta tesis trata de definir el grado de recuperación motora en lesiones medulares cervicales tras la rehabilitación de las extremidades superiores dependiendo del grado de especificidad funcional de dicha rehabilitación.

Para facilitar la comprensión, se incluye una introducción en la que se presentan las bases anatómicas del control motor, los tipos de lesiones medulares, la fisiopatología del tipo de lesión estudiada y los modelos experimentales que permiten su estudio, seguidos de las estrategias terapéuticas que se han utilizado hasta el momento, haciendo hincapié en la rehabilitación.

Los apartados posteriores describen la hipótesis, los objetivos, la metodología y el desarrollo de los experimentos con sus resultados, finalizando con un apartado de discusión general y conclusiones. Por último, se presenta un apartado de referencias, tras el que se disponen los apéndices con la información complementaria.

## INTRODUCCIÓN

### 1 La médula espinal

El sistema nervioso central (SNC) es una estructura vital de los animales vertebrados que está formada por el encéfalo y la médula espinal (ME). El sistema nervioso periférico (SNP) lo forman los nervios que emergen de la columna y del cráneo e inervan el resto del cuerpo. La ME se encarga de transmitir la información, tanto consciente (sensorial y motora) como inconsciente (la perteneciente al sistema nervioso autónomo) desde el encéfalo hasta el cuerpo y viceversa, a través de los nervios periféricos. Además, la médula es capaz de recibir información sensorial y coordinar una respuesta refleja sin contribución cerebral (1). La ME tiene por tanto un papel esencial en funciones tan diversas como el movimiento, la percepción del entorno o la regulación de la función de los órganos internos.

#### 1.1 Estructura externa

Por su importante función y fragilidad, la médula espinal se encuentra protegida por líquido cefalorraquídeo, 3 capas de meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) y por la columna vertebral (Figura 1.A). La médula se extiende de forma tubular desde el final de la médula oblongada, en la base del encéfalo y emerge del cráneo por el foramen magnum. Llega hasta las primeras vertebrae lumbares y ocupa unas 2/3 partes del foramen vertebral. En humanos tiene una longitud de 45 cm en hombres y 42,5 cm en mujeres. En la región cervical y torácico-lumbares se originan los plexos braquiales y lumbosacros, respectivamente. El engrosamiento que forma la médula en estos niveles se denomina intumescencia cervical (C4-T1) y lumbar (L1-S3) (2). En su parte inferior, la médula se ahúsa formando el cono medular, desde donde descienden los nervios que forman la cola de caballo que se fija en la parte posterior del coxis.

Por su importante función y por su fragilidad, la médula espinal se encuentra en el interior de varias estructuras protectoras. En su entorno inmediato, se halla bañada por el líquido

cefalorraquídeo, que ocupa los espacios huecos y ofrece amortiguación de los movimientos y nutrición a la médula. Además, la médula se halla envuelta por tres capas de tejido membranoso resistente y flexible denominadas meninges: la duramadre, la aracnoides y la piamadre. Por último, las meninges se encuentran en el interior de una estructura ósea articulada: la columna vertebral (Figura 1.B).

La médula espinal tiene forma de tubo y se extiende desde una estructura en la base del encéfalo que la conecta al cerebro, la médula oblongada, hasta la región lumbar de la espalda, teniendo en los seres humanos una longitud aproximada de 45 cm en hombres y 42,5 cm en mujeres. En relación con el esqueleto, la médula espinal emerge del cráneo por el orificio denominado foramen magnum, llega hasta las primeras vértebras lumbares y ocupa aproximadamente dos terceras partes de la luz del canal que conforman las aperturas de las vértebras, llamado foramen vertebral. El tercio restante lo ocupan las meninges, raíces de nervios vertebrales, vasos sanguíneos, ligamentos y tejido adiposo.

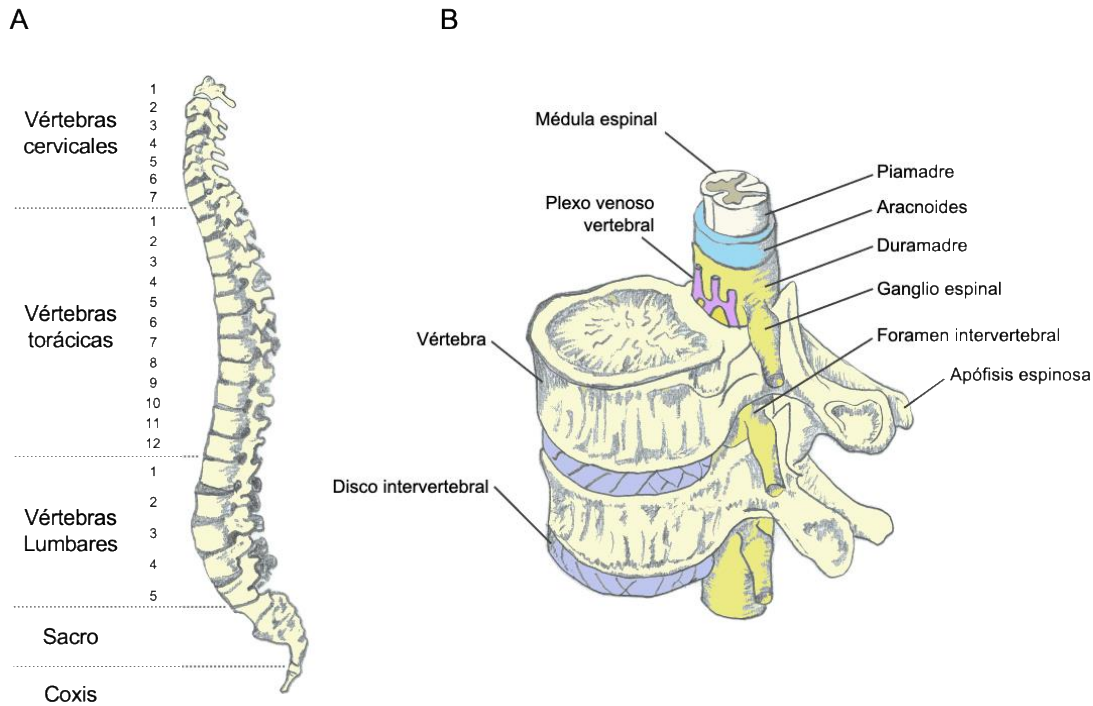
En la médula espinal se originan unas redes de axones neuronales denominadas plexos nerviosos que inervan diferentes partes del cuerpo. En concreto, de las regiones cervical y torácico-lumbar nacen los plexos braquiales y lumbosacros respectivamente. En estos niveles la médula forma unos engrosamientos de los que arrancan los plexos nerviosos. Estos engrosamientos se denominan intumescencia cervical, la de la zona comprendida entre las vértebras cervical cuarta (C4) y torácica primera (T1), e intumescencia lumbar, la ubicada en la zona entre las vértebras lumbar primera (L1) y sacra tercera (S3) (2). En su parte inferior, la médula se ahúsa formando el cono medular, desde donde descienden los nervios que forman la estructura de haces nerviosos que inerva las extremidades posteriores y los órganos pélvicos, denominada por su apariencia cola de caballo, que se fija en la parte posterior del coxis.

Aunque tiene forma de tubo, la médula espinal no tiene una sección transversal circular, sino aproximadamente ovalada y con surcos en su perímetro. Estos surcos recorren toda la longitud de la médula espinal. En la superficie dorsal se puede diferenciar el surco central posterior y los surcos colaterales posteriores, mientras que en la superficie ventral se encuentra la fisura medial.

Múltiples fibras nerviosas brotan regularmente a lo largo de la médula espinal. La columna vertebral está conformada por vértebras que se encuentran separadas por discos de cartílago y través de los espacios entre éstas emergen, de forma bilateral (es decir, simétrica y hacia cada lado de la columna) las dos raíces nerviosas correspondientes al segmento medular que se encuentra bajo cada vértebra (Figura x). Se trata de las raíces de los nervios espinales. Cada nervio espinal está compuesto por las raíces dorsales, que son fibras aferentes (entrantes, también llamadas ascendentes) de tipo sensorial, y por las raíces ventrales, que son fibras eferentes (salientes, también llamadas descendentes) de tipo motor y autónomo (1).

En la mayoría de los mamíferos la médula espinal se compone de segmentos o neurómeros en número equivalente a las vértebras de la columna vertebral, exceptuando los segmentos cervicales que presentan un neurómero más que el número de vértebras (ocho en lugar de siete) (3). Los niveles de los segmentos de la médula y de la columna no corresponden debido a la diferencia en la velocidad de crecimiento durante el desarrollo embrionario entre el tejido medular y el tejido óseo.

Los nervios espinales situados en los ocho segmentos cervicales transmiten las señales de la cabeza, cuello, hombros, brazos, manos y diafragma. Los doce segmentos torácicos transmiten las de los músculos pectorales y parte de las de los músculos de la espalda y el abdomen. Los nervios situados en los cinco segmentos lumbares se encargan del control de la parte baja del abdomen y de la espalda, los glúteos, la zona externa de los órganos genitales y la zona más proximal de las piernas. Los cinco segmentos sacros inervan los muslos y la parte distal de las piernas, pies, la zona externa de los órganos genitales y el área del ano. Por último, los tres segmentos coccígeos controlan la zona inferior de la espalda y la cola, en el caso de los roedores (4). La principal diferencia macroscópica entre la médula espinal de humanos y roedores es que éstos últimos tienen un segmento vertebral adicional en las regiones torácica (T13) y lumbar (L6).



**Figura 1: La médula espinal.** (A) lustración de la columna vertebral y de la numeración y nomenclatura de sus vértebras. (B) Segmento de dos vértebras que rodean la médula espinal y las meninges.

## 1.2 Estructura interna

La estructura interna de la médula espinal, desde un punto de vista transversal, puede dividirse en la sustancia blanca (SB) y la sustancia gris (SG). La SB ocupa la parte más externa de la médula y es caracterizada por sus fibras mielínicas (blancas) y amielínicas formando los tractos ascendentes (sensoriales) y descendentes (motores y autonómicos). La SG se encuentra en la zona interior de la médula y en ella residen los cuerpos neuronales que forman los circuitos pertinentes a cada región vertebral.

Vista transversalmente, la médula espinal puede dividirse en regiones de sustancia blanca (SB) y regiones de sustancia gris (SG). La sustancia blanca ocupa la parte más externa de la médula y está formada por axones de neuronas, tanto recubiertos de mielina (fibras mielínicas o mielinizadas, que le confieren el característico color blanco y el nombre la sustancia blanca) como desnudos (fibras amielínicas). Estas fibras se agrupan en haces que a su vez se agrupan formando tractos nerviosos. La sustancia blanca contiene tractos

ascendentes (sensoriales) y descendentes (motores y autonómicos). La sustancia gris se encuentra en la zona interior de la médula y en ella residen los cuerpos neuronales (o somas) que forman los circuitos pertenecientes a cada región vertebral. En el centro de la médula se encuentra el canal central, que contiene líquido cefalorraquídeo.

### 1.2.1 La sustancia gris

La región ocupada por la sustancia gris en la médula espinal siempre vista transversalmente, tiene una forma característica de mariposa o letra H que varía dependiendo del segmento medular que se observe. Se distribuye en las astas (o cuernos) dorsales, las astas ventrales y la sustancia gris intermedia, que conecta ambas partes. Como se ha mencionado más arriba, los segmentos cervicales y lumbares de la médula presentan las intumescencias, debidas a la presencia de cuerpos neuronales dispuestos en columnas, que se sitúan en las astas ventrales y originan los plexos nerviosos correspondientes para inervar las extremidades superiores e inferiores (1). En los segmentos torácicos y lumbares existe un asta lateral formada por neuronas del sistema nervioso central simpático.

Si se observa la sustancia gris a escala microscópica y aplicando un criterio de clasificación anatómico, puede dividirse en agrupaciones localizadas de células de tipo y función común (agrupaciones somatotópicas) conocidas como las diez láminas de Rexed, que se distribuyen desde la cara dorsal hasta la cara ventral de la sustancia gris. Cada lámina contiene neuronas con diferente forma y función y se denomina con un numeral romano. Las láminas I y II se encuentran en la sustancia gelatinosa de la zona más dorsal de la médula, donde están las fibras nociceptivas (es decir, encargadas de la modulación del dolor). Las láminas III y IV están en zonas más profundas de las astas dorsales y están involucradas en procesos propioceptivos (es decir, procesos de percepción del estado y posición de cada parte del cuerpo), donde modulan la entrada sensorial de estímulos nociceptivos y térmicos. En las láminas intermedias V, VI y VII, ubicadas en la zona central de cada “ala” de la sustancia gris, se encuentran las neuronas que participan en reflejos espinales y autonómicos, recibiendo información de percepción del dolor, tanto del sistema locomotor como de las vísceras. En la zona ventral y próxima al centro de la

sustancia gris se encuentran las láminas VIII y IX (siendo esta última de hecho una especie de isla dentro de la lámina VIII) que contienen motoneuronas implicadas en el control del movimiento voluntario y el mantenimiento del tono muscular y la postura. En estas láminas, las motoneuronas de la zona más interna del asta ventral inervan músculos axiales (del cuello y la espalda), mientras que las de la zona más externa inervan músculos distales (de las extremidades); además, las de la zona más dorsal se encargan de los músculos flexores y las de la más ventral de los músculos extensores. Por último, la lámina X es una excepción en la distribución de dorso a vientre de las láminas, puesto que rodea el canal central de la médula. La función de sus neuronas se relaciona con el transporte de información del sistema nervioso autónomo (5).

A escala microscópica y clasificando según su función, podemos decir que la sustancia gris alberga dos tipos neuronales: las neuronas de proyección y las interneuronas.

Las neuronas de proyección tienen su soma en la sustancia gris y proyectan sus axones a diferentes regiones del sistema sensorimotor. Entre las neuronas de proyección distinguimos las neuronas de proyección motora o motoneuronas, que se localizan en el asta ventral o en la zona intermedia de la sustancia gris y cuyas proyecciones eferentes inervan la musculatura, y las neuronas de proyección sensorial, que se ubican en el asta dorsal y la zona intermedia (que comparten con las motoneuronas) y envían la información periférica, que puede ser somática o visceral, hacia el encéfalo.

En cuanto al otro tipo neuronal que reside en la sustancia gris, las interneuronas, se trata de neuronas cuyo soma y proyecciones se encuentran en la propia sustancia gris, realizando únicamente conexiones locales. Existen dos tipos de interneuronas: las interneuronas segmentarias y las interneuronas propioespinales. Las interneuronas segmentarias comunican zonas de la sustancia gris en el mismo segmento medular, dentro del mismo lado de la médula o entre ambos lados, en cuyo caso se denominan interneuronas comisurales. Las interneuronas propioespinales abarcan con sus axones varios segmentos medulares. Las interneuronas se distribuyen por las tres zonas de la sustancia gris y actúan

como conectores intermedios entre el encéfalo y las neuronas de proyección, modulando y regulando buena parte de las señales que éstas últimas reciben.

### **1.2.2 La sustancia blanca**

Como se ha mencionado más arriba, la sustancia blanca contiene principalmente tractos nerviosos (agrupaciones de haces de axones neuronales). Las neuronas medulares intercambian información con otras zonas del sistema nervioso central a través de estos tractos, que, como en el caso de las láminas de la sustancia gris, se agrupan de forma somatotópica en zonas llamadas funículos o cordones, por analogía con las columnas conectoras adornadas en forma de cordón de la arquitectura clásica. Se distinguen cuatro funículos según su disposición en la médula siguiendo los ejes de ventral o anterior a dorsal o posterior y de central a lateral: un funículo anterior, un funículo posterior y dos funículos laterales. En cada uno de estos funículos se encuentran tractos (o fascículos) que desde el punto de vista de su función pueden ser ascendentes o descendentes. La información sensorial se recoge en el cuerpo y llega al cerebro mediante las vías ascendentes (también llamadas aferentes, de entrada), mientras que las órdenes motoras y autonómicas del cerebro llegan al resto del cuerpo mediante las vías descendentes (vías eferentes, de salida).

La clasificación estructural de los principales tractos se definió con un criterio parcialmente funcional: a partir del origen y terminación de sus fibras nerviosas (6). Se describe a continuación.

#### Vías ascendentes

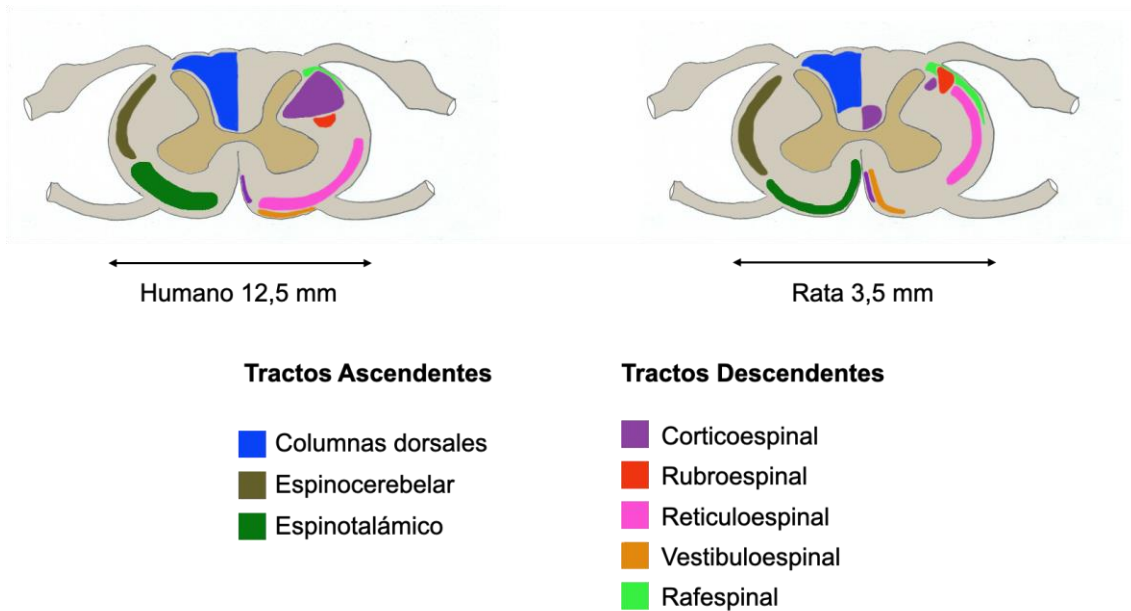
Los cuerpos de las neuronas sensoriales se encuentran en un grupo de nódulos nerviosos situados en las raíces dorsales o posteriores de los nervios espinales: los ganglios de las raíces dorsales. Sus axones conectan los órganos sensoriales con el encéfalo formando los tractos ascendentes. En el funículo dorsal se encuentran los tractos grácil y cuneado, responsables de la transmisión de sensaciones del tacto fino (o tacto epicrítico), de la vibración, de la propiocepción, y del movimiento consciente. En el cordón lateral se halla el tracto espinotalámico que transmite la información sobre el tacto grosero (o tacto



protopático), la temperatura y el dolor. También se encuentra el tracto espinocerebeloso que transfiere las señales propioceptivas inconscientes de las estructuras que perciben la tensión entre tendones y músculos (los órganos tendinosos de Golgi) y de los husos de fibras musculares para coordinar la ejecución fluida de los movimientos. Parte de los axones sensoriales conectan con interneuronas de las astas dorsales de la sustancia gris que a su vez conectan con neuronas que proyectan sus axones a través de los tractos mencionados, constituyendo un primer relevo en la transmisión de las señales nerviosas de percepción (7).

### Vías descendentes

Las vías descendentes están compuestas por fibras nerviosas que, como su nombre indica, descienden desde el encéfalo a la médula espinal y envían las señales que controlan todo el cuerpo. Estas vías incluyen el tracto corticoespinal y el tracto rubroespinal, localizados en el funículo lateral en seres humanos y en el funículo dorsal en roedores. Esta es la única diferencia existente en la distribución de los tractos espinales entre humanos y roedores (FIG2). Estos tractos transmiten señales nerviosas asociadas al movimiento voluntario. Otros tractos descendentes, como el reticuloespinal, el vestibuloespinal y el corticoespinal anterior, se sitúan en el funículo ventral y transmiten señales asociadas al equilibrio y los movimientos posturales. El tracto de Lissauer se encuentra entre el asta dorsal y la superficie de la médula espinal y regula las sensaciones aferentes de dolor (8).



**Figura 2:** Comparación de la localización anatómica de los tractos nerviosos ascendentes y descendentes en humano y rata.

### 1.2.3 Neurofisiología del control motor

El control motor se realiza mediante diferentes sistemas de control que ejecutan sus funciones de forma cooperativa y jerárquica. La parte de la corteza del cerebro encargada del control del movimiento (el córtex cerebral motor, córtex motor o corteza motora) emite las órdenes primarias de ejecución de los movimientos, que se procesan mediante bucles de transmisión nerviosa entre el propio córtex y los centros subcorticales del cerebro y con ello envían a la médula espinal una señal procesada conjuntamente que regula la actividad de las motoneuronas espinales. Éstas inervan la musculatura esquelética, siendo su acción la efectora final del movimiento.

El control del movimiento y la postura tiene lugar en diferentes niveles del sistema nervioso central e integra información sensorial, procedente tanto de circuitos locales, por ejemplo los de los reflejos espinales, como de circuitos que alcanzan el encéfalo (9).

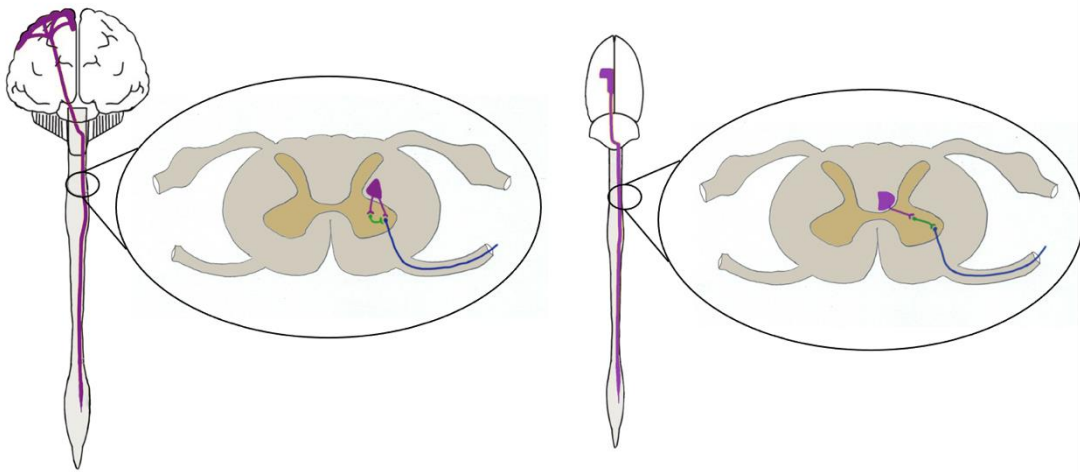
#### Control motor cortical

La corteza pre-motora se sitúa en el lóbulo frontal del cerebro. Es el centro nervioso encargado de la de la planificación y secuenciación del movimiento voluntario, entre otras funciones. Esta información se transmite a las neuronas del tracto corticoespinal (TCE) que

se ha definido como el responsable del control motor fino de la musculatura distal (manos y dedos). La corteza cerebral se divide según los tipos de neuronas que la forman en seis capas diferenciadas, numeradas desde su parte más externa (en contacto con las meninges) a su parte más interna (en contacto con la sustancia blanca que en el cerebro se halla en las zonas internas) de forma similar a la clasificación en láminas de Rexed que ya se ha descrito para la médula espinal. Las neuronas de tipo piramidal (neuronas multipolares de forma aproximadamente cónica con un axón largo y múltiples dendritas basales ramificadas con espinas dendríticas, cuya función es por lo general la de ser fuentes primarias de excitación) que conforman el tracto corticoespinal descienden desde la capa V del córtex motor.

Las fibras del tracto corticoespinal atraviesan la región del tronco encefálico denominada capsula interna y descienden por la médula. La mayor parte de las fibras del tracto corticoespinal se cruzan, o decusan, de forma que, si se originan en hemisferio derecho del cerebro, conectan con estructuras del lado izquierdo del cuerpo. La decusación es responsable de que buena parte del control motor sea contralateral (es decir, que el control tenga lugar en el hemisferio cerebral opuesto al lado del cuerpo donde se encuentra la estructura motora controlada). El 80% de las fibras del tracto corticoespinal decusan en el tronco encefálico. El tracto corticoespinal anterior, que comprende el 10% de las fibras corticoespinales, lo hace en los primeros segmentos cervicales y en los torácicos. El 10% de fibras restantes nunca decusan, formando lo que se conoce como fascículo corticoespinal directo, encargado de la inervación de la musculatura del tronco. Los axones corticoespinales terminan principalmente en las láminas de la III a la VI de la sustancia gris. En los seres humanos, hasta el 20% de los axones corticoespinales terminan directamente en motoneuronas en la lámina IX (10).

En humanos y primates casi todas las fibras cruzadas descienden por el funículo dorsolateral y una parte lo hace por el funículo ventral. En los roedores, la mayoría de las fibras se localizan en la zona ventral del funículo dorsal y una parte desciende por los funículos laterales y ventral. En seres humanos, las neuronas del tracto corticoespinal hacen sinapsis (es decir, conectan) tanto con interneuronas como directamente con las motoneuronas de la médula espinal. En roedores, en cambio, las neuronas del tracto corticoespinal conectan solamente con las interneuronas que modulan las motoneuronas (11,12). Además, en el caso concreto de las ratas (*Rattus spp.*) las fibras son considerablemente menores en tamaño y menos abundantes comparadas con las del tracto



**Figura 3: Comparación en la conectividad motora espinal de humanos y ratas.** Violeta: Tracto Corticoespinal, verde: interneurona, azul: motoneurona.

corticoespinal humano (Figura 3).

#### Núcleos motores del tronco encefálico

Existen tres estructuras en el tronco encefálico que dan origen a tractos motores: el núcleo rojo, los núcleos vestibulares y la formación reticular (9). Además de estos núcleos, existe en esta región del cerebro una estructura que origina tractos que modulan la actividad nerviosa motora: los núcleos del rafe (o rafé, por el término griego para “comisura”).

El **núcleo rojo** da origen al tracto rubroespinal, cuyas fibras cruzan al lado opuesto del cuerpo en la zona del tronco encefálico conocida como área tegmental ventral y descienden por funículo lateral de la médula espinal, junto a las fibras del tracto corticoespinal lateral.

Los axones del tracto rubroespinal terminan en las láminas V y VI de Rexed de las intumescencias cervicales y lumbares, influyendo sobre las motoneuronas de los músculos de las extremidades. El núcleo rojo, junto con las estructuras de la formación reticular pontina y bulbar, presenta una actividad bioeléctrica rítmica durante la locomoción, actuando como generador central de patrón (una estructura nerviosa que emite señales siguiendo patrones cíclicos, coordinando con ello de forma autónoma ciertas secuencias de movimientos) para la marcha. En roedores, el tracto rubroespinal finaliza directamente en la lámina IX de Rexed y es más prominente comparación con primates, humanos incluidos (10).

Los **núcleos vestibulares** reciben aferencias del cerebelo, formación reticular, núcleo vestibulares y núcleo cuadrigésimo superior. El tracto vestibuloespinal descendiente por el funículo ventral medular, formando conexiones con circuitos de la musculatura axial extensora y flexora, contribuyendo en el control de la postura y el equilibrio. Desde el colículo superior desciende el tracto tectoespinal que sinapta con las motoneuronas de los segmentos medulares cervicales, para controlar los músculos del cuello como parte de los reflejos visuales (3).

La **formación reticular** posee proyecciones tanto ascendentes como descendentes a casi todas las estructuras del SNC. Las aferencias proceden de córtex sensoriomotor, cerebelo, ganglios basales, hipotálamo, complejo vestibular, vías sensoriales de receptores musculares y cutáneos. Las neuronas de proyección pontina descienden por el fascículo reticuloespinal anterior, activando las motoneuronas extensoras, mientras que las proyecciones de la porción bulbar del fascículo lateral las inhiben. Sus axones terminan en las láminas 5-9 y participa en el mantenimiento de la postura erguida del equilibrio (1,9).

Por último, los núcleos del **rafe** proyectan sus axones, unidos con las proyecciones **ceruleoespinales**, regulando la excitabilidad de la ME. Sus axones descienden por la zona dorsolateral de la ME y finalizan en la zona intermedia y en el hasta ventral de la SG (1).

## Los reflejos espinales

El reflejo espinal miotalámico o de estiramiento tiene como función el mantenimiento de la longitud adecuada de los músculos. En el momento en el que el músculo se estira, los receptores sensoriales de los husos musculares transmiten la información aferente hacia la médula espinal, donde sinaptan con las motoneuronas, despolarizándolas. La respuesta eferente por parte de las motoneuronas causa la contracción refleja del músculo estirado para que recupere su forma más acortada.

El reflejo tendinoso evita las variaciones súbitas de la tensión de los músculos en sus puntos de inserción durante el movimiento. Esta tensión es captada por los receptores tendinosos de Golgi que generan una doble respuesta: dinámica y estática. La información se envía a la médula espinal e inhibe las motoneuronas del músculo homónimo, reduciendo la tensión muscular, e induciendo la contracción del músculo antagonista. El reflejo de navaja se produce en una situación de tensión excesiva en un músculo espástico, que termina por la relajación súbita del mismo.

El reflejo de retirada se puede desencadenar por varios estímulos, pero el más predominante es el estímulo doloroso. Las fibras nociceptivas sinaptan con las interneuronas del asta dorsal y, a través de varias interneuronas, influyen en las motoneuronas que activan los músculos flexores e inhiben los extensores, provocando un reflejo flexor. Esta activación es capaz de activar circuitos contralaterales representando una reacción refleja de huida con participación de todas las extremidades. El reflejo de retirada supone una activación elemental espinal que define el patrón de locomoción, siendo la base del generador de patrón central medular.

## Circuitos neuronales motores

Los sistemas nerviosos necesitan dedicar una fracción considerable de su poder computacional a la tarea de activar los músculos en patrones temporales y espaciales precisos que impulsan la actividad motora coordinada. Incluso en los animales más primitivos, la más simple de las tareas motoras exige la actividad integrada de un conjunto diverso de circuitos neuronales (13). En el caso de los animales vertebrados, la

planificación del movimiento previo a su ejecución conlleva el reclutamiento de redes supraespinales (14). Pero la ejecución del control motor que determina qué músculos se activan, su intensidad y temporalidad, se define en los circuitos neuronales ubicados dentro de la médula espinal (15,16).

El núcleo del sistema motor espinal se conforma por conjuntos de interneuronas locales que se conectan en redes ordenadas capaces de controlar la actividad de las neuronas motoras espinales. Estas redes se denominan centros generadores de patrones (CGP) y poseen un alto grado de autonomía en la producción de señales (17,18). Dichos circuitos espinales se establecen durante la embriogénesis y su desarrollo y maduración permiten el refinamiento de la actividad (19). Las vías de retroalimentación sensorial que informan sobre el estado de la actividad muscular también tienen un papel crítico en el refinamiento del patrón de producción motora en cada ciclo de movimiento, permitiendo que la red central de CGP se adapte a los cambios ambientales durante la ejecución de la tarea (14,20).

El CGP espinal de la locomoción en cuadrúpedos es una red distribuida con centros en los niveles cervical y lumbar que controlan las extremidades anteriores y posteriores, respectivamente (21). El CGP de las patas traseras se ha estudiado extensamente, y los primeros experimentos en el modelo animal de gato muestran que la médula espinal lumbar y sacra puede ejecutar un patrón normal de actividad de la marcha cuando se aísla del resto del SNC y de las entradas sensoriales (22). Las regiones más pequeñas de la médula espinal también pueden generar una actividad motora coordinada. En el gato, los tres segmentos de L6 a S1 conservan la capacidad de generar un patrón "normal" de actividad motora para los músculos extensores y flexores del tobillo (22). Está definido que la red CPG para cada extremidad comprende múltiples módulos interconectados que controlan el movimiento de cada articulación.

Durante las últimas décadas, el progreso en la investigación de los principios del control motor espinal ha permitido el beneficio de una amplia gama de ideas y enfoques, desde la neurofisiología hasta la biología celular que han elucidado la biomecánica del movimiento de las extremidades así cómo la descripción funcional de la conducta motora simulada (23,24). Especialmente, el interés por los aspectos comparativos del control motor espinal

se extiende a la organización de las redes locomotoras que permiten ejecutar programas motores que se ajustan a las necesidades especializadas de su entorno físico (25). La definición de circuitos que controlan específicamente tareas o gestos que se consideran estereotipados o automáticos permitiría dirigir las futuras terapias que promuevan la recuperación estas funciones tras las lesiones medulares.

## 2 Lesión de médula espinal

La ME está muy protegida por su importancia, aun así, puede dañarse. La lesión de la médula espinal (LME) consiste en la interrupción de las vías de información ascendentes y/o descendentes de la ME y la muerte de neuronas y células gliales debido al daño del tejido nervioso. Dado que los axones del sistema nervioso central no se regeneran, la lesión da como resultado una pérdida permanente de comunicación entre el encéfalo y las regiones que se encuentran por debajo del lugar de la lesión. Esta interrupción de la comunicación produce pérdida de movimiento, de sensibilidad, déficits autonómicos y/o dolor. La magnitud final de estas disfunciones se define por el nivel, la gravedad y el tipo de lesión (26).

### 2.1 Incidencias y causas

La incidencia de LME varía en todo el mundo. Por lo general, los datos de LME son reportados por bases de datos provinciales o nacionales. Además, estas bases de datos siguen códigos diferentes que dificultan la generalización de los datos entre países (27). Entre los países desarrollados, la incidencia es mayor en América del Norte (39 casos por millón de personas) que en Australia (16 casos por millón de personas) o Europa occidental (15 casos por millón de personas)(28). En España, la incidencia de LME es de 16 casos por millón de personas (29). Aunque la supervivencia de los pacientes con LME ha mejorado en las últimas décadas, los pacientes continúan teniendo altas tasas de mortalidad. De hecho, entre el 4% y el 17% de los pacientes mueren durante la hospitalización. Tras el alta hospitalaria, el 3,8% de los pacientes fallece en el primer año y el 1,6% en el segundo año (30).



Para todos los casos de LME, la lesión por daño mecánico es la más común. Los accidentes automovilísticos son la principal causa de LME traumática, representando el 39,2% de todos los casos. Le siguen caídas (26,6%), accidentes deportivos (14,9%), violencia (11,5%), complicaciones médicas/quirúrgicas (4,3%) y otras causas restantes (3,5%) (estadísticas de los EE. UU. De 2005 a 2011) (31). Los impactos de alta energía, como los accidentes de tráfico y las lesiones relacionadas con el deporte, son más comunes en las personas más jóvenes, mientras que los impactos de baja energía, como las caídas, se producen en las personas mayores (30). Las LME distintas del trauma incluyen tumores, estenosis espinal, enfermedades inflamatorias, mielopatía por radiación, enfermedades vasculares espinales y defectos del tubo neural, entre otros (32).

## 2.2 Tipos de lesión medular

La clasificación más generalizada para la clasificación de la LME se basa en el nivel medular dónde se encuentra su último nivel medular previo la lesión. Además del nivel, las lesiones de la médula espinal se pueden definir en función de su gravedad. En el caso de lesiones completas, hay una desconexión completa de las fibras espinales y, por lo tanto, la pérdida completa de las funciones sensoriales y motoras por debajo del lugar de la lesión. En el caso de lesiones incompletas, un porcentaje de fibras preservadas permite la preservación de la función sensorial y/o motora por debajo del sitio de la lesión (Figura 4) (26).

En un intento por desarrollar un sistema universal para clasificar la lesión de la médula espinal, la Asociación Estadounidense de Lesiones de la Médula Espinal elaboró la Escala de deterioro de ASIA (AIS)(26). Esta clasificación se basa en el examen de la función neurológica, clasificando a los pacientes desde la letra A hasta la E y es la más utilizada en

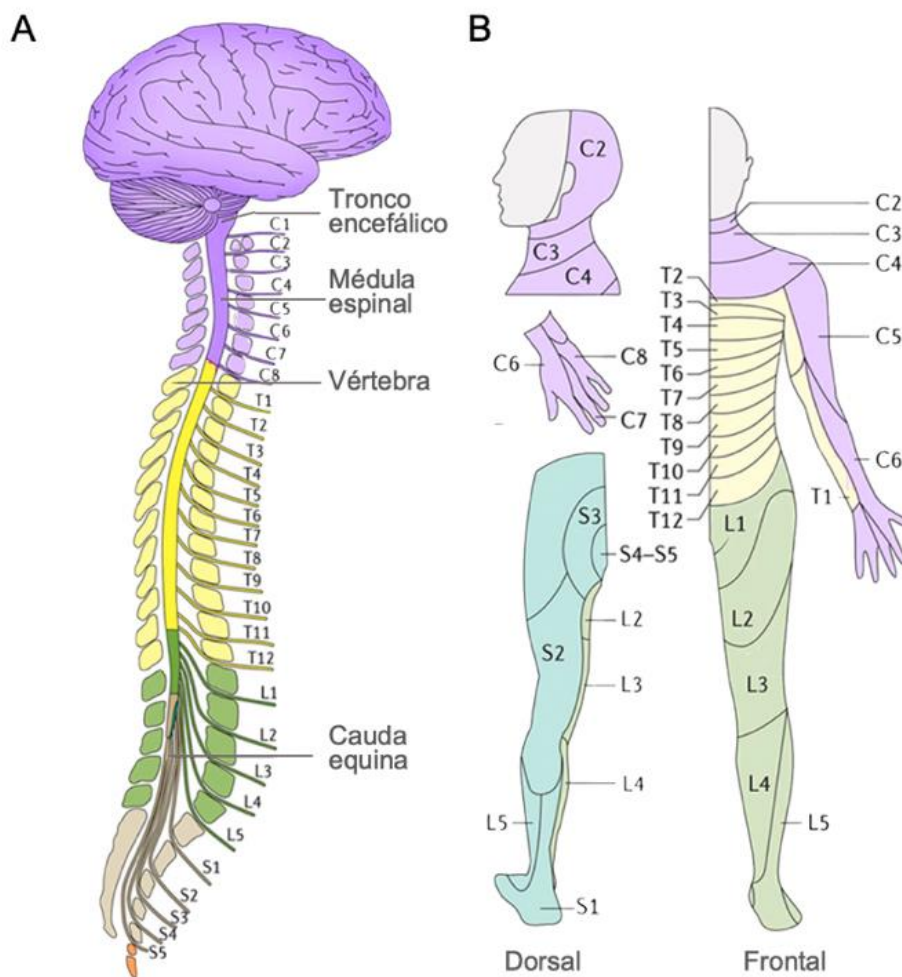


Figura 4: Representación de la inervación nerviosa

la actualidad (26).

### 2.2.1 LME cervicales

Son el tipo de lesión más grave que provoca tetraplejía. Esta lesión produce la desconexión total de las cuatro extremidades del cuerpo. Los pacientes con lesión cervical alta (C1-C3) necesitan asistencia respiratoria y pueden tener problemas para controlar la vejiga, hacer la digestión incluso controlar el habla. Estos pacientes requerirán asistencia en todas las actividades de su vida. Sin embargo, los pacientes con lesiones en C4 pueden controlar la respiración y la flexión del codo y el músculo deltoides. Los pacientes con lesión cervical en C5 poseen un grado más de fortaleza en los músculos flexores del codo. Estos pacientes pueden utilizar un *joystick* y pueden empujar manualmente una silla de ruedas, necesitan ayuda en actividades de su vida diaria, pero tienen cierto grado de autonomía. Los pacientes con lesiones a nivel de C6 tienen control sobre la extensión de la muñeca y sobre el agarre manual. Estos pacientes suelen ser independientes en su cuidado personal, nutrición e higiene. Las lesiones que afectan el nivel C7 preservan también la extensión del codo y las del nivel C8, adicionalmente, el control de los músculos flexores de los dedos. Estos pacientes poseen cierto grado de independencia en actividades de la vida diaria, incluso manejar sillas de ruedas, pero necesitan asistencia en la mayoría de actividades diarias (33).

### **2.2.2 LME torácicas**

Las lesiones a este nivel producen paraplejía, que es la afección del tronco y las piernas, mientras que las funciones de los brazos y las manos suelen quedar preservadas. Estos pacientes pueden utilizar sillas de ruedas manuales. Es posible que los pacientes con lesiones torácicas altas (T1-T5) no puedan controlar los músculos abdominales y el equilibrio del tronco (33). Los pacientes con lesiones torácicas bajas (T6-T12) pueden controlar el equilibrio del tronco y tener algo de control remanente de los intestinos y la vejiga (33).

### **2.2.3 LME lumbosacras**

Las lesiones lumbosacras (a partir de L1) resultan en cierta pérdida de función en las caderas y piernas. Los pacientes pueden deambular con dispositivos para caminar con las piernas en distancias cortas. Pueden ser independientes en el cuidado del intestino y la vejiga (33).

## 2.3 Eventos biológicos tras la LME

En 1911, Allen fue el primero en proporcionar una descripción exhaustiva de los cambios posteriores a la LME (34). Informó de un ablandamiento progresivo de la materia gris, incluso a 2 cm del área de impacto, en animales con lesión de la médula espinal. Esta pérdida progresiva de tejido neural días después de la lesión se conoce ahora como daño secundario y se separa del daño primario causado por el trauma en sí.

### 2.3.1 Lesión primaria

La lesión primaria sucede unos segundos después del traumatismo. Se produce una hemorragia inmediata y la interrupción del riego sanguíneo en el lugar de la lesión. Este evento conduce a la muerte celular, isquemia, edema, alteración de la homeostasis iónica, acumulación de neurotransmisores y alteraciones de la membrana plasmática, que se limita al área de la lesión (35). La interrupción de los potenciales iónicos limita la generación de potenciales de acción eliminando toda la función espinal y los reflejos durante un tiempo determinado. Este evento se denomina el choque espinal (36). Este daño inicia una cascada de lesiones secundarias que causa más daño permanente y disfunción neurológica.

La lesión primaria es inesperada e inmediata. Por tanto, la ventana terapéutica en la fase primaria de la lesión es muy limitada y, en consecuencia, inaccesible para una intervención especializada (35). Por estas razones, aunque tanto las lesiones primarias como las secundarias están involucradas en la disfunción neurológica posterior a la LME, la mayor parte de la investigación se ha centrado en comprender la fisiopatología del daño secundario.

### 2.3.2 Lesión secundaria

A diferencia de la lesión primaria, la lesión secundaria no se limita al área de la lesión si no que afecta al tejido colindante aumentando el tamaño de la lesión original (35). Comienza minutos después del traumatismo y perdura desde semanas a meses. La lesión secundaria se divide temporalmente en las fases aguda (dentro de las 48 horas), subaguda (2-14 días),

intermedia (14 días-6 meses) y crónica (más de 6 meses). Algunos de estos eventos son la extensión de procesos del daño primario, pero también los nuevos descritos a continuación. Los eventos de la lesión secundaria están constituidos por la excitotoxicidad por glutamato (37), la peroxidación lipídica (38), los trastornos vasculares locales (39), la ruptura de la barrera entre la sangre y la médula espinal (40,41), la muerte celular (42,43), la desmielinización de los axones preservados (35), la formación de la cicatriz glial (44) y la neuroinflamación (45,46)

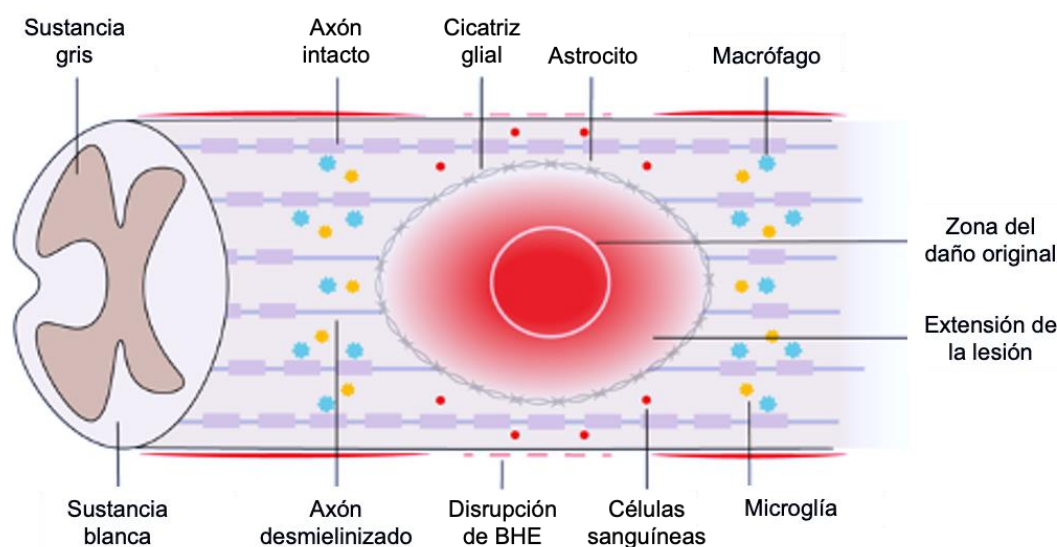


Figura 5: Esquema del escenario patológico después de una lesión medular.

### 3 Afectación de la extremidad superior

Más de 2,5 millones de personas padecen una lesión crónica de la médula espinal con más de 130.000 nuevos individuos afectados cada año en todo el mundo (47). El impacto social y personal de las LME es significativo, debido en gran parte a la edad máxima de incidencia de 30 años o menos (48). Las encuestas de sujetos tetraplégicos con LME han revelado que recuperar la función de la extremidad superior y de la mano se clasificó como la más importante (49), ya que incluso la restauración parcial de la función perdida de la extremidad superior mejorará en gran medida la calidad de vida. Si bien los agentes farmacológicos (50,51), el entrenamiento motor (52) y la estimulación epidural de la médula espinal (53) han mostrado resultados prometedores para la restauración de la

locomoción en el entorno de laboratorio, su potencial para la restauración funcional de las extremidades superiores en humanos está bajo investigación activa.

### 3.1 Modelos de lesión medular cervical en roedores

En el momento de seleccionar el modelo de lesión que se quiere implementar, se deben tener en cuenta varios factores, entre ellos es el tipo de lesión (sección, compresión o contusión), la ubicación de la lesión (segmento cervical y región neurológica dentro del nivel) y la intensidad o severidad de la lesión. Para definir estos parámetros es necesario que la pregunta experimental y la metodología de medición de los resultados determine el modelo. Los tipos de lesión medular en humanos sirven de guía para definir los modelos experimentales que tratan de simular la patología de las lesiones medulares, para poder estudiarlas. Debe tenerse en cuenta el tipo de enfoque experimental (fisiológico, neuroprotector o neuroregenerativo), el tipo de análisis (anatómico/conductual), el aspecto traslacional y la potencia esperada del tratamiento, más allá de la recuperación espontánea y sin llegar al efecto techo (54).

#### 3.1.1 Contusión

Los modelos de contusión son los más estudiados ya que mimetizan el mismo tipo de lesión que las LME más comunes en los accidentes, que son las producidas por una compresión de la médula por parte de las vértebras de forma aguda (29). Este modelo inflige una fuerza transitoria y aguda a la médula espinal mediante un dispositivo de caída de peso, émbolo impactador o pistola de aire. Para este modelo, la médula espinal debe exponerse previamente mediante laminectomía quirúrgica. El modelo de contusión por caída de peso fue el primero desarrollado en 1911 y se basó en una masa definida que cae en la médula espinal desde una altura precisa (34). Este modelo ha quedado obsoleto tras observar un efecto de rebote del péndulo que causaba más de una contusión en la misma zona. En la actualidad, el dispositivo *Infinite Horizon Impactador* (IH) es el más reclamado y estandarizado ya que permite una monitorización de la fuerza real, la velocidad de impacto

y el desplazamiento del émbolo en la médula espinal, que inflige una única contusión y solucionando el problema del péndulo que rebota (55,56).

### **3.1.2 Compresión**

Los modelos de compresión provocan una compactación prolongada de la médula espinal durante un tiempo determinado. Algunos de estos son modelos de contusión-compresión, ya que implican una contusión aguda seguida de una compresión persistente. La compresión se puede producir a través de un clip, pinzas calibradas, balón o émbolo. En el caso del globo, por ejemplo, se inserta un catéter con un pequeño globo inflable en el espacio epidural o subdural. La lesión está controlada por el volumen de inflación. Aunque este modelo es menos costoso, los parámetros son más difíciles de monitorear (56,57). Sin embargo, el dispositivo de IH permite mantener el émbolo contusionador durante un tiempo determinado generando este modelo de contusión-compresión de una forma más monitorizada (58).

### **3.1.3 Isquemia / Hipoxia**

En modelos animales in vivo, la lesión isquemia / hipoxia se induce mediante la restricción compresiva (habitualmente mediante fórceps o pinzamiento aórtico cruzado) de los vasos sanguíneos que conectan la médula espinal durante periodos de tiempo prolongados, seguido de periodos de reperfusión. La lesión inducida por hipoxia / isquemia se caracteriza por cambios en la señalización glial-axonal y una mayor actividad de los canales de calcio con una acumulación excesiva de calcio intracelular en los tractos de sustancia blanca de la columna dorsal de la médula espinal (43).

### **3.1.4 Distracción**

Los modelos de distracción implican un estiramiento controlado del cordón espinal destinado a simular las fuerzas de tensión experimentadas en la LME. Se han investigado lesiones de este tipo en gatos, perros, monos y cerdos. Aunque se han desarrollado algunos dispositivos, el modelado reproducible de este tipo de lesión está bajo investigación activa. El distractor de Harrington es uno de los más utilizados (56).

### 3.1.5 Dislocación

Los modelos de dislocación utilizan un mecanismo de desplazamiento vertebral para reproducir las dislocaciones de la columna que se ven comúnmente en la LME traumática. En este modelo, las vigas se unen de forma adyacente a las vértebras. Una de ellas permanece fijada mientras que la otra se desplaza lateralmente a una distancia determinada. Este modelo es ventajoso en el sentido de que no se requiere laminectomía quirúrgica (56).

### 3.1.6 Transección

Los modelos de sección implican un corte de la médula espinal que produce una desconexión entre los segmentos caudal y rostral. El corte puede ser total o parcial, ventral o dorsal o dirigida a uno de los hemisferios. Aunque este tipo de lesión no es muy frecuente en pacientes, este modelo es altamente reproducible y especialmente útil para estudiar la regeneración axonal (56).

## 4 Estrategias terapéuticas para la reparación de la médula espinal

Las complicaciones terapéuticas de una LME grave se describieron por primera vez en 1700 a. C. en un papiro egipcio traducido por Edwin Smith. Este papiro revela la frustración que provoca la LME y la describe como una “enfermedad que no debe tratarse” (59). Hoy en día, el tratamiento de la LME incluye diferentes terapias para restaurar, total o parcialmente, la función perdida. Las terapias utilizadas para la reparación de la médula tras la lesión suelen presentarse de forma combinada entre ellas y acompañadas por un programa de rehabilitación de los miembros afectados. De hecho, las personas con LME inscritas en programas intensivos de rehabilitación física recuperan cierto grado de funciones neurológicas y hasta la fecha es la única intervención aplicada sistemáticamente (60).



#### 4.1 Procedimentales

Las estrategias procedimentales incluyen varias intervenciones que se pueden aplicar después del diagnóstico y que tienen como objetivo evitar complicaciones que puedan agravar la lesión. Algunas de estas estrategias son la descompresión de la médula por parte de las vértebras (61), el drenaje de líquido cefalorraquídeo o la hipotermia. El drenaje de líquido cefalorraquídeo evita la compresión del tejido nervioso debido a alteraciones vasculares (62). La hipotermia (33 ° C) disminuye la tasa metabólica basal después de la LME, lo que proporciona un efecto antiinflamatorio y mejora la recuperación de los resultados funcionales en ratas (63).

#### 4.2 Farmacológicas

Las estrategias farmacológicas se basan en el uso de fármacos para modular algunos procedimientos del daño secundario y pueden llevarse a cabo desde que el paciente ingresa en el hospital. Existen fármacos dirigidos a la neuroprotección y otros a la neurorregeneración. Las terapias **farmacológicas neuroprotectoras** tienen como objetivo disminuir el daño producido por la lesión secundaria, enfocándose en los mecanismos moleculares que desencadenan la lesión. Algunos fármacos neuroprotectores son la metilprednisolona y naloxona, con acción inmunomoduladora y anti-inflamatoria, o la administración de MK801 y gaciclidina, bloqueantes de los receptores de NMDA; mejoran la preservación de tejido espinal y reduce la pérdida secundaria de neuronas y glia en modelos experimentales de LME (64). Sin embargo, el uso clínico de estos fármacos no ha demostrado efectos significativos, con la excepción de la metilprednisolona, hasta ahora el único fármaco recomendado para LME. Recientemente, varios estudios han descrito una serie de nuevos fármacos con propiedades neuroprotectoras en modelos experimentales, aunque ninguno ha llegado, de momento, al uso en la práctica clínica. Por ejemplo, el uso de miociclina después de la LME ha demostrado mejorar la recuperación funcional, probablemente a través de la reducción de la apoptosis de oligodendrocitos y la inflamación local (65). El Riluzole ha mostrado un efecto beneficioso mediante la reducción de la excitotoxicidad y la muerte celular (51). A pesar de que se están probando varios

compuestos en ensayos clínicos, actualmente no existe un fármaco eficaz para tratar la LME aguda y crónica. Por otra parte, las terapias **farmacológicas regeneradoras** postulan que el fallo en la regeneración de los axones del SNC es debido, en parte, a la insuficiente expresión de factores neurotróficos después de la lesión. Se han desarrollado una gran variedad de estudios que demuestran como la aplicación de uno o varios de estos factores, como el FGF, NGF, EGF, BDNF, GDNF, VEGF, PDGF, NT3 y NT4/5, incrementa la supervivencia de neuronas y estimula el crecimiento axonal, tanto de las vías motoras como de las sensoriales (66). Sin embargo, la aplicación local de factores de crecimiento dificulta el crecimiento de los axones de manera dirigida, limitando su extensión. Es por ello por lo que las terapias enfocadas a reducir el ambiente inhibitorio de la regeneración han tomado gran relevancia en la investigación preclínica. La administración local de condroitinasa ABC, que hidroliza los CSPG inhibidores presentes en la cicatriz glial, promueve la regeneración axonal y permite una mejora funcional después de su aplicación en lesiones de médula espinal (67,68). Por otro lado, respecto a los factores inhibidores asociados a la mielina, varios estudios han mostrado que la aplicación de IN-1, un anticuerpo que bloquea la actividad de Nogo, permite la regeneración de axones motores mejorando la función motora en modelos de lesión medular (69).

#### 4.3 Celulares

La pérdida extensa del tejido dañado tras la LME no puede ser reemplazada por mecanismos endógenos. Por ello, la investigación básica ha progresado significativamente en las terapias de inserción de distintos tipos celulares. Así, los objetivos principales para el trasplante celular son: modificar el ambiente de la lesión, modulando los procesos del daño secundario, rellenar una cavidad y crear un puente entre el tejido preservado, reemplazar las células muertas, ya sean neuronas u oligodendrocitos, y crear un ambiente favorable para la regeneración axonal. Otro punto de interés es la posibilidad de utilizar diferentes tipos de células como fuente de factores tróficos, ya sea por su producción intrínseca o por modificación genética de las células trasplantadas. De esta manera, el uso de células como vehículo de agentes farmacológicos evitaría algunas limitaciones como la administración repetida de estos factores. Las más utilizadas en la fase preclínica para el tratamiento de la

LME son las células madre neurales o precursoras (70,71), las células madre mesenquimales, las células precursoras de oligodendrocitos, las células envoltantes olfatorias y las células de Schwann (30).

Las terapias celulares que han llegado a la mayoría (63%) de los ensayos clínicos para la lesión de la médula espinal, han utilizado células derivadas de fuentes autólogas que eliminan la necesidad de utilizar inmunosupresores, mientras que el 27% ha utilizado células alogénicas (72). La mayoría de los ensayos permanecen en curso, aunque el mayor número de ensayos se ha completado con células madre mesenquimales (72). El uso de la ingeniería tisular para la LME está empezando a tener un papel importante a medida que se amplía la tecnología. Las matrices o *scaffolds* desarrolladas para la LME hasta el momento, consisten matrices sintéticas que se injertan para proteger los axones remanentes y promover la maduración tisular, pero a su vez tratan de crear un sustrato por el cuál puedan regenerar los axones de forma más dirigida y eficiente, o para permitir la diferenciación celular mediante de células madre (73,74).

#### 4.4 Promotoras de la función del tejido preservado

Este tipo de terapias tiene como objetivo remodelar ampliamente la conectividad residual después de la LME. Existen muchos enfoques experimentales encauzados a promover la función perdida mediante la modulación del tejido preservado.

Teniendo en cuenta los eventos fisiopatológicos de la LME crónica, se han desarrollado **neuromodulaciones farmacológicas** con la finalidad de refinar la neuroplasticidad, disminuir el dolor, controlar la función neurológica y reducir las complicaciones maladaptativas. Los objetivos del control de la actividad neuronal consisten en la modulación de los neurotransmisores monoamínicos en las vías descendentes serotoninérgicas, dopaminérgicas y noradrenérgicas (64). La neuromodulación a través de **dispositivos eléctricos** que mimetizan el impulso neuronal, implica la aplicación de estimulación eléctrica que regula la actividad neuronal enfocada en el encéfalo o en la médula espinal. Recientemente se ha demostrado que la estimulación eléctrica mediante electrodos, implantados quirúrgicamente en la médula espinal, permite el control voluntario

de la marcha en personas con LME incluso años después de la lesión (75). Esta tecnología ya se ha empezado a utilizar en la zona cervical para recuperar el control de las extremidades superiores (53).

Las prótesis neuromecánicas, exoesqueletos o interfaces neuronales (*brain-machine interfaces*) son dispositivos de asistencia y rehabilitación que interactúan con el sistema sensoriomotor. Las prótesis neuromecánicas pueden compensar la pérdida de retroalimentación aferente al redirigir y aumentar la información sensorial. A su vez, proporcionan un soporte eléctrico y mecánico acorde con las capacidades musculares de la persona y consistente con las vías neurales todavía intactas (64).

Por otra parte, la rehabilitación física intensiva desencadena mecanismos de plasticidad dependientes de actividad o *activity-dependent plasticity* que reorganizan la circuitería dañada para recuperar los movimientos afectados por la lesión (76). Los estudios que evalúan los efectos del entrenamiento en la función de las extremidades superiores o de la mano después de una lesión de la médula espinal cervical son escasos y los resultados son diversos (77). Sin embargo, es la estrategia que siempre se utiliza después de una lesión medular. Identificar el valor y la eficacia de estas intervenciones puede ayudar a los médicos y al diseño de ensayos clínicos futuros, aunque hay pocos estudios existentes. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis se centra en evidenciar la efectividad del entrenamiento dirigido a promover la recuperación de la función de la extremidad superior, concretamente de la mano a partir de experimentos en roedores con lesión de la médula espinal cervical.

## 5 Rehabilitación

### 5.1 Cómo la rehabilitación promueve la recuperación

En la década de 1940, Guttman introdujo el deporte y el ejercicio como actividades obligatorias para sus pacientes con LME.

Después de una lesión neurológica, se puede sobreponer la función perdida como consecuencia de una recuperación de la función o de una compensación. En el momento en el que se recupera la función perdida, se restaura la estrategia del movimiento original disponible previo a la lesión. Si se produce una compensación, la recuperación está

promovida por patrones y estrategias de movimiento alternativos, siendo el resultado del aprendizaje de un proceso motor nuevo. Por ello, las pruebas deben llevarse a cabo con cuidado para delinear los mecanismos compensatorios de la verdadera recuperación. Por ejemplo, durante la recuperación de la función de las extremidades superiores inducida por el entrenamiento de R&G, las ratas pueden desarrollar movimientos compensatorios como arrastrar el pellet (scooping) en lugar de un agarre de precisión (67,78). Pero tanto la recuperación de la función original como la compensación requieren de la reestructuración del sistema nervioso o neuroplasticidad. Varios mecanismos celulares se ven inducidos a través de la actividad y/o el entrenamiento, los cuales contribuyen a la plasticidad neuronal que promueve tanto el desarrollo, el aprendizaje como la recuperación después de la LME. Se ha observado como el entrenamiento puede prevenir la atrofia muscular (79), regular de forma positiva factores tróficos celulares, como por ejemplo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (80,81) y aumentar tanto los niveles de calcio intracelular como los de adenosín monofosfato ciclico (cAMP), que contribuyen a la capacidad de crecimiento neuronal (82,83). Esta reorganización celular se lleva a cabo con los mecanismos y recursos intrínsecos disponibles para producir cambios en la funcionalidad neuronal así como en la conectividad (84). La remielinización de los axones preservados después de la actividad es otro proceso que ayuda a restablecer la transmisión neuronal promoviendo la recuperación funcional (89,90).

También se debe tener en cuenta que, durante las semanas posteriores a la lesión, existe una recuperación espontánea debido al movimiento vinculado a la vida diaria. Por lo que el entrenamiento podría potenciar esta recuperación espontánea observada en ausencia de intervenciones terapéuticas. Además, la neuroplasticidad que se produce por la actividad no solo promueve la recuperación funcional, sino que puede paliar los cambios maladaptativos como la espasticidad (86), la disreflexia (87) o el dolor neuropático (88).

La neuroplasticidad que sucede después de la LME ayuda a promover la recuperación funcional, pero dependiendo de la gravedad de la lesión, puede resultar insuficiente.

Para ser efectivos, estos cambios adaptativos deben estar orquestados con el fin de establecer conexiones significativas. Por lo que el momento y la ubicación de la actividad neuronal durante los períodos de mayor plasticidad (como después de la lesión) determinarán los tipos de cambios que se produzcan, así como su localización. De esta

manera, los cambios neuronales que de forma eficientes reconecten los circuitos, serán estabilizados (89).

## 5.2 Ejercicio específico de la tarea (Task-specific)

El entrenamiento para tareas específicas se esfuerza por recuperar la función motora por la repetición de un movimiento particular con o sin carga cardiovascular. Este tipo debe distinguirse de otras formas de rehabilitación, como el entrenamiento de fuerza (que se enfoca principalmente en la función muscular (90) ) y el entrenamiento con ejercicios con carga cardiovascular (91). La diferencia entre el ejercicio y el entrenamiento específico para tareas no está bien definida. Normalmente el ejercicio es una parte integral del entrenamiento y el entrenamiento ocurre durante el ejercicio (por ejemplo, correr), y tanto el ejercicio como el entrenamiento probablemente comparten beneficios y mecanismos superpuestos; sin embargo, difieren en su implementación y están diseñados para lograr diferentes objetivos. La bibliografía de la LME experimental muestra que la repetición estructurada de una tarea concreta puede mejorar el resultado neurológico y promover la plasticidad neural (92). Sin embargo, en los humanos, la simple repetición de un movimiento no siempre es suficiente para mediar la recuperación, necesitando un desafío cognitivo (por ejemplo, aprender una nueva habilidad) para mejorar la función (77). El papel de la motivación en la LME preclínica es menos claro y desafiante de discernir. Por el contrario, algunos enfoques, como el ambiente enriquecido, mejoran el bienestar de los animales, por lo que aumentan la actividad y proporcionan un uso intensivo de una función seleccionada de una manera más general (93). Ambas metodologías tienen sus ventajas y desventajas. Si bien el entrenamiento para tareas específicas está orientado a objetivos e induce la recuperación en la tarea entrenada específica, es laborioso y los animales necesitan estar motivados. La combinación de ambas técnicas es posible, pero se producen competitividad e interacciones entre tareas (94). Por lo tanto, al interpretar los resultados de experimentos con animales que han recibido entrenamiento, es importante considerar que la mejora del desempeño en una tarea motora podría atribuirse al componente de entrenamiento, al componente de ejercicio o a una interacción de ambos factores.

## 5.3 Métodos de rehabilitación

### 5.3.1 Entrenamiento de las patas traseras

El entrenamiento de rehabilitación para la función locomotora se ha centrado en modelos animales de LME torácica. Estas técnicas tratan de promover el movimiento repetitivo de las patas traseras en una tarea específica, como caminar en cinta rodante, correr sobre una rueda, andar en bicicleta, caminar sobre el suelo o nadar.

El entrenamiento en cinta rodante es una de las estrategias más utilizados para rehabilitar la función locomotora tras la LME tanto en entornos preclínicos (95) como clínicos (96). Esta base de rehabilitación se basa en el descubrimiento de que gatos espinalizados podían ser entrenados en una cinta rodante para recuperar el paso de las patas traseras promoviendo la plasticidad del CGP del circuito espinal (97).

Una estrategia alternativa que promueve la recuperación de la locomoción en roedores, son las ruedas de entrenamiento que se instalan en las propias jaulas de hogar. La actividad se puede monitorizar fácilmente y la intensidad se puede regular modulando la resistencia de las ruedas, aunque por razones éticas no es recomendable alojar a los individuos de forma individual, dificultando la monitorización de la cantidad de entrenamiento (98).

Otra posibilidad para entrenar potencialmente el circuito locomotor de roedores con LME es el entrenamiento en bicicleta, donde los pies están montados sobre pedales, que se mueven mecánicamente (99). El hecho de que el movimiento de ciclismo rítmico solo se ejecute con las extremidades posteriores, permite aislar el entrenamiento de las extremidades anteriores y no se requiere control motor residual. Por tanto, estos movimientos orquestados proporcionan retroalimentación sensorial a los CGP que inducen la reorganización cortical y mejoran la función perdida (100).

La natación proporciona otro enfoque para entrenar la función locomotora, donde los animales se colocan en un tanque de agua para fomentar el uso de las patas traseras (100,101).

### 5.3.2 Entrenamiento de las patas delanteras

La mayoría de los trastornos del sistema nervioso conllevan déficits en el uso de los miembros superiores. La calidad de vida de los pacientes que sufren alteraciones en el sistema nervioso se ve disminuida al quedar afectadas tareas como alcanzar, agarrar y manipular un objeto. El deseo de recuperar esta función es de gran importancia para las personas que han sufrido una lesión medular (49). Estos factores hacen que el análisis comportamental de las extremidades anteriores sea una medida de resultado popular en la LME experimental. Existen varios modelos comportamentales que permiten la evaluación del control motor de las extremidades superiores analizando diversos comportamientos en los roedores. Los comportamientos más estudiados son el análisis de del movimiento de limpieza o grooming (102,103), la manipulación de cereales definida por Irvine, Beatties & Bresnahan (IBB) (104), el test de la pata preferente en un cilindro (103,105,106), la manipulación de pasta de Vermicelli y Capellini (107) o el movimiento de alcanzar y agarrar una pieza de comida (108). Sin embargo, el comportamiento más complicado, pero más informativo y específico que analiza el control motor fino de las extremidades superiores, es la tarea de alcanzar y agarrar (Reaching&Grasping). Este modelo preclínico resulta muy útil para investigar las patologías del sistema motor humano y definir posibles terapias (109).

#### Alcanzar y agarrar o Reaching & Grasping (R&G)

La tarea de R&G consiste en que el animal extienda una de sus extremidades delanteras hacia una pieza de alimento, la agarre y se la lleve a la boca para comérsela. Este movimiento se encuentra evolutivamente conservado en muchos vertebrados y su ejecución estereotipada evoca la idea de un control motor automatizado. Se encuentra muy desarrollado en animales de experimentación neurobiológica como roedores y primates no humanos. De esta forma, R&G se ha convertido en un comportamiento muy útil para estudiar el sistema motor y entender las enfermedades neurobiológicas en humanos (110).



Se han desarrollado varios modelos del movimiento de R&G, entre los más destacables encontramos la tarea de la escalera de Montoya o Montoya Staircase Task (111) y la tarea de agarre de un único pellet o single pellet reaching task (SPRT) (109).

Las funciones de las extremidades superiores, como alcanzar y agarrar, están controladas en gran medida por el cerebro y el tronco encefálico en lugar de los circuitos espinales. Como medida de resultado, se puede evaluar la restauración de la conectividad entre el encéfalo y la médula espinal. Pero estas pruebas presentan ciertas limitaciones (54). La primera limitación que se presenta es la localización unilateral de la lesión, de forma que uno de los hemisferios queda más afectado que el otro. Esta estrategia se debe a que las lesiones moderadas bilaterales conllevan graves problemas para la supervivencia y bienestar de los animales. Además, al igual que los humanos, los roedores muestran una preferencia por el uso de una de las dos extremidades superiores, son zurdos o diestros, por lo que debe identificarse individualmente dicha preferencia antes de considerar las lesiones y el enfoque de prueba. Las lesiones unilaterales también dificultan las pruebas, ya que las ratas pueden compensar utilizando la extremidad menos dañada (112), imposibilitando el seguimiento de la recuperación de la función si no se fuerza al animal a usar la pata lesionada mediante inmovilización de la no lesionada (113). En último lugar, muchas de las evaluaciones o tareas de las extremidades superiores requieren un entrenamiento previo a la lesión muy tedioso, consumiendo mucho tiempo para el experimentador. Sin embargo, sigue siendo un comportamiento muy complejo, informativo y conservado entre muchos mamíferos, lo que permite una facilitación en la traslación de las investigaciones a humanos. Para reducir la carga de trabajo, las estrategias recientes de varios laboratorios han sido adaptar la automatización de estas pruebas (114–116).

### *Traslación de la investigación de R&G en LME a humanos*

Los gestos del movimiento de R&G, su secuencia, perfiles de velocidad y su topografía son similares en las dos especies. Los humanos muestran más supinación y tiempos de agarre más prolongados al alcanzar objetos pequeños en lugar de grandes, que los roedores. Tanto las ratas como los humanos mueven la extremidad medialmente utilizando la mano para

apuntar cuando tienen que atravesar una abertura, pero en pruebas de libre alcance, solo las ratas continúan apuntando con la mano. Los movimientos en humanos se caracterizaron por una mayor combinación de componentes de movimiento, más variabilidad y uso independiente de los dígitos. Se presentan argumentos de que las similitudes y diferencias en el alcance de ratas y humanos no se explican trivialmente por similitudes de extremidades y tareas. Las muchas similitudes en los movimientos de las dos especies proporcionan evidencias de un desarrollo muy similar, por lo que pueden evidenciar a su vez, estrategias similares para la recuperación de la funcionalidad (117).

La evolución de los modelos experimentales de LME en las últimas 3 décadas ha sido muy considerable, pero la posibilidad de traducir estos hallazgos a la población humana sigue siendo un desafío. Las diferencias entre los modelos de lesiones, la anatomía de las especies y los objetivos de la evaluación funcional plantean un conjunto de situaciones inciertas y difíciles de resolver. Los experimentos para estudiar la recuperación de la función de la extremidad superior después de una LME en primates no humanos, resolvería el problema de las diferencias anatómicas, pero presenta las desventajas de que los estudios se limitan a muy pocos laboratorios además de la dificultad de obtener el tamaño de muestra necesario. Por lo que es preciso el enfoque multidisciplinar de científicos básicos y clínicos para proporcionar avances significativos para la comunidad de LME (118).

## 5.4 Factores que influyen en la eficacia de la rehabilitación

### 5.4.1 Autoentrenamiento, efecto techo y testaje excesivo

Después de las LME y dependiendo de su gravedad, se produce un cierto grado de recuperación tanto en humanos como en modelos experimentales de LME. Cuando los animales, después de una LME torácica, intentan repetidamente movimientos o patrones específicos en su jaula, son capaces de promover la recuperación parcial de la función de forma espontánea (119). Este hecho supone un reto en el estudio del entrenamiento rehabilitador centrado en la función motora dado que es difícil superar la recuperación espontánea conseguida por el autoentrenamiento o autorehabilitación. Esta mejoría

promovida únicamente por el movimiento diario en su jaula muchas veces es difícil de incrementar con una rehabilitación específica. Este efecto se conoce como el “efecto techo” en el que la recuperación funcional ha alcanzado su mayor punto, el cuál es muy difícil de incrementar por más rehabilitación que se dé (101). Por otra parte, las pruebas para la función entrenada pueden considerarse una sesión de entrenamiento o rehabilitación. Cuando las pruebas se realizan con demasiada frecuencia, el efecto acumulativo del entrenamiento puede mejorar la recuperación, incluso en animales sin un régimen de rehabilitación previsto, subestimando así el efecto real del entrenamiento para evaluar la función motora. No está definido si una vez a la semana supone un testeo suficiente para inducir un efecto rehabilitador, sin embargo, se ha visto como tan solo 3 veces a la semana podrían ser excesivas (120).

#### **5.4.2 Dosis e intensidad del entrenamiento**

La recuperación motora después de la LME se asocia a la cantidad de entrenamiento de rehabilitación (nº de repeticiones de la tarea durante una sesión) y a su intensidad (nº de repeticiones por unidad de tiempo) (121,122). Se ha observado que una cantidad baja de entrenamiento de rehabilitación en la tarea de R&G después de una lesión por transección parcial da como resultado la recuperación motora (82). Sin embargo, comenzar el mismo entrenamiento meses después de la lesión solo muestra beneficios en la recuperación del R&G si se aumenta la intensidad de 3 a 4 veces (78). Estos eventos pueden reflejar la importancia de aumentar la intensidad del entrenamiento para promover la plasticidad. Sin embargo, aumentar el número de repeticiones por unidad de tiempo también podría ser perjudicial; las sesiones prolongadas de entrenamiento de R&G de alta intensidad (horas) en ratas pueden causar patologías óseas (123) y trastornos musculoesqueléticos asociados a la repetición excesiva del movimiento (124). Por lo tanto, es necesario determinar la intensidad y duración del entrenamiento para maximizar la recuperación y evitar los efectos secundarios. En este sentido, la comparación de estudios preclínicos que incorporan entrenamiento se enfrenta a un problema: la falta de informes de intensidad del entrenamiento. Los estudios que mostraron la recuperación inducida por el movimiento de R&G en su entrenamiento después de una LME cervical no informan el número de

repeticiones por sesión, solamente de la duración de la sesión (119,125,126). Esta escasez de informes hace que sea difícil determinar la influencia de la dosis y la intensidad de la rehabilitación, por lo que sería de gran ayuda que los investigadores midan y describan los detalles del entrenamiento al publicar sus hallazgos.

### **5.4.3 Motivación**

Los animales, como los humanos, cuando se exponen a una tarea difícil después de una LME pueden frustrarse por el fracaso en la tarea y/o perder la motivación con el tiempo. Para mantener el interés de los animales en la tarea de adiestramiento, a veces se requiere cierta aplicación o refuerzo. Algunas de las técnicas para fomentar el mantenimiento de la motivación en el entrenamiento son el uso de descargas eléctricas incómodas, pero indoloras, para mantener a los animales caminando en una cinta rodante (127), restringir la cantidad de alimento en la jaula horas antes de una tarea basada en recompensas de alimentos como el R&G (78), o simplemente premiar el éxito de una tarea con una sabrosa recompensa (128). Por más que sea necesario motivar a los animales a entrenar, la forma en que se logre la motivación puede afectar el éxito y al resultado del entrenamiento. La restricción de alimento para alentar el alcance de los pellets aumenta el número de alcances realizados por sesión, pero si los animales tienen demasiada hambre, pueden mostrar un comportamiento similar a la ansiedad, repitiendo la tarea con entusiasmo sin concentrarse y, en última instancia, reduciendo el éxito. Por otro lado, alimentar con gránulos de sacarosa para motivar el movimiento puede resultar en una alta ingesta de azúcar que, por sí sola, puede tener efectos secundarios. Otras técnicas de refuerzo pueden interferir directamente con el aprendizaje de la tarea de entrenamiento. Por lo tanto, la forma en la que se motiva el entrenamiento puede tener serias implicaciones y debería ser considerado cuidadosamente al interpretar o comparar los resultados.

### **5.4.4 Recuperación o compensación en estudios longitudinales**

Los análisis cuantitativos, como la tasa de éxito en la prueba de R&G (número de pellets ingeridos con éxito en proporción del número de intentos) permiten relacionar el entrenamiento con la recuperación. Sin embargo, se desconoce si esta recuperación se

produce por mecanismos compensatorios o restaurativos. Por lo tanto, se justifica la adición de medidas cualitativas, como el análisis cinemático y de patrones de movimiento que pueden informar sobre la naturaleza del éxito (108,129). Además, las pequeñas modificaciones de la tarea entrenada diseñada para evitar el uso de estrategias compensatorias pueden ser útiles para cuantificar la influencia de la compensación en la función recuperada. Por ejemplo, la introducción de un espacio entre la plataforma que sostiene el pellet y la caja suele reducir el movimiento compensatorio de *scooping* (78). Otra consideración importante es estudiar cómo evoluciona la recuperación funcional a lo largo del tiempo. Medir los resultados de la recuperación en un solo momento, normalmente al final del período experimental, podría no representar el beneficio completo del entrenamiento. Los estudios a largo plazo, en los que los resultados se miden durante un período de tiempo, aumentan nuestro conocimiento de los efectos del entrenamiento. El número de momentos en los que se toman las medidas de resultado y el cronograma de estas pueden afectar nuestra interpretación de la dinámica temporal de la recuperación. Si hay demasiado tiempo entre las medidas, la resolución temporal es baja, lo que resulta en una pérdida de información. Por otro lado, medir la recuperación con demasiada frecuencia es engorroso, requiere mucho tiempo y puede introducir un fenómeno de prueba excesivo. En conjunto, la combinación de medidas cuantitativas y cualitativas en estudios longitudinales mejorará nuestra comprensión sobre cuánta recuperación se logra, cómo ocurrió la recuperación y su dinámica temporal.

## HIPÓTESIS

Los parámetros fundamentales para cualquier régimen de rehabilitación son el inicio, la intensidad, la frecuencia y la duración del entrenamiento (130). Sin embargo, aún existe muy poco consenso sobre cuál es el rango óptimo para algunas de estas variables para promover la recuperación funcional después de lesiones o enfermedades del sistema nervioso, con la complejidad adicional de elegir la naturaleza de la tarea a entrenar (131). Tampoco es trivial definir cuáles son las medidas de la conducta que determinan si la rehabilitación ha promovido con éxito la recuperación. En las lesiones de médula espinal, por ejemplo, la recuperación de la locomoción se puede clasificar mediante la puntuación de mejoras graduales de los movimientos de las extremidades anteriores y posteriores, que van desde arrastrar las extremidades hasta usarlas con precisión para dar pasos coordinados, con apoyo adecuado del peso corporal (132). Por el contrario, para actividades menos automatizadas de las extremidades anteriores, como es el rendimiento de alcanzar y agarrar (R&G), se suele hacer una distinción dicotómica entre intentos exitosos y fallidos, en función de la capacidad del animal para coger un pellet y soltarlo en la boca. Sin embargo, en los intentos fallidos, la incapacidad de levantar y extender la pata no es equivalente a la incapacidad de retraer y soltar el pellet agarrado en la boca, a pesar de que ambos fracasaron. Es imperativo identificar las limitaciones de recuperación del movimiento que cualquier intervención puede lograr, incluida la rehabilitación, para así diseñar intervenciones complementarias que cumplan o superen estas limitaciones. Además, todavía no existe una clarificación acerca del grado de especificidad que debe tener una tarea rehabilitadora para recuperar una función concreta que haya creado su propio circuito. En la presente tesis se plantea la hipótesis de que, después de una contusión en la médula espinal cervical, los animales que reciben una rehabilitación específica diaria de R&G mejorarán con el tiempo sus habilidades para usar su extremidad afectada para alcanzar y agarrar pellets individuales. Además, planteamos que la actividad de rehabilitación debe ser lo suficientemente motivadora para mantener la intensidad y el interés en la misma.

## OBJETIVOS

Los experimentos diseñados intentan responder a la pregunta de cuál es la mejor estrategia para rehabilitar la función de R&G de un animal después de una LME. Por ello, el objetivo general es evaluar la recuperación de la capacidad de R&G en animales adscritos a diferentes paradigmas rehabilitadores que incluyen el uso de la pata delantera.

Para ello, se definieron los objetivos específicos:

**Objetivo 1.A.1.** Comparación de los déficits en la destreza manual producidos por contusiones en el funículo central o lateral cervical con diferentes severidades en ratas.

**Objetivo 1.A.2.** Identificar la región del segmento cervical afectado por la lesión que reduce la destreza manual.

**Objetivo 1.B.1:** Establecer un modelo de evaluación comportamental, para evaluar tanto los éxitos como los fracasos de los animales para agarrar pellets con la mano, antes y después de una lesión.

**Objetivo 1.B.2:** Evaluación de la rehabilitación de las extremidades delanteras en la recuperación de la destreza manual tras una lesión en el segmento C5 medular

**Objetivo 1.B.3:** Evaluación la extensión del daño tisular tras una contusión moderada en la médula espinal.

**Objetivo 1.B.4:** Evaluación de la integridad del tracto corticoespinal en el segmento cervical tras una lesión medular.

**Objetivo 2.A.1** Identificar la intensidad optima de una contusión medular cervical que afecte al control motor fino

**Objetivo 2.B.1** Evaluar durante 3 meses postoperatorios los efectos de una rehabilitación específica de las extremidades superiores después de una lme.

**Objetivo 3** Implementar y caracterizar tres modelos de rehabilitación de la función manual tras la lesión medular, y comparar después sus efectos en la recuperación de la tarea de R&G.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1 Aprobaciones

Los protocolos experimentales se adhirieron a las recomendaciones de la Unión Europea. Todos los experimentos descritos en este manuscrito fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH: 4057) y siguieron la Directiva 2010/63 / EU del Consejo de las Comunidades Europeas. Los métodos de cada procedimiento se llevaron a cabo siguiendo las pautas aprobadas. Se hizo todo lo posible para minimizar el estrés y el sufrimiento de los animales.

## 2 Animales

Los animales que se utilizaron en esta tesis fueron ratas de la especie *rattus norvegicus* hembra. Se alojaron a  $22 \pm 2$  ° C en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h (300 lux / 0 lux) con pienso estándar para ratas, depositado en el interior de su jaula, manteniendo una restricción alimentaria dependiente de cada experimento y agua de libre disponibilidad, con un número de 3 a 5 animales/jaula.

El único entorno enriquecido que pudimos proporcionarles, en el que no realizaran un uso extra de la pata delantera, fue un cilindro de metacrilato rojo y bolas de papel hechas a mano.

Los animales empleados en el proyecto que se realizó durante la estancia en la UiO fueron ratones de la especie *mus musculus* hembra. Todos los ratones fueron alojados en cajas de 5 animales/jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (7:00 a. m. a 7:00 p. m.), con control de ingesta calórica (dependiente del experimento) y agua de libre disponibilidad. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento, de acuerdo con la directiva 2010/63 / EU del Consejo de las Comunidades Europeas para el cuidado y uso de animales. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las



normas éticas francesas. Este proyecto recibió la aprobación del comité de ética local (CIEPAL NCE / 2014-209).

## 2.1 Sprague Dawley (rata)

Un total de 16 ratas de la cepa Sprague Dawley se compraron en el estabulario central de la UAB, con 2-3 meses de edad para el Experimento 1.1: Evaluación de la rehabilitación en la recuperación de la destreza manual en ratas con contusión cervical.

## 2.2 Long Evans (rata)

Esta cepa de ratas es especialmente interesante en el área del aprendizaje motor, pues se ha demostrado una mayor capacidad de aprendizaje a pesar de su fenotipo hiperactivo (133,134). En el experimento 2 de esta tesis se utilizaron 24 ratas de esta cepa, de las cuales 4 se descartaron porque no aprendieron la tarea de R&G, 2 ratas fallecieron/ fueron sacrificadas (hipoxia repentina y crecimiento aberrante de uno de los incisivos) sin lesión ninguna, 3 ratas fallecieron justo después de la lesión y 3 ratas fueron descartadas porque recibieron una cirugía incorrecta. Un total de 12 ratas fueron incluidas en el estudio del experimento 2. En el experimento 4 de esta tesis se compraron 31 ratas de esta cepa, de las cuales, todas ellas formaron parte del estudio sin exclusión de principio a fin.

## 2.3 C57BL/6N (ratón)

Para el Estudio 2.1, participaron 7 ratones macho de la cepa CBL57/6. En este experimento se infligieron LME de diferentes severidades y se evaluó la función motora a través del método IBB. Para el Estudio 2.2, 26 ratones hembra de la cepa CBL57/6 (Scanbur, Suecia), con 5 a 7 semanas de vida, fueron entrenados y evaluados para la función motora cuantificada por el método por el R&G.

Los animales empleados en el proyecto que se realizó durante la estancia en la UiO fueron ratones de la especie *mus musculus* hembra. Todos los ratones fueron alojados en cajas de 5 animales/jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (7:00 a. m. a 7:00 p. m.), con restricción

calórica de 0,1 g de comida por 1 g de su peso corporal y agua de libre disponibilidad. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Todos los experimentos se realizaron estrictamente de acuerdo con la directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86–609 / ECC) y el decreto del 20 de octubre de 1987 (87–848 / EEC).

### 3 Evaluación Funcional

#### 3.1 Escala de Irvine, Beatties and Breshnahan (IBB)

La escala de cuantificación de Irvine, Beatties and Breshnahan (IBB) se desarrolló para evaluar el control fino de las manos después de una LME con un constructo validado (135). Consiste en evaluar cómo los roedores manipulan cereales redondos. Este movimiento no requiere de entrenamiento, ya que los roedores manipulan los cereales de forma común y espontánea conservada en la especie. Al ser una manipulación que requiere de destreza manual, el control motor fino puede ser observado de una forma muy rigurosa que distingue los movimientos de las articulaciones del brazo (codo, muñeca y dedos). Esta escala evalúa el movimiento de las extremidades delanteras y asigna una puntuación jerárquica desde el 0 hasta el 9, que se resume en la siguiente tabla y se explica posteriormente:

	Posición predominante del codo	Movimientos proximales del brazo	Contacto o apoyo no volar	Posición predominante de la mano	Contacto con soporte volar	Adaptación del cereal	Movimientos muñeca	Movimientos de dedos sin contacto	Movimientos de los dedos que están en contacto y manipulan	Método de agarre
0	Extendida	Ninguno/Ligero	Ninguno							
1	Flexionada	Ligero/Extensivo	Alguno	Agarrotada fija, flexionada						
2	Flexionada	Extensivo	Casi siempre	Agarrotada fija, flexionada						
3	Flexionada	Extensivo		Extendida, no adaptable	Ninguno/ligero	Ninguno/Exagerado				
4	Flexionada	Extensivo		Extendida,	Alguno	Exagerado	Sí/No	Dígito 2		

	Posición predominante del codo	Movimientos proximales del brazo	Contacto o apoyo no volar	Posición predominante de la mano	Contacto con soporte volar	Adaptación del cereal	Movimientos muñeca	Movimientos de dedos sin contacto	Movimientos de los dedos que están en contacto y manipulan	Método de agarre
				no adaptable		o				
5	Flexionada	Extensivo		Extendida, no adaptable	Casi siempre	Sutil	Sí		Dígito 2	
6	Flexionada	Extensivo		Extendida, no adaptable	Casi siempre	Sutil	Sí	Dígito 3	Dígito 2	Anormal
7	Flexionada	Extensivo		Parcialmente extendida, adaptable	Casi siempre	Sutil	Sí	Dígito 4	Dígito 2,3	Normal a veces
8	Flexionada	Extensivo		Parcialmente extendida, adaptable	Casi siempre	Sutil	Sí		Dígito 2,3,4	Normal a veces
9	Flexionada	Extensivo		Parcialmente extendida, adaptable	Casi siempre	Sutil	Sí		Dígito 2,3,4	Predominantemente Normal

**Tabla 1: Guía de determinación de la puntuación en la escala IBB.** Esta guía se utiliza como ayuda en la selección de la puntuación correcta de IBB.

### 3.1.1 Cuantificación de la puntuación con la escala IBB

**0:** La posición predominante del codo es **extendida**, sin movimientos proximales de la extremidad anterior o **ligeros** y / o **sin** apoyo no volar por la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión.

**1:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **ligeros** de la extremidad anterior proximal y **algún** apoyo no volar de la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. La posición predominante de la pata delantera es **agarrotada, fija y flexionada**.

**2:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de las extremidades anteriores proximales y **casi siempre** hay apoyo no volar de la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. La posición predominante



**Figura 6: Manipulación de cereales.**

de la pata delantera es **agarrotada, fija y flexionada**.

**3:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de las extremidades anteriores proximales y **ninguno o algún** soporte volar de la extremidad anterior ipsilateral a la lesión. Las adaptaciones del cereal son **exageradas** o **ausentes**. La posición predominante de la pata delantera es **extendida, no adaptable**.

**4:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de la extremidad anterior proximal y **alguna** sujeción palmar de la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Las adaptaciones del cereal son **exageradas**, con movimientos **sin contacto** del **dígito 2** y posibles movimientos de muñeca. La posición predominante de las patas delanteras es **extendida, no adaptable**.

**5:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de las extremidades anteriores proximales y **casi siempre** con soporte volar por la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Las adaptaciones del cereal son **sutiles** y están presentes con los movimientos **manipuladores de contacto** del dígito 2 y los posibles movimientos de la muñeca. La posición predominante de la pata delantera es **extendida, no adaptable**.

**6:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** proximales de la extremidad anterior y **casi siempre** con soporte volar por la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Los movimientos de muñeca y las adaptaciones del cereal son **sutiles** y están presentes con movimientos **manipuladores de contacto** del **dígito 2** y movimientos **sin contacto** de **dígito 3**. La posición predominante de la pata delantera es **extendida, no adaptable** con un método de agarre **anormal**.

**7:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** proximales de la extremidad anterior y **casi siempre** con soporte volar por la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Los movimientos de muñeca y las adaptaciones del cereal son **sutiles** y están presentes con movimientos **manipuladores de contacto** del **dígito 2 y 3** y movimientos **sin contacto** del **dígito 4**. La posición predominante de la pata delantera es **parcialmente extendida** pero **adaptable** con un método de agarre **normal a veces**.

**8:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de las extremidades proximales y **casi siempre** con soporte volar de la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Los movimientos de muñeca y las adaptaciones del cereal

son **sútiles** y están presentes con los movimientos **manipuladores de contacto** de los **dígitos 2, 3 y 4**. La posición predominante de la pata delantera es **parcialmente extendida y adaptable** con un método de agarre **normal a veces**.

**9:** La posición predominante del codo es **flexible**, con movimientos **extensivos** de las extremidades proximales y **casi siempre** con soporte volar de la extremidad anterior ipsilateral al sitio de la lesión. Los movimientos de muñeca y las adaptaciones del cereal son **sútiles** y están presentes con los movimientos **manipuladores de contacto** de los **dígitos 2, 3 y 4**. La posición predominante de la pata delantera es **parcialmente extendida y adaptable** con un método de agarre **casi siempre normal**.

Para esta prueba se utilizaron cereales de forma toroide (Cheerio's Bio, Nestlé) para el experimento en ratas. Para el experimento con ratones se utilizaron cereales redondos. La asignación de la puntuación IBB se realizó antes y después de las lesiones y fue grabada con una cámara de video (Go Pro 5.0).

### 3.2 Evaluación destreza manual Reaching & Grasping.

Todos los animales fueron entrenados de forma preoperatoria a la tarea unimanual de agarre fino R&G. Los efectos de las rehabilitaciones se evaluaron periódicamente mediante esta misma tarea.

#### 3.2.1 Rehabilitación a largo plazo. Ratas Long Evans

El entrenamiento y las pruebas de R&G se realizaron en una caja de metacrilato (15 x 29,5 x 29,5 cm) con una ventana frontal (1,5 cm de ancho x 3 cm de alto, 3 cm sobre la altura del suelo). En el exterior de la ventana se sitúa una plataforma para presentar los pequeños pellets con aroma de banana ( $\varnothing=4\text{mm}$ , Dustless Precision Pellets<sup>®</sup>, 45 mg, Banana Flavor, Sucrose, # F0024, BioServ), a 1 cm de la ventana, para que los animales la cojan con su pata preferente (zurda o diestra). Las sesiones de entrenamiento se realizaron en la primera parte de la fase de luz (67,136) .

El primer objetivo del entrenamiento fue familiarizar a los animales con el entrenador, con la caja de R&G y con los pellets de banana. Esta fase consistió en 1 semana de manipulación de los animales por parte del entrenador, seguida de 3 días de manipulación y exposición a la caja instrumental por grupos de grandes a pequeños (4 a 2 animales a la vez), con pellets en el suelo de la caja durante 15 min / sesión (3-6 días). De esta forma se reduce el estrés de los animales por la individualización y aumenta su interés tanto por el espacio nuevo como por la comida nueva. Durante los últimos días el entrenador presentó los pellets únicamente a través de la ventana, empezando por sostenerlos con unas pinzas dentro de la caja y extrayendo las pinzas de forma en que se forzaba al animal a sacar el hocico por la ventana para que entendiera que tiene que cogerlos de la plataforma. En este momento los animales comenzaron a sacar la pata por la ventana. Una vez que los animales fueron familiarizados, se entrenaron individualmente con 40 pellets / sesión (40 intentos). Para evitar el mantenimiento de la pata levantada entre intentos delante de la ventana, los animales fueron entrenados a darse la vuelta entre intentos. Se realizó una asociación entre la introducción de las pinzas a través de la ventana, que las hacía retroceder, con una orden sonora del entrenador (*go back!*), hasta que ya no fue necesario introducir las pinzas y, en algunos casos, ni la orden vocal para que realizaran el cambio de posición. Cuando los animales comenzaron a mostrar preferencia por una pata en el momento de realizar la tarea se cuantificaron sus puntuaciones con el promedio de las 3 últimas sesiones (% de éxito y % de errores).

### **3.2.2 Impacto de la rehabilitación. Ratones**

El entrenamiento de R&G en ratones se basó en el entrenamiento de Whishaw (136) con las adaptaciones para ratón encontradas en el trabajo de Zuo et al.(137). Consistió en una primera fase de habituación del animal con el entrenador (1 semana), con los pellets y con la caja de entrenamiento (2-3 semanas). En este caso, la caja de entrenamiento tenía una ventana vertical en el centro de la caja y los pellets (semillas de mijo cubiertas con cacao en polvo-hechas a mano) se situaron en una plataforma rotatoria ( $\varnothing=10$  cm, hendiduras  $\varnothing=6$ mm ) con 40 hendiduras para colocar las semillas (40 intentos/sesión). Fue diseñada especialmente para facilitar el entrenamiento en ratones: en primer lugar, el movimiento de

R&G es mucho más rápido en ratones que en ratas; en segundo lugar, realizan intentos sin haber pellet en la hendidura de forma ansiosa si tienen que esperar mucho. Por ello, se consideró un punto importante que, una vez captada la atención de los animales, los pellets se presentaran de forma rápida para mantener su interés en la tarea y evitar los movimientos no cuantificables a través de este método. Además, para motivar a los animales a realizar la tarea, se aplicó una restricción calórica de 0,1g de comida/g de peso corporal, que suponía una restricción de aproximadamente un 70% de su ingesta normal.

Cuando los animales comenzaron a mostrar preferencia por una pata en el momento de realizar la tarea, se cuantificaron sus puntuaciones (% de éxito). Después de 20 sesiones de entrenamiento, el % de éxito preoperatorio se definió según la mejor puntuación obtenida entre los 3 últimos días de entrenamiento, previo a la LME. Después de la última sesión del entrenamiento, los animales estuvieron 3 días sin restricción calórica para aumentar su peso corporal y soportar mejor la cirugía. Los animales se recuperaron aproximadamente 3 días después de la intervención. En ese momento comenzó de nuevo la evaluación motora mediante el R&G a la par que la rehabilitación. Se presentó a cada animal 40 pellet/día, 5 días a la semana y se evaluó el % de éxito de cada animal/día.

### **3.2.3 Especificidad de la rehabilitación. Ratas Long Evans**

El entrenamiento en el último experimento, a pesar de que también se realizó en ratas, se le aplicaron las modificaciones pertinentes con tal de evitar problemas detectados en los experimentos anteriores. De esta forma, los primeros estadios del entrenamiento en cuanto a habituación de los animales al entrenador, a la comida y a la caja de entrenamiento se mantienen como en el Experimento 2. Este entrenamiento cuenta con una caja de metacrilato transparente con una abertura vertical central y una plataforma rotatoria que facilita el entrenamiento al mantener su atención en las primeras fases gracias a que los pellets se presentan de forma más rápida ( $\varnothing = 13,5\text{cm}$  con 40 agujeros de  $\varnothing = 4\text{mm}$ ). Para que los animales retomaran su posición inicial entre intentos, el entrenador soplaba ligeramente cerca de su hocico provocando una pequeña retracción del animal. Poco a poco, los animales asociaron este movimiento entre intentos. Cuando mostraron preferencia por una pata en concreto, se cambió la caja de entrenamiento a otra caja que poseía la

ventana frontal lateralizada junto a las paredes, forzando físicamente al animal a coger el pellet únicamente con su pata preferente (adaptación del diseño de Chia-Chien Chen (137)), eliminando el problema que surgió en el experimento 2. Esta caja era más estrecha para evitar un posicionamiento ladeado del animal con respecto a la ventana. La posición determina el estado de activación medular y era necesario mantener su perpendicularidad con respecto a la ventana frontal. Cuando sus puntuaciones alcanzaron un *plateau*, se cuantificaron sus intentos posicionando los pellets en una plataforma fija, presentados con unas pinzas por el experimentador, escogiendo la mejor sesión de las 3 últimas (% éxito y % de errores).

### 3.3 Cuantificación R&G

Para caracterizar el desempeño en la tarea de Reaching & Grasping se decidió evaluar los siguientes indicadores claves de rendimiento (también llamados key performance indicators, KPIs):

#### 3.3.1 Porcentaje de éxito y número de intentos

El porcentaje de éxito es una puntuación que se utiliza comúnmente en la tarea de R&G y su valor se obtiene de la relación entre el número de pellets comidos y el número de pellets presentados. En esta tesis se considera el porcentaje de éxito la relación entre el número de pellets comidos y el número de intentos de alcanzar el pellet. Se ha considerado de esta forma debido a que un animal puede hacer más de un intento ante un único pellet presentado y este fallo es necesariamente frecuente en el contexto de la LME. Se ha contabilizado un intento cada vez que el animal levanta una extremidad delantera ante la ventana manteniendo las otras tres en el suelo. Para determinar este valor, las sesiones de R&G se grabaron en video a 120 frames/s (cámara de video GoPro-7). El número de intentos que se permitió realizar a cada animal se mantuvo constante cuando el R&G se realizaba como prueba de destreza manual y fue variable cuando el R&G se realizaba como tarea rehabilitadora (ver más abajo).



### 3.3.2 Distribución de errores en los intentos fallidos

En el contexto de la lesión y rehabilitación resulta tan relevante evaluar la tasa de éxito como describir con precisión los defectos funcionales. En este trabajo esto ha sido posible gracias a trabajar con el concepto de *intentos* descrito en la sección anterior. En cada una de las sesiones de R&G, los intentos fallidos fueron cuantificados y categorizados en diferentes tipos de errores cometidos. Se asignó a cada categoría un valor numérico creciente con el progreso alcanzado en la secuencia de movimientos característicos del R&G. Las categorías consideradas fueron las siguientes:

- Error tipo 1 - fallo en la elevación: la pata se levanta, pero no llega al nivel de la ventana.
- Error tipo 2 - fallo en la extensión: la pata se levanta y llega al nivel de la ventana, pero el avance no es suficiente para alcanzar el pellet.
- Error tipo 3 - fallo grave de precisión: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, pero el movimiento alcanza un punto diferente del pellet.
- Error tipo 4 - fallo leve de precisión: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, la mano toca el pellet, pero lo desplaza fuera de la plataforma.
- Error de tipo 5 - fallo en el agarre: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, el animal agarra el pellet, pero se le cae en los movimientos posteriores.

En este estudio esta clasificación se ha empleado de dos maneras: (I) detallando el número de intentos asignados a cada tipo de error y (II) como indicador resumido, expresando el porcentaje de cada tipo de error sobre el total de errores cometidos (intentos fallidos, es decir sin tener en cuenta los éxitos).



**Figura 7.** Movimiento de R&G y sus errores. Fotogramas representativos de los diferentes gestos del movimiento de R&G. La primera fila representa el movimiento completo de R&G sin ninguna lesión; la segunda fila muestra el movimiento ejecutado con éxito después de la lesión en el que se ve como se ayuda con la pata contralateral; la tercera, cuarta y quinta fila muestran los errores de tipo 5, 4 y 3 respectivamente.

### 3.3.3 Escala de clasificación del movimiento Whishaw.

En el Estudio 1.2 los intentos exitosos registrados en las sesiones de prueba preoperatoria y 8 meses después de la lesión se analizaron para calificar los gestos R&G (109). Para cada rata, los intentos exitosos se calificaron según las características cualitativas del movimiento. Se dio una puntuación de "0" si el movimiento se realizó normalmente, una puntuación de "1" si el movimiento era anormal y una puntuación de "0,5" en los casos en que existía alguna ambigüedad con respecto a la normalidad del movimiento. Se clasificaron once componentes del movimientos de un intento de R&G: 1) Orientación: el

uso de la nariz de rata localiza y se fija en el pellet y generalmente completa el movimiento oliendo la comida, 2) Elevación: la extremidad se levanta del suelo con la parte superior del brazo y los dedos se balancean hacia la línea media del cuerpo, 3) Dígitos cerrados: a medida que se levanta la extremidad, la mano toma una posición recogida en la que los dedos se semiflexionan y la mano se supina de modo que la palma mire hacia la línea media del cuerpo, 4) Objetivo: utilizando la parte superior del brazo, el codo se aduce de modo que el antebrazo quede alineado a lo largo de la línea media del cuerpo con la mano ubicada justo debajo de la boca. Este movimiento implica la fijación de la porción distal de la extremidad para que los dedos permanezcan alineados con la línea media del cuerpo. Es probable que esto se produzca por un movimiento alrededor del codo que invierte la dirección del movimiento de la mano para compensar la abducción del codo, 5) Avance: la cabeza se levanta y la extremidad avanza directamente hacia adelante, por encima y más allá de la comida. pellet, 6) Dígitos abiertos: a medida que avanza la extremidad, los dedos se extienden y se abren levemente, 7) Pronación: mediante un movimiento de la parte superior del brazo, se abduce el codo, pronando la mano sobre la comida. La pronación completa de la mano sobre el alimento se facilita mediante una rotación de la mano alrededor de la muñeca y la apertura de los dedos, 8) Agarre: cuando las yemas de la palma tocan el alimento, el alimento se agarra mediante el cierre de los dedos. Esto ocurre típicamente como un movimiento independiente antes de retirar la mano. 9) Supinación 1: cuando se retira la extremidad, la mano se flexiona dorsalmente y se supina 90° mediante un movimiento alrededor de la muñeca y la aducción del codo. Estos movimientos pueden ocurrir tan pronto como se agarra la comida y se completan cuando se retira la mano de la ventana, 10) Supinación 2: cuando la rata se sienta con la comida en la mano, la mano se supina 90° más para presentar la comida a la boca, 11) Liberación de comida: los dedos se abren y la comida se transfiere a la boca. La comida se suele agarrar con los dientes o la lengua.

#### Adaptación de la escala de clasificación del movimiento Whishaw

Con el objetivo de realizar una cuantificación apropiada a las modificaciones de la tarea de R&G que se ajustaron para el Capítulo 3, se adaptó la escala de clasificación de Whishaw

manteniendo los 11 gestos puntuables con una división de cada uno más exhaustiva y que se ajustaba mejor al movimiento realizado desde la ventana lateral, que se resumen en la siguiente tabla:

### **Adaptación de la escala de Whishaw**

<b>1. Orientación</b>	La cabeza está orientada a la ventana Olfateo del pellet
<b>2. Elevación de la pata</b>	El peso corporal se cambia a la parte trasera Las dos patas delanteras están perpendiculares a los hombros
<b>3. Posición de los dedos</b>	La palma de la mano está en posición semi-supinada Los dedos están semi-flexionados
<b>4. Objetivo</b>	El codo se alinea con la mano y con la ventana La palma de la mano está en el centro de la ventana
<b>5. Avance</b>	La mano va directa al pellet La dirección del avance es recta
<b>6. Apertura digital</b>	Los dedos se abren La mano está semi-pronada
<b>7. Pronación</b>	La palma está hacia abajo en posición “arpeggio” El pellet está posicionado en el centro de la palma
<b>8. Agarre</b>	Los dedos se cierran La mano se eleva de la plataforma con el pellet cogido
<b>9. Supinación I</b>	La mano se retrae hacia adentro de la ventana La mano rota 90° antes de atravesar la ventana
<b>10. Supinación II</b>	La mano se dirige hacia la boca La mano rota ligeramente para colocar el pellet en la boca
<b>11. Liberación del pellet</b>	La mano posiciona el pellet en la boca Levanta la otra pata para ayudarse

Tabla 2: Adaptación de la escala de Whishaw a la tarea de R&G en la caja con la ventana lateralizada del Experimento 3: Especificidad de la rehabilitación.

### 3.4 Cuantificación locomoción

Los axones reticuloespinales conducen información descendente que controla los circuitos espinales de locomoción y corren en los funículos lateral y ventral de la médula espinal (Steeves y Jordan, 1980; Le ray et al., 2011). Bajo la premisa de que las lesiones con un mayor desplazamiento de tejido dañarían adicionalmente la mayor parte de la zona ventral de la médula espinal y, en consecuencia, afectarían a la locomoción (Noga et al., 1991; Loy et al., 2002), se examinaron las capacidades de locomoción terrestre del animal mediante el análisis de la locomoción tras 8 meses de la LME. En el Experimento 2, la locomoción sobre el suelo se analizó entintando las patas delanteras y traseras con diferentes colores y se registraron mientras las ratas caminaban por un túnel con un papel en el suelo (10 cm de ancho y 100 cm de largo). Las huellas de las patas delanteras se utilizaron para determinar el apoyo del peso corporal del animal. La longitud de la zancada se midió entre las almohadillas centrales de dos impresiones consecutivas en cada lado, y la base del soporte corporal (BS) se midió como la distancia de núcleo a núcleo de la impresión que representa por las almohadillas centrales. Para evaluar la coordinación de las extremidades, se contó el número de huellas de las patas delanteras y traseras y se midió la distancia entre las almohadillas centrales de las patas delanteras y traseras de cada lado. Para evaluar la capacidad del animal para extender los dedos, se midió la distancia entre el segundo y el cuarto dígitos de la pata delantera derecha e izquierda (138).

### 3.5 Evaluación de la apertura digital durante la locomoción.

En el Experimento 4, se analizó la apertura digital de las patas delanteras durante la locomoción debido a que este fue el único parámetro variable después de la LME que se realizó en el Experimento 2: Rehabilitación a largo plazo. Las ratas se colocaron en un pasillo (10 cm de ancho y 100 cm de largo), con el suelo transparente y una cámara de video en la parte inferior que grabó los pasos desde abajo (cámara GoPro 7, 120fps). Se cuantificó la distancia entre los dígitos 2 a 3, 3 a 4 y 4 a 5 a partir de los fotogramas de los videos (Figura 8). Las estadísticas se realizaron con las medidas de 3 pisadas diferentes de cada animal y de cada pata el día 91 postoperatorio.



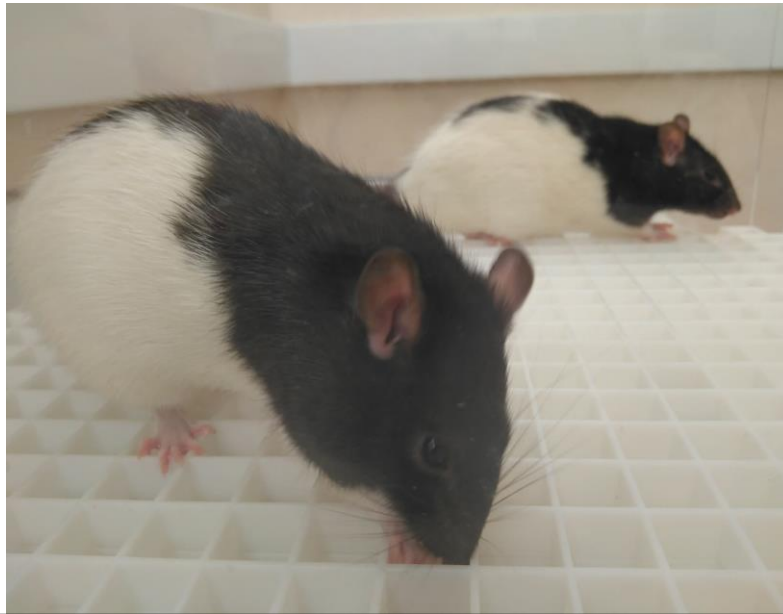
**Figura 8.** Apertura digital: rata Long Evans 91 DPO pasando por un pasillo de evaluación locomotora.

## 4 Tareas de rehabilitación

### 4.1 Pipas en la gradilla. Rata Long Evans

Esta rehabilitación está basada en el estudio de rehabilitación realizado por García-Alfás et al. (67). Los animales fueron expuestos por primera vez a la tarea una semana después de la lesión. Consiste en introducir a los animales en grupos de 2-3 ratas en una caja que tiene una rejilla de plástico en el suelo con aberturas cuadradas de 1,7 cm de ancho y 1,2 cm de alto durante 1 h / día, 5 días / semana (Figura 9). Las semillas de girasol o pipas se colocaron en las aberturas cuadradas para que las ratas tuvieran que coger las semillas extendiendo sus patas y agarrándolas. De forma natural las ratas manipulan las pipas para pelarlas antes de comérselas. El número de pipas consumidas por rata se cuantificó en la

primera sesión de rehabilitación y cada 2 meses. Las ratas del grupo control que no recibieron ningún régimen de rehabilitación se colocaron en una jaula vacía, sin rejilla ni semillas, durante la misma cantidad de tiempo. El grupo de No Rehab fue manipulado (llevar su jaula al laboratorio, coger e interactuar con los animales) durante el mismo tiempo (1h/día, 5 días/semana) pero sin ser expuesto a la rehabilitación. Se mantuvo en su caja de estabulación ya que tiene las mismas dimensiones que la caja de rehabilitación. Además, el hecho de tener que caminar por la gradilla ya podría suponer un ejercicio en el que la rata tuviera que adaptar sus dedos para caminar por ella, ejerciendo un efecto

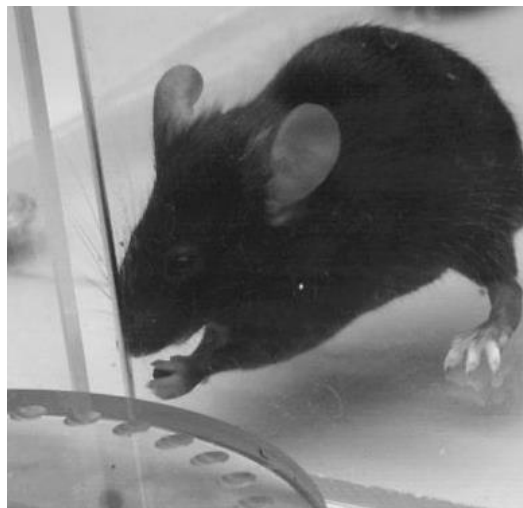


**Figura 9:** Rehabilitación de R&G mediante la técnica de las pipas en la gradilla. La imagen muestra dos animales representativos que realizaron la rehabilitación de alcanzar y agarrar las pipas; los animales se colocaron dentro de una caja con una rejilla de plástico en el suelo que contenía semillas de girasol (pipas), los animales tenían que extender su miembro superior a través de la rejilla y agarrar la semilla con la mano. Una vez sujeta, la semilla era manipulada con los dedos al retirar la cáscara con la ayuda de la boca, antes de comerse la pipa.

rehabilitador.

## 4.2 Reaching & Grasping. Ratones

En este experimento, se pretendió observar los efectos de la especificidad de la tarea rehabilitadora en el momento de recuperar la destreza manual perdida tras la lesión medular. Por lo que la tarea rehabilitadora era a su vez la tarea que evaluaba la recuperación de la disfunción manual (Figura 10). Para ello se utilizó la misma caja de entrenamiento y el disco con 40 hendiduras que permitía presentar los pellets de forma rápida. 3 días después de la lesión, los animales fueron nuevamente testados y comenzaron con el programa de rehabilitación diario (5 días a la semana) que consistía en presentarles 40 pellets, lo que equivale a 40 intentos de R&G al día durante 28 días.



**Figura 10: Ratón haciendo rla tarea de R&G.** Se sitúa en la caja de metacrilato con la ventana frontal y el disco rotatorio que presenta hasta 40 pellets individualmente.

## 4.3 Rehabilitación de Reaching & Grasping, Staircase y Cheerios

Uno de los objetivos de esta tesis es implementar y caracterizar tres modelos de rehabilitación de la función manual tras la lesión medular, y comparar después sus efectos en la recuperación de la tarea de R&G. Los modelos de rehabilitación seleccionados para la comparación fueron Reaching & Grasping, Staircase y Manipulación de cereales (Cheerios) y se describen a continuación.

### 4.3.1 Reaching & Grasping

La rehabilitación de R&G en el Estudio 3 para uno de los grupos de rehabilitación incluyó 1 grupo de 6 animales. Para ello, se construyó un dispensador automático de pellets para facilitar la rehabilitación al experimentador. La construcción del mismo se basó en un modelo previamente establecido (114) con ligeras adaptaciones (Anexo 1). Los pellets que



se utilizaron inicialmente fueron pellets de precisión (Dustless Precision Pellets<sup>®</sup>, 45 mg, Rodent Purified Diet, # F0021, BioServ), pero debido al alto grado de humedad existente en el estabulario, los pellets se desmenuzaban y obstruían el dispensador. Tras observar sus características nutricionales, se cambió el tipo de pellets por otros que tenían un menor contenido lipídico (Dustless Precision Pellets<sup>®</sup>, 45 mg, Banana Flavor, Sucrose, # F0024, BioServ), reduciendo de esta forma su capacidad higroscópica y, consecuentemente, su rápida disgregación. De esta forma se consiguió eliminar el problema.

Para la tarea rehabilitadora también se diseñó una caja de metacrilato específica. Esta caja constaba de una parte trasera más amplia que se estrechaba hacia el frente para mantener la posición perpendicular del animal con respecto a la ventana. La zona frontal constaba de dos ventanas lateralizadas que obligaban físicamente al animal a coger los pellets con su pata preferente ya que los pellets únicamente se presentaban en la ventana de su pata preferente. La construcción se componía de dos cajas gemelas que podían albergar a 2 animales realizando la tarea individualmente, hecho que agilizaba la rehabilitación para la experimentadora.

Los animales fueron expuestos por primera vez a esta caja después de la lesión, de tal forma que este grupo de rehabilitación al igual que los demás no cuenta con la previa familiarización de la caja ni del dispensador. El entrenamiento tenía una duración de 20 minutos en los que se presentaban aproximadamente 150 pellets, de lunes a viernes en la franja horaria que comprende desde las 15:00 – 19:00 h, durante 3 meses.

#### **4.3.2 Staircase**

Este ejercicio se describió anteriormente como entrenamiento de la destreza manual (111). En él los animales tienen que coger pellets de precisión colocados en los escalones de dos escaleras separadas por una pared. El animal debe situar su cuerpo encima de la pared para poder acceder a las escaleras, por lo que solamente puede emplear una pata para cada escalera. Para coger un pellet, el roedor se tiene que situar encima de la pared, extender el brazo hacia el escalón, abrir los dígitos de la mano, cerrarlos agarrando un pellet, retraer el brazo para llevar la comida a la boca y abrir los dedos para soltar el pellet. Para aplicar esta

tarea como rehabilitación se construyeron cajas individuales de metacrilato en las que se rellenó de pellets únicamente las escaleras del lado de la pata lesionada (la preferente) de cada animal. Cada uno de los escalones se rellenó con 2 pellets de precisión (Dustless Precision Pellets®, 45 mg, Banana Flavor, Sucrose, # F0024, BioServ). Los escalones se fueron rellenando a medida que los animales cogían todos los pellets que eran capaces, durante 20 minutos.

Para cuantificar el desempeño en esta tarea se determinaron los siguientes KPIs: (I) la intensidad expresada en número de intentos por minuto, considerando un intento cada movimiento de extensión y retracción del brazo independientemente si agarra el pellet o no (II) el porcentaje de éxito entendido como el número de pellets agarrados sobre el número total de intentos, (III) el escalón más bajo (más difícil) alcanzado y (IV) la distribución de

En cada una de las sesiones de R&G, los intentos fallidos fueron cuantificados y categorizados en diferentes tipos de errores cometidos. Se asignó a cada categoría un valor numérico creciente con el progreso alcanzado en la secuencia de movimientos característicos del R&G. Las categorías consideradas fueron las siguientes:

- Error tipo 1 - fallo en la elevación: la pata se levanta, pero no llega al nivel de la ventana.
- Error tipo 2 - fallo en la extensión: la pata se levanta y llega al nivel de la ventana, pero el avance no es suficiente para alcanzar el pellet.
- Error tipo 3 - fallo grave de precisión: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, pero el movimiento alcanza un punto diferente del pellet.
- Error tipo 4 - fallo leve de precisión: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, la mano toca el pellet, pero lo desplaza fuera de la plataforma.
- Error de tipo 5 - fallo en el agarre: la pata se levanta y se extiende a través de la ventana, el animal agarra el pellet, pero se le cae en los movimientos posteriores.

En este estudio esta clasificación se ha empleado de dos maneras: (I) detallando el número de intentos asignados a cada tipo de error y (II) como indicador resumido, expresando el

porcentaje de cada tipo de error sobre el total de errores cometidos (intentos fallidos, es decir sin tener en cuenta los éxitos).

### **4.3.3 Manipulación de cereales (Cheerios). Rata Long Evans**

Este ejercicio se describió anteriormente como el movimiento analizado en el método IBB (ver en el apartado 3.1). En esta tarea el animal tiene que sostener y manipular un cereal para comérselo. Los cereales están situados en el suelo, por lo que los coge con la boca y los agarra con la mano. Puesto que los cereales que manipulaban eran de la marca comercial Cheerio's y para abreviar, al grupo que recibió esta rehabilitación se le nombró "Rehabilitación de Cheerios". Esta rehabilitación consistió en introducir a los animales en grupos de 2 individuos en una caja de metracrilato con 30 cereales (15 cereales para cada individuo), con un límite de tiempo de 20 minutos.

La cuantificación de esta rehabilitación también se realizó a los 10, 42 y 91 DPO. Cada sesión de cuantificación de la rehabilitación se grabó con una cámara (GoPro 7, 120fps) que sirvió para calcular el nº total de cereales que comían, el tiempo empleado y el número de flexiones y extensiones que realizaban con el codo de cada una de sus patas (lesionada y no lesionada).

### **4.3.4 Estandarización de la rehabilitación**

Para poder comparar los tres modelos de rehabilitación (R&G, Staircase y Cheerios) se utilizó un mismo modelo de lesión y se intentó estandarizar la cantidad de rehabilitación aplicada empleando como base datos previos de nuestro laboratorio. Los datos previamente mencionados indican que un animal sano es capaz de realizar el movimiento de R&G durante 23 minutos seguidos ejecutando el movimiento en 147 ocasiones (intentos) con un 81 % de éxito (Fig X.A). Teniendo en cuenta que la rehabilitación de R&G pasaría a

realizarse con un dispensador automático en lugar de una presentación de pellet manual, estandarizamos que la tarea rehabilitadora tendría una intensidad de  $\approx 150$  intentos en 20 minutos, es decir 7,5 intentos/minuto (repeticiones de la activación del patrón neuromotor). Por ello el resto de las tareas rehabilitadoras se diseñaron para mantener en lo posible esta cantidad total de movimientos.

La rehabilitación de Staircase es muy similar en su secuencia de movimientos a la tarea de R&G, por lo que se asumió que su intensidad es equivalente, y se dio a los animales el mismo tiempo para realizar la tarea (20 minutos).

En cuanto a la rehabilitación mediante manipulación de cereales (Cheerios), en otro estudio previo del grupo, se determinó que los animales realizaban un promedio de 10 flexiones y extensiones del codo por cada cereal que se comían. Por esto en el presente trabajo se llevó a cabo esta rehabilitación con 15 cereales, estandarizando el número total de movimientos ejecutados ( $15 \text{ cereales} \times 10 \text{ flexiones/extensiones del codo} = 150 \text{ movimientos}$ ).

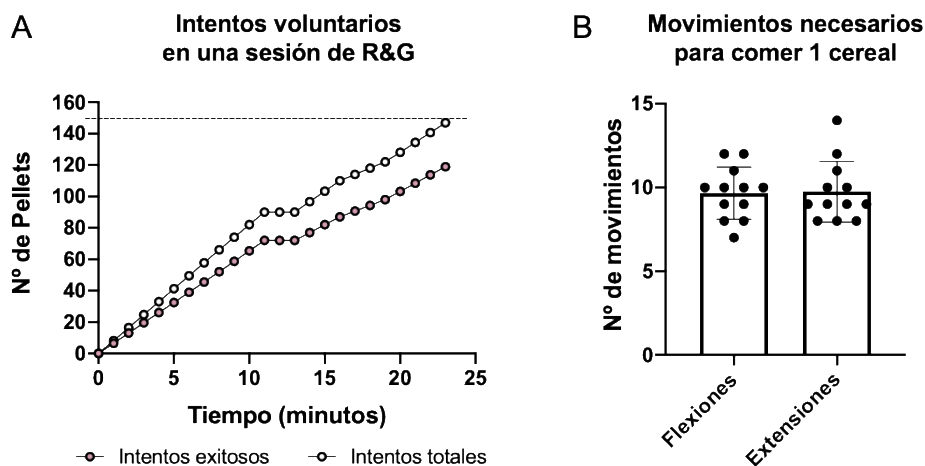
La dieta de los diferentes grupos se homogeneizó. Cada animal recibió diariamente: 1,5 pellets de pienso,  $\approx 40$  pellets de precisión y 15 cereales. Se evitó que el consumo de la dieta constituyese en sí mismo una tarea rehabilitadora minimizando la manipulación de los alimentos mediante la siguiente estrategia:

El alimento empleado en la rehabilitación se presentó a los animales únicamente durante las sesiones de rehabilitación.

Los alimentos no empleados en la rehabilitación se presentaron a los animales directamente en sus jaulas de estabulación forma que se minimizase su manipulación. En concreto, a los grupos de R&G, Staircase, No Rehab y CNT se les proporcionaron los 15 cereales/rata triturados directamente en su jaula y a los grupos de Cheerios, No Rehab y CNT se les proporcionaron pellets de precisión en su jaula.

La cuantificación del rendimiento en las tareas rehabilitadoras se realizó a los 10, 42 y 91 DPO, siendo este el punto final. Aunque la rehabilitación comenzó a los 7 DPO, no se empezó a cuantificar el rendimiento en la tarea rehabilitadora hasta los 10 DPO para eliminar el efecto en el rendimiento de acometer una tarea totalmente nueva en un entorno desconocido y medir únicamente el rendimiento intrínseco del animal. Para llevar a cabo esta cuantificación se grabaron las sesiones de rehabilitación con una cámara (GoPro 7,

120fps) y posteriormente se emplearon las grabaciones para determinar los indicadores claves de rendimiento (también llamados *key performance indicators*, KPIs) que se definieron para cada tarea rehabilitadora (ver sección de Resultados).



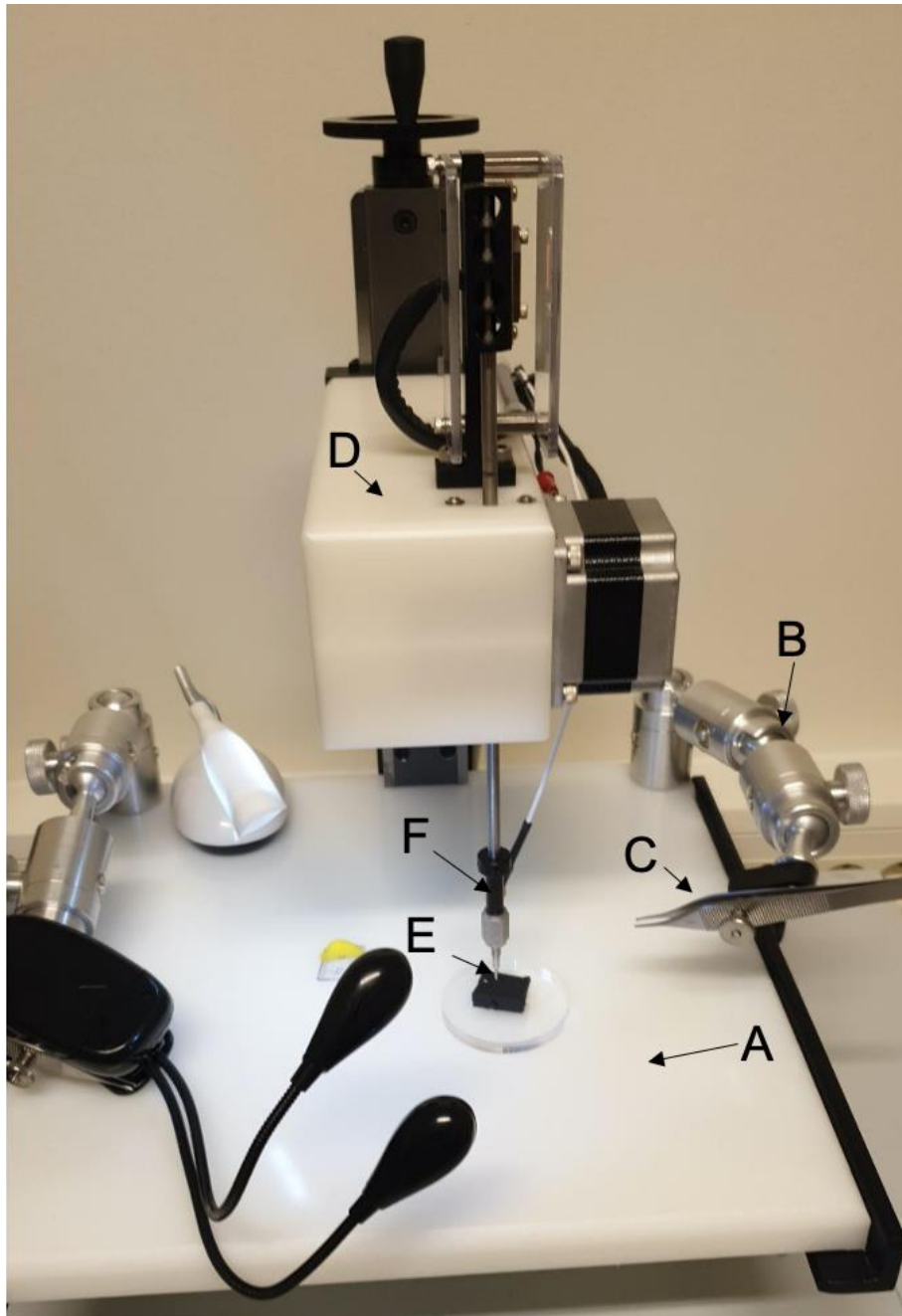
**Figura 11: Resultados de estudios previos.** (A) Intentos voluntarios en una sesión de R&G que se realizaron para observar el nivel máximo de la intensidad de la tarea que los animales pueden llegar a hacer de forma voluntaria. Durante una sesión de R&G un animal fue capaz de realizar durante 23 minutos 147 intentos (puntos blancos) de los cuales 119 fueron exitosos (puntos rosas). (B) Un promedio de 10 movimientos de la articulación del codo (flexiones y extensiones) fueron necesarios para comerse 1 cereal.

## 5 Lesión de médula espinal

### 5.1 Lesión de médula espinal cervical. Ratas

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de 90 mg / kg de ketamina (Imalgene, Merial) y xilazina 10 mg / kg (Rompun, Bayer) y recibieron una primera dosis de buprenorfina de 0,05 mg / kg (Buprex, INDIVIOR) preoperatoriamente, ambos fármacos se administraron IP utilizando una aguja de 30G. En algunos animales se administró una dosis extra durante la cirugía, ketamina (30 mg / kg) y xilacina (3,3 mg / kg).

Cuando el animal estuvo completamente anestesiado, se le afeitó el lomo y se desinfectó con un 70% de etanol y betadine. Para evitar que los ojos se resequen, se aplicó pomada oftálmica Lipolac (2 mg / g, Bauch Lomb) en cuanto se durmió y siempre que fue necesario durante todo el proceso. Durante la cirugía, los animales se mantuvieron sobre una alfombra térmica (34-36 ° C) para prevenir la hipotermia. La respiración del animal, los movimientos de los bigotes, la retracción y el reflejo corneal se revisaron durante la cirugía. Para facilitar la exposición de la médula espinal cervical dorsal, se colocó una almohada hecha a mano de plastilina en un guante de látex, debajo del pecho del animal que estaba en posición prono. La incisión cutánea vertical de C1 a T4 se realizó con un bisturí, las capas de los músculos de la espalda (clavotrapezius, acromiotrapezius y romboideus) se separaron con tijeras romas, se cortaron a lo largo de la línea media y se sujetaron con retractores. Se extrajo la última capa de músculo esquelético y tejido conjuntivo intervertebral de C3 a C6, con tijeras de muelle, y luego se realizó una laminectomía de la vértebra C4 y laminectomía parcial de C5 con pinzas gubias. Las apófisis espinales de C2 y T2 fueron expuestas y pinzadas para mantener la médula recta sin movimiento respiratorio. La punta del impactador ( $\varnothing = 2$  mm) se ubicó 5 mm por encima de la médula, evitando las aferencias sensoriales entre el segmento espinal C4-5, en el lado de la pata de preferencia. Se realizó una contusión unilateral moderada de la médula espinal con el dispositivo Infinite Horizon (Precision Scientific Instrumentation, Fairfax, VA) (Figura x). Después de la contusión, un hematoma visible confirmó el impacto. Se utilizaron suturas absorbibles (poliglactina 5-0, Johnson & Johnson International) para los músculos, suturas no absorbibles (poliamida 6 Ethilon \* 4-0, Ethicon) para la piel y se aplicó betadine en la cicatriz.



**Figura 12. Dispositivo Horizon Impactor.** Instrumento de contusión diseñado específicamente para la investigación que proporciona una herramienta para evaluar la causa y el alcance de las lesiones en las estructuras de la médula espinal. La parte mecánica se compone fundamentalmente de una base para posar al animal (A), 2 brazos articulados (B) unidos a pinzas (C) para inmovilizar y eliminar el artefacto que puede causar el movimiento de la respiración, un motor controlado por ordenador (D) que controla el impacto que debe ejercer el émbolo (E) y recibe información desde el sensor de fuerza (E) monitorizando los parámetros de la contusión.

En el proceso post-operatorio, los animales se colocaron gentilmente en una caja de alojamiento reemplazando el serrín por papel como lecho. Recomendamos encarecidamente esta práctica porque la tendencia de las ratas a comer el serrín después de esta lesión, por razones desconocidas, puede causar la muerte por asfixia del animal. La caja de alojamiento se mantuvo a temperatura cálida hasta que los animales recuperaron su capacidad para moverse. En ese momento, se les retiró con una gasa la pomada oftálmica aplicada en exceso. Para prevenir la deshidratación, los animales recibieron 5 ml de suero glucosado (Glucosada Grifols 5%, Lab Grifols) al día durante 3 días por vía subcutánea con una aguja 26G. La segunda dosis de buprenorfina se administró 8 horas después de la primera dosis y tres veces al día cada 8 horas durante los siguientes 3 días, como mínimo. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales durante una semana para garantizar que no se quitaran las suturas unas a otras.

## 5.2 Lesión de médula espinal cervical. Ratones

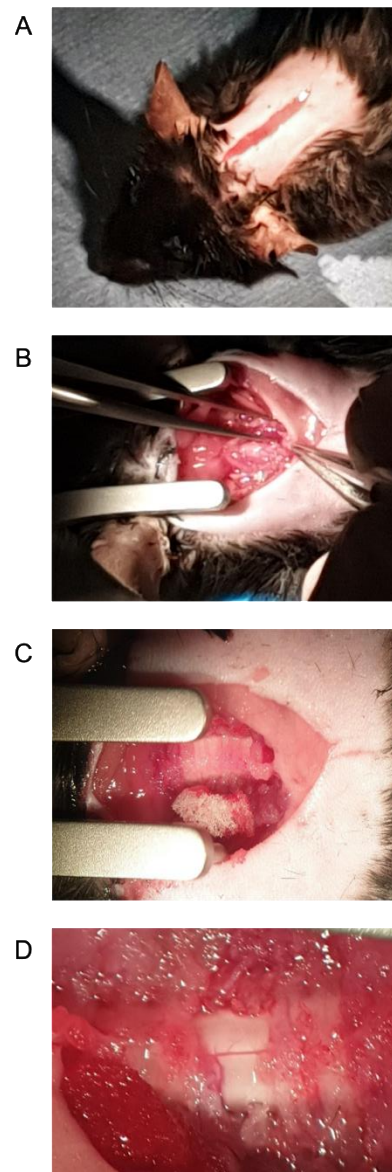
En el proceso quirúrgico (Figura 12), los animales fueron anestesiados con una mezcla de 90 mg/Kg de ketamina (Imalgene, Merial), xilazina 10 mg/Kg (Ronpum, BAYER) y suero fisiológico (NaCl 0,9M, 50% en volumen, Apotek), de forma intramuscular en la pata trasera. En algunos animales se administró una dosis extra durante la cirugía, ketamina (30 mg / kg) y xilacina (3,3 mg / kg). Tras la anestesia se les inyectó buprenorfina como analgesia (3mg/kg, Temgesic, Schering-plough).



Cuando el animal estuvo completamente anestesiado, se le recortó el pelo del lomo con unas tijeras, se afeitó con crema depilatoria (Vett), se limpió con suero fisiológico y se desinfectó la piel con clorhexidina. Para evitar que los ojos se resequen, se aplicó pomada oftálmica (Simplex) en cuanto se durmió y siempre que fue necesario durante todo el proceso quirúrgico. Durante la cirugía, los animales se mantuvieron sobre una alfombra térmica (26-28° C) para prevenir la hipotermia. La respiración del animal, los movimientos de los bigotes, la retracción y el reflejo corneal se revisaron durante la cirugía.

Para facilitar la exposición de la médula espinal cervical dorsal, se colocó una almohada hecha a mano de plastilina debajo del pecho del animal que estaba en posición prono. La incisión cutánea vertical de C1 a T2 se realizó con un bisturí (Figura 12.A), las capas de los músculos de la espalda se separaron con tijeras romas, se cortaron a lo largo de la línea media y se sujetaron con retractores (Figura 12.B). Se extrajo la última capa de músculo esquelético y tejido conjuntivo intervertebral de C3 a C6 (Figura 12.C), con esponjas quirúrgicas y tijeras de muelle, y luego se realizó una laminectomía de la vértebra C4 y parte de C5 con pinzas del n° 5 (Figura 12.D). La apófisis espinal de T2 fue expuesta y pinzada para mantener la médula recta sin el artefacto del movimiento respiratorio. La punta del impactador ( $\varnothing =$

1,3 mm) se ubicó 5 mm por encima de la médula en el segmento espinal de C5 en el lado de la pata de preferencia. Se realizó una contusión unilateral moderada de la médula espinal con el dispositivo Infinite Horizon (sistema e instrumentación de precisión). Después de la contusión un hematoma visible confirmó el impacto. Se utilizaron suturas absorbibles



**Figura 12: Pasos de la cirugía de LME.** (A) incisión primaria en la piel, (B) retracción de los músculos escapulares, (C) exposición de la columna – se observa la columna y un trozo de esponja absorbente, y (D) médula espinal expuesta tras la laminectomía.

(poliglactina 6-0, Johnson & Johnson International) para los músculos, suturas no absorbibles (poliamida 6 Ethilon \* 5-0, Ethicon) para la piel y se aplicó clorhexidina en la cicatriz. Una vez suturados, a los animales se les inyectó una mezcla de fármacos que revertían el efecto anestésico, despertándolos de forma casi inmediata (Flumazenil 0.2 mg/Kg, Revazol 0,75mg/Kg y Naloxone 0.12 mg/Kg).

En el proceso postoperatorio, los animales se colocaron gentilmente en una caja de alojamiento reemplazando el serrín por papel como lecho. La caja de alojamiento se mantuvo a temperatura cálida hasta que los animales recuperaron su capacidad para moverse. En ese momento, se les retiró con una gasa la pomada oftálmica aplicada en exceso. Para prevenir la deshidratación, los animales recibieron 200µl de suero glucosado (Suero fisiológico + glucosa 5%) al día durante 3 días por vía subcutánea. La segunda dosis de analgesia se administró 8 horas después de la primera dosis y tres veces al día cada 8 horas durante los siguientes 3 días, el 4° y 5° día se administró 1 vez al día. Se aplicó antibiótico en crema para acelerar el proceso de curación de la cicatriz (fucidin, Deutche pharma) una vez al día durante 5 días. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales durante una semana para garantizar que no se quitaran las suturas unas a otras.

## 6 Histología

Después de la evaluación, las ratas se perfundieron intracardialmente con paraformaldehído al 4% en solución tampón fosfato (PB) 0,1 M. Se extrajeron las médulas espinales 1 día después de su perfusión. El ganglio de la raíz dorsal de C2 se utilizó como punto de referencia para identificar los segmentos de la columna cervical. Se diseccionó un solo bloque de C2 a T2 y se almacenó en solución de sacarosa al 30% en PB durante 3 días. Los bloques fueron incrustados en medio de inclusión compuesto O.C.T. (Tissue-Tek) y congelado rápidamente. Se cortaron secciones transversales de 35 micrómetros de espesor con un criostato y se colocaron consecutivamente flotando libremente en placas de 96 pocillos en PB con azida sódica al 0,02% y se almacenaron a 4 ° C.

Se recolectaron las secciones almacenadas cada 350 micras y se tiñeron con violeta de cresilo para evaluar la preservación de la sustancia gris espinal y las neuronas motoras, esos mismos cortes se co-marcaron con la tinción de luxol fast blue que permite la detección de la sustancia blanca a lo largo de la médula espinal C2 a T2 (esta última tinción se empezó a

implementar a partir del 2º experimento). Las secciones se deshidrataron con etanol y se montaron con dextropropoxifeno. Se recogieron y procesaron otras dos series de cortes para inmunohistoquímica. Las secciones flotantes libres se lavaron en PB con Triton X-100 al 0,3%, BSA al 1% durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario anti-NeuN de ratón (1: 500, MAB377, Millipore), que detecta núcleos neuronales, o anti-PKC $\gamma$  de conejo (1: 500, sc -211, Santa Cruz, CA), para marcar el TCS, durante la noche a 4 ° C, con agitación. Después de varios lavados, las secciones se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a fluorocromo anti-ratón Alexa Fluor-488 o anti-conejo Alexa-594 (1: 500; Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavados adicionales, las secciones se tiñeron por contraste con DAPI y se montaron con medio mowiol sobre portaobjetos recubiertos de gelatina.

Las imágenes de campo claro y de fluorescencia de secciones de médula espinal en serie de C2 a T2 se capturaron con una cámara Olympus DP73 conectada a un microscopio Olympus BX51 y se analizaron utilizando el software Fiji ImageJ. Se utilizaron imágenes de tejido teñidas con Violeta de Cresilo y Luxol fast blue para trazar manualmente el perímetro de cada mitad medular ipsi y contra lesionada de cada sección espinal. Se midió el área circunscrita (correspondiente al tejido preservado de sustancia blanca y gris) y se calculó el porcentaje de tejido del lado dañado en relación con el lado no dañado. Las motoneuronas se identificaron en función de las características morfológicas y de ubicación (139) y se contaron manualmente las correspondientes a los lados lesionados y no lesionados dentro de cada sección. La cantidad de células NeuN positivas se cuantificó en los lados ipsi y contra lesionado mediante el uso de un complemento de recuento de partículas semiautomático hecho a medida, basado en la detección de la intensidad de la señal, y filtrado por tamaño de partícula y circularidad. Se tuvo especial cuidado en descartar pequeñas partículas circulares que mostraban altos niveles de autofluorescencia, probablemente correspondientes a células inflamatorias, que estaban particularmente presentes en el tejido perilesionado. Se calculó el porcentaje de recuentos de células NeuN + dentro del lado dañado frente al lado no dañado. Para cuantificar la preservación del TCS, el área que muestra una alta inmunorreactividad a PKC $\gamma$  localizada medialmente entre las

columnas dorsales y la materia gris se trazó y midió manualmente en secciones representativas de los niveles espinales C3, C5 y C8.

## 7 Análisis Estadístico

Se empleó la prueba t de Student de dos colas para analizar la variación el porcentaje de tejido preservado en el epicentro de la lesión (área total preservada, sustancia gris preservada y sustancia blanca preservada).

Se aplicó el análisis de varianza bidireccional de medidas repetidas (ANOVA) con los grupos de rehabilitación como factor común entre sujetos y la distancia al epicentro de la lesión dentro de cada sujeto para analizar la variación en tejido preservado, número de motoneuronas, Células NeuN + y área corticoespinal a lo largo del eje rostro-caudal.

Se aplicó el análisis de varianza bidireccional de medidas repetidas (ANOVA) para datos de comportamiento con los grupos de rehabilitación como factor común entre sujetos y DPO dentro de cada sujeto para datos de R&G, Staircase, Cheerios y No Rehab. Cuando no se observó ningún efecto o interacción con el factor GRUPO, se aplicó el análisis post-hoc de Dunnett para comparar los datos generales de Rehab y NoRehab con los niveles basales. La puntuación de un solo pellet de Whishaw se analizó mediante ANOVA de medidas repetidas de tres vías con GRUPO como factor entre sujetos, PUNTO DE TIEMPO y GESTO como factores intraindividuales. La locomoción se analizó mediante ANOVA de una o dos vías, con GROUP como entre sujetos y PAW como factor dentro de los sujetos. Posteriormente se aplicó el análisis post-hoc con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Cuando los datos no se ajustaban a la distribución normal, se aplicó el análisis de Friedman no paramétrico y se realizaron las posteriores comparaciones post-hoc de Dunn corregidas para múltiples medidas. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El nivel de significancia se fijó en  $p < 0,05$  en todos los casos.

## RESULTADOS

### 1 Evaluación de la rehabilitación en la recuperación de la destreza manual en ratas con contusión cervical

En el presente estudio se plantea la hipótesis de que, después de una contusión medular leve en la médula espinal cervical, los animales que realicen una rehabilitación especializada diaria de R&G mejorarán con el tiempo sus habilidades para usar su miembro afectado para alcanzar y agarrar pellets individuales. Para ello se diseñaron dos experimentos, el primero fue definir la contusión medular óptima para reducir la destreza manual en un grado recuperable, el segundo experimento fue para determinar el efecto de la rehabilitación después de la LME; el entrenamiento mediante el cuál se cuantificó el grado de disfunción manual se basó en el entrenamiento de R&G de un único pellet (109), mientras que la tarea de rehabilitación fue establecida a partir de la tarea definida por G. García-Álías (67). Con este segundo experimento se quiso analizar, además del % de éxito de la tarea, la ejecución de esta en el caso de los intentos fallidos.

#### 1.1 Determinación de los parámetros para infligir una LME que reduzca la destreza manual

Este experimento aborda los 2 primeros objetivos: comparar los déficits en la destreza manual producidos por contusiones medulares de diferentes severidades y localizaciones en ratas, y además, identificar la región del segmento medular que provoca una afectación en el control fino de las manos si se encuentra lesionado tras la contusión en el segmento medular de C5.

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva acerca de las LME cervicales que permitió diseñar un experimento optimizado para esta pregunta preliminar. Sobre la base de esta búsqueda, se decidió acotar el estudio a estos 2 parámetros: localización de la intervención e intensidad de la intervención. Como variables de resultado se registraron la severidad del daño tisular y la pérdida de funcionalidad en una prueba estandarizada.

## Localización de la intervención

La intumescencia cervical se sitúa entre C4 y T2, albergando las motoneuronas que controlan los músculos de las articulaciones superiores. Si las motoneuronas mueren en la lesión, el efector final del movimiento queda obsoleto, por lo que en este estudio se evita lesionar en los niveles medulares de C7 a T2, que es donde se sitúan las motoneuronas que controlan los músculos de la mano (140). Las LME experimentales en el nivel de C5 conllevan una reducción de la movilidad manual después de la lesión que puede recuperarse, en cierto grado, con el tiempo (104,141–145). Por ello, se optó por hacer las lesiones en este nivel medular.

Como ya se ha comentado, las LME por hemi-sección lateral o dorsal, provocan una pérdida de la funcionalidad muy severa (146,147). Por otra parte, las LME provocadas en el cuadrante dorsolateral y en el funículo dorsal resultan en una mayor movilidad de la pata; pero se ha observado un porcentaje de éxito mayor en las pruebas funcionales de animales con lesión en el funículo dorsal con respecto a los animales con lesión en la zona dorsolateral (G. García-Alías, resultados no publicados). Con esto en mente, se escogió el siguiente abanico de localizaciones de la intervención para evaluar la severidad de las lesiones resultantes: lesión central (C), lesión lateral (L) y lesión muy lateral (ML).

## Intensidad de la intervención

En los diferentes estudios que han empleado el método de LME por contusión en ratas en la región cervical se ha observado que la aplicación en el nivel medular de C5 con una fuerza de 200-225 causa déficits funcionales severos que permiten una recuperación espontánea muy limitada (143,144). Por otra parte, las lesiones con una intensidad de 50 kilodinas (KDynes) apenas provocan déficit funcional en los animales, que son capaces de recuperar la funcionalidad por completo de forma espontánea (148). Por ello, se decidió estudiar los resultados de las lesiones con tres niveles de intensidad de la contusión: 50KDynes, 100 KDynes y 150 KDynes.

## Severidad funcional de la lesión

Existen diferentes metodologías que permiten evaluar la severidad de las LME experimentales descritas en la introducción, se escogió el IBB (104) para cuantificar la funcionalidad de las extremidades superiores antes y después de la lesión medular. Esta escala es sencilla, informativa de la función manual, está estandarizada y no requiere de entrenamiento previo, lo que agiliza este proceso.

## Severidad histológica de la lesión

De los métodos más extendidos que existen para evaluar las afectaciones histológicas en la médula espinal se escogió la tinción de Violeta de Cresilo. Esta tinción marca los núcleos celulares permitiendo la diferenciación entre la sustancia blanca de la sustancia gris además de la identificación de motoneuronas por diferenciación de tamaño. La cavidad generada tras la lesión medular también puede observarse con esta tinción (142,145,149).

### 1.1.1 Estudio de las fuerzas de contusión

Una vez acotados los parámetros experimentales a sondear se realizó el procedimiento experimental que constó de dos ensayos con ratas (*Rattus norvegicus domestica*) hembra de la cepa Sprague-Dawley, en los cuales todas las puntuaciones preoperatorias en la escala IBB fueron de 9 (puntuación máxima). En el primero se probaron contusiones centralizadas de 50 y 100 KDynes. Para ello se emplearon 8 animales distribuidos de la siguiente forma: 1 animal control o *sham* (al que se le practica una cirugía placebo consistente en toda la operación excepto la contusión medular) y dos grupos problema de 3 y 4 animales que recibieron una contusión en la médula de 50 y 100 KDynes respectivamente. De los 7 animales que fueron lesionados, uno del grupo de 100 KDynes tuvo que ser descartado debido una contusión errónea.



A los 14 días postoperatorio (DPO) se cuantificó la severidad funcional de la lesión según la escala IBB, se sacrificó a los animales y se evaluó el daño tisular mediante la observación en cortes histológicos de la proporción de sustancia blanca y gris en la región afectada.

Los animales del grupo de 50 KDynes obtuvieron en todos los casos una puntuación de 9 en la escala IBB (no mostraron ningún déficit funcional). Del grupo de 100 KDynes solamente un animal mostró déficits comportamentales con una puntuación de 5 en la escala IBB mientras que los otros 2 animales no mostraron déficits funcionales apreciables con una puntuación de 9 en la escala IBB, resultando en una puntuación grupal de  $7,67 \pm 1,33$  (promedio $\pm$ SEM) (Figura 13.A).

La histología de los animales sham (Figura 13.C) no mostró diferencias apreciables con respecto a los animales lesionados con 50 KDynes (Figura 13.D). Sin embargo, los animales que recibieron una contusión de 100 KDynes tuvieron una preservación promedio de la sustancia blanca de un  $81,43 \pm 1,75$  % (Figura 13.B), con la mayor pérdida de tejido localizada principalmente en el funículo dorsal (Figura 13.E).

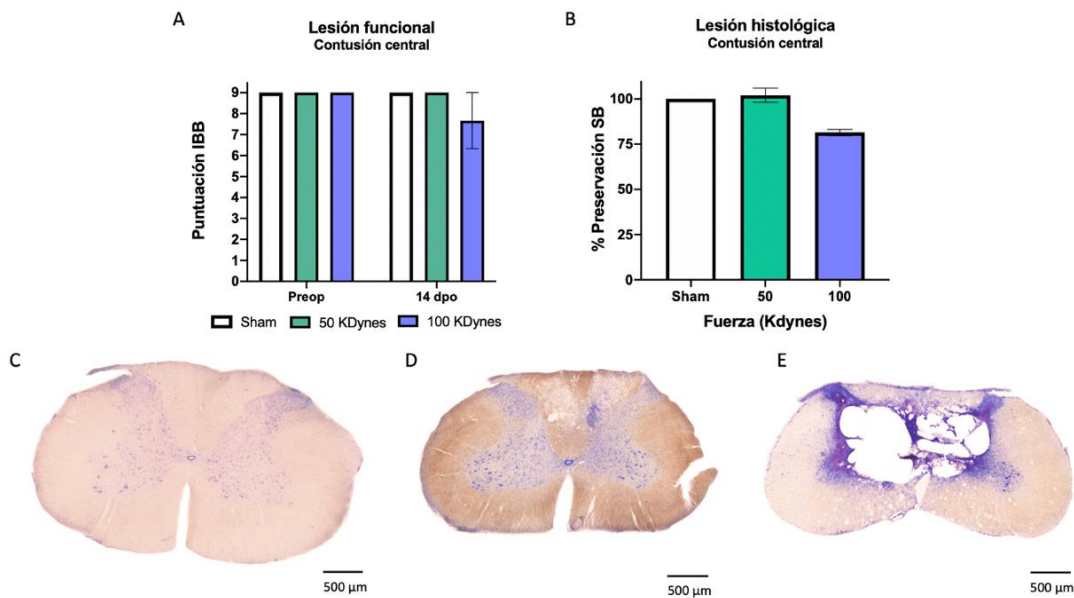


Figura 16: Contusiones centralizadas. Representación de la lesión funcional con la puntuación IBB (A) y de la lesión histológica (B) que muestra el % de sustancia blanca preservada (sham, 50 KDynes y 100 KDynes). Secciones medulares transversales de 35  $\mu$ m teñidas con Violeta de Cresilo de animales sham (C), con contusión de 50 KDynes (D) y 100 KDynes (E). Barra de escala 500 $\mu$ m.

## FIGURA 13

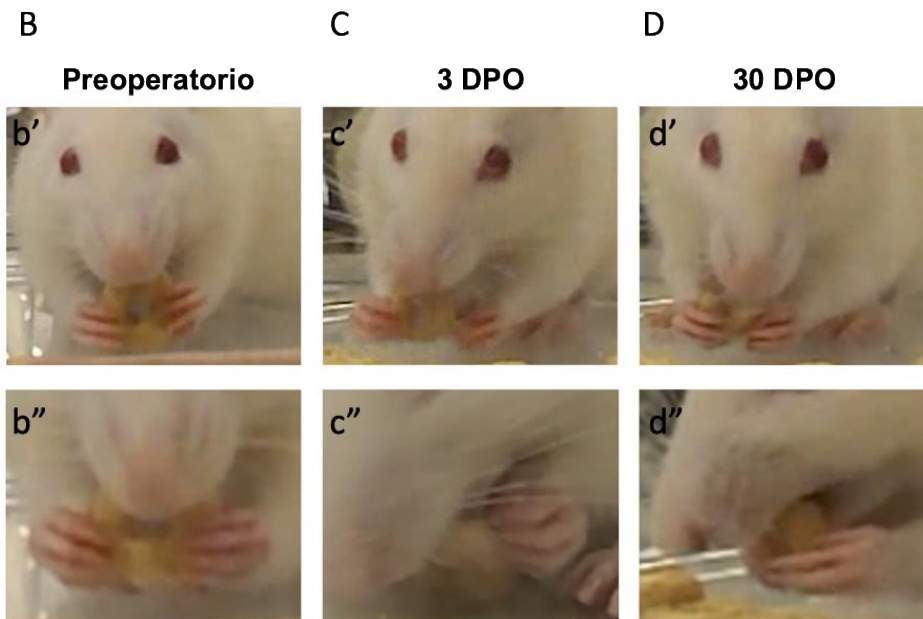
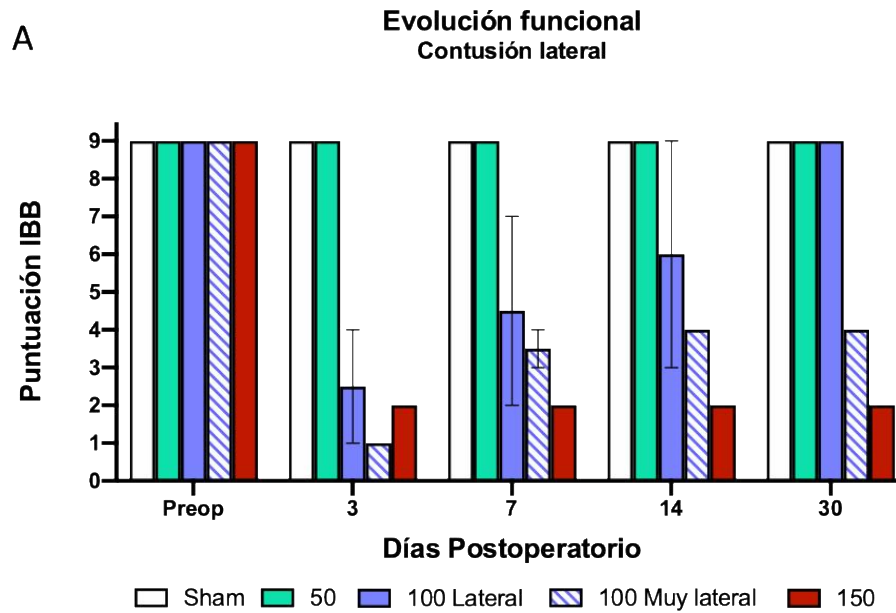
### 1.1.2 Estudio de la localización de la contusión

En el segundo ensayo se buscó profundizar en la dimensión temporal de la recuperación funcional y en la localización de la lesión para lograr una caracterización más fina de las lesiones generadas. Se incluyeron 8 animales más en los que se realizó una evaluación funcional post lesión a 3, 7, 14 y 30 dpo en los grupos de 50 KDynes (n=2), 100 KDynes (n=5) y 150 KDynes (n=1, como control de fuerza extrema). Todas las contusiones tuvieron una localización lateralizada en la médula, aunque en el grupo de 100 KDynes se infligieron además lesiones con localización muy lateral, quedando distribuido entre 2 animales con contusión lateral y 3 animales con contusión muy lateral. De estos últimos, uno tuvo que ser descartado debido una contusión errónea.

La evolución funcional de los animales con los diferentes tipos de lesión se resume en la figura 14. A.

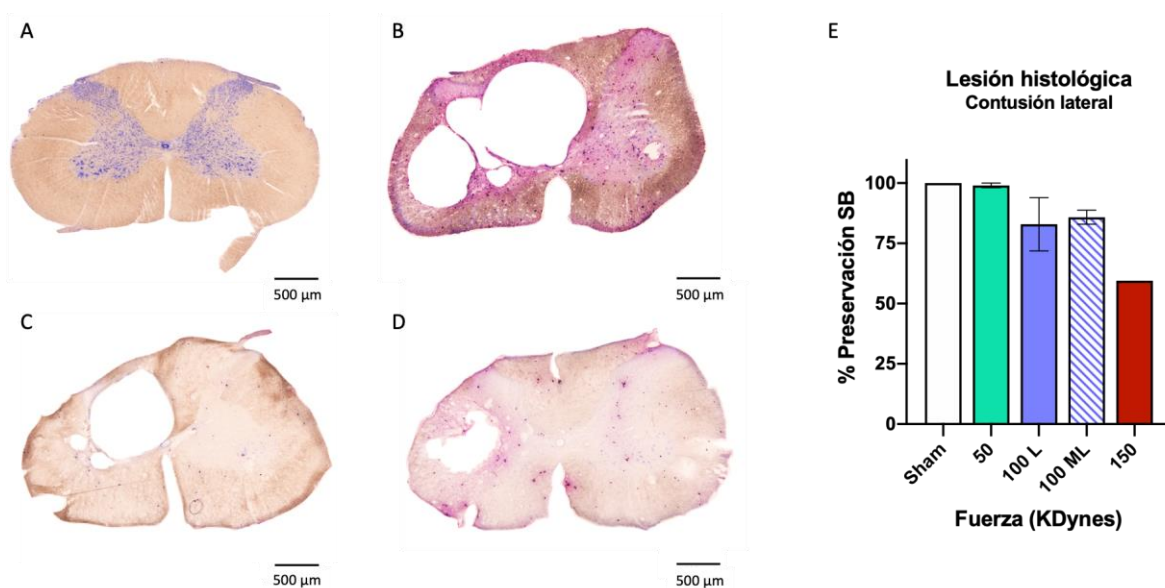
Los animales que recibieron una contusión de 50 KDynes no sufrieron déficits comportamentales, obteniendo una puntuación de 9 en la escala IBB sin variaciones desde el día 3 hasta el 30 post operatorio. Los animales con contusiones de 100 KDynes lateral (n=2), mostraron una evolución progresiva en la escala comportamental que fue desde una puntuación de 2,5 en la escala IBB a los 3dpo, hasta la recuperación total (IBB=9) a los 30 dpo. Los valores en los tiempos intermedios fueron de 4,5 a los 7 dpo y de 6 a los 14 dpo. Por otra parte, los animales con una contusión de 100 KDynes muy lateralizada (n=2), tuvieron una puntuación de 1 en la escala IBB a los 3 dpo que sólo se recuperó hasta una puntuación de 4 en la escala IBB a los 30 dpo. Estos animales pasaron de tener un déficit que no les permitía adaptar la mano al cereal, ya que tenían los dedos flexionados (IBB=1), a aumentar la movilidad de las manos y la adaptación digital al cereal (Figura B, C y D). Los valores en los tiempos intermedios fueron de 3,5 a 7 dpo y de 4 a 14 dpo en la escala IBB.

El animal que recibió una contusión de 150 KDynes lateralizada obtuvo una puntuación comportamental de 2 en la escala IBB a todos los dpo, confirmando la severidad extrema de las lesiones provocadas con esta fuerza de contusión.



**Figura 14: Análisis de la evolución funcional.** Evolución de la lesión funcional postoperatorio con la puntuación IBB promedio como resultado de las contusiones lateralizadas los días 3, 7, 14 y 30 en los grupos sham (blanco), 50 KDynes (verde), 100 KDynes lateral (azul) y muy lateral (rayas azules) y 150 KDynes (rojo). Secuencia de imágenes que representan la puntuación IBB a un animal que recibió una contusión de 100 KDynes muy lateral. En el animal sin lesión (B) se observa una adaptación de los dedos de ambas manos al cereal. El mismo animal 3 dpo muestra una puntuación de 1 en la escala IBB (apenas toca el cereal y no puede adaptar los dedos). Pasados 30 dpo (D) el animal ya realiza alguna sujeción palmar, sin que los dedos se adapten totalmente, obteniendo una puntuación de 4 en la escala IBB.

La histología de los animales con una contusión de 50 KDynes lateral no mostró diferencias con respecto al control (Figura 15.A). Los 4 animales con contusión lateral o muy lateral de 100 KDynes mostraron una preservación promedio de la SB de 84,38%, afectando al funículo lateral de la médula. La histología del animal con contusión de 150 KDynes mostró una preservación de la sustancia blanca de un 59,5% en la que la pérdida de tejido abarcaba prácticamente una hemisección completa de la médula espinal.



**Figura 15: Contusiones lateralizadas.** Secciones medulares transversales de 35 μm teñidas con Violeta de Cresilo de animales con contusión de 50 KDynes (A), 100 KDynes lateral (C) y muy lateral (D) y 150 KDynes (B). Barra de escala 500μm. Representación de la lesión histológica (E) que muestra el % de sustancia blanca preservada (sham, 50 KDynes, 100 KDynes lateral y muy lateral).

### 1.1.3 Efecto de la fuerza y la localización de la contusión

- Las contusiones de 50 KDynes no ejercieron una lesión suficiente para provocar déficits funcionales, con independencia de la localización. Por el contrario, la contusión de 150 KDynes infligió una lesión demasiado severa, ya que disminuyó la destreza manual en muy alto grado y de forma irrecuperable. En cuanto a las lesiones de 100 KDynes, a pesar de que la preservación histológica fue muy similar

entre ellas ( $\approx 80\%$ ), dieron lugar a resultados funcionales diferentes según la localización de la lesión: mientras que las lesiones laterales tuvieron una disminución funcional que se recuperó por completo, las lesiones muy laterales mostraron una disminución funcional inicial similar para la que no se alcanzó una completa recuperación en el tiempo del estudio y como ya se vio en el primer experimento, las lesiones centrales no causaron ningún déficit funcional.

- La recuperación completa y espontánea de la funcionalidad en las lesiones centrales y laterales hace que estos tipos de lesión no resulten adecuados para experimentos orientados a observar el efecto de la rehabilitación. Por el contrario, la lesión de 100 KDynes muy lateralizada resulta idónea para explorar el efecto de la rehabilitación por permitir observar una recuperación funcional que espontáneamente no llega a ser completa.

## 1.2 Efectos de una rehabilitación a largo plazo en la recuperación de la destreza manual

Gracias a los resultados del estudio anterior se pudo establecer un modelo de contusión que permite estudiar el efecto de la rehabilitación después de la lesión medular. Para cumplir los objetivos 1.B.1-1.B.4 se planteó el siguiente experimento en el cuál se evaluó a largo plazo la disfunción de la destreza manual en ratas con LME (Figura 16). Participaron 15 ratas hembra de la cepa Long Evans que fueron entrenadas durante 21 sesiones para la tarea de R&G. Una vez aprendida la tarea se les infligió una contusión medular de 100 KDynes en el hemisferio medular de su pata preferente. Los animales se dividieron en 2 grupos experimentales, el grupo de Rehab (N=7), que recibió rehabilitación diaria de las extremidades superiores y el grupo de No Rehab (N=6) el cual no recibió ningún tipo de rehabilitación. Durante ocho meses se evaluó quincenalmente la puntuación obtenida en la prueba funcional de R&G en ambos grupos. Al final del experimento se evaluó su función locomotora para corroborar que la contusión cervical moderada no afecta a la locomoción, ya que la destreza manual es la única función que se pretende perjudicar con esta lesión. Los animales fueron perfundidos con PFA al 4% y su ME fue seccionada transversalmente para observar, mediante IHQ y tinciones histológicas el nº de neuronas y MN afectadas en la lesión, el % de preservación del tejido (SB, SG y TCE) y su extensión a lo largo de la ME

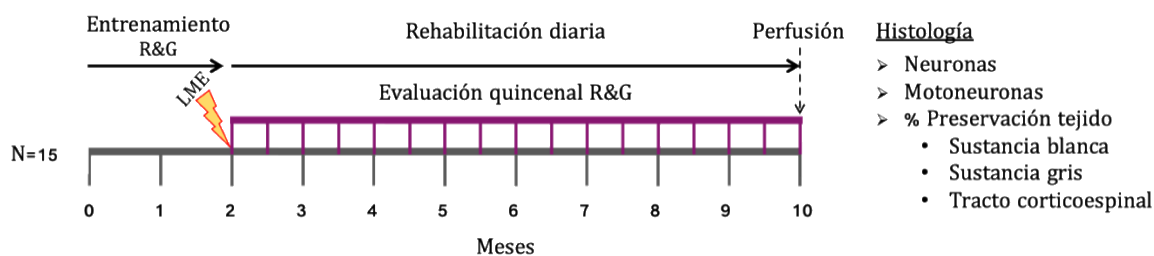
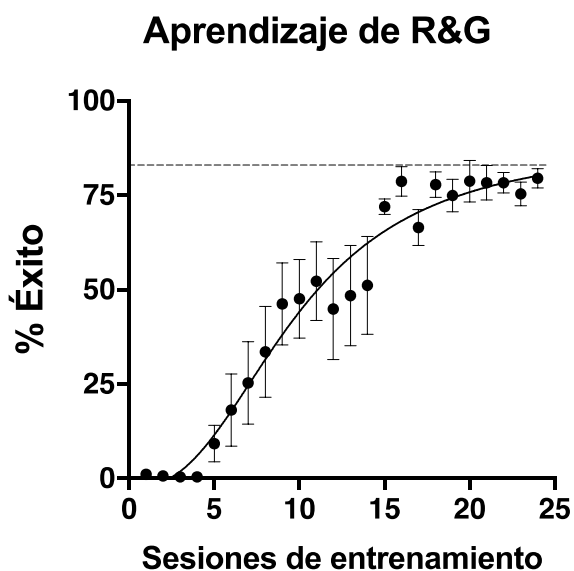


Figura 16: Representación temporal para el diseño del experimento 1: Efecto de la rehabilitación a largo plazo.

### 1.2.1 Entrenamiento R&G

24 ratas hembra se incluyeron en el entrenamiento diario de R&G. Los animales que durante 25 sesiones aprendieron la tarea ( $N_{\text{total}}=20$ ) alcanzaron un  $80 \pm 3\%$  de éxito (Figura 17). Los animales que no aprendieron fueron utilizados como control histológico ( $N=4$ ). Durante la fase de entrenamiento, un animal falleció por asfixia repentina y otro animal fue sacrificado por crecimiento aberrante del diente incisivo ( $N_{\text{total}}=18$ ).



**Figura 17: Proceso de aprendizaje de R&G.** Antes de la lesión todos los animales aprendieron a alcanzar y agarrar después de 25 sesiones con un  $80 \pm 3\%$  de éxito

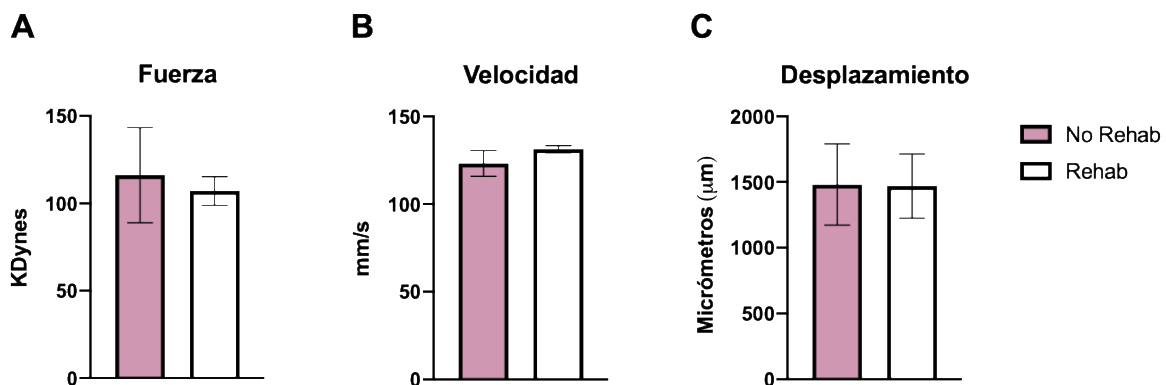
### 1.2.2 Lesión de médula espinal por contusión

Una vez que los animales alcanzaron el *plateau* de aprendizaje de R&G, los animales del grupo de No Rehab y Rehab recibieron respectivamente una contusión de  $105 \pm 12$  y  $107 \pm 3$  KDynes en el funículo lateral del segmento espinal C5 (Figura 18.A), ipsilateral a la pata preferente utilizada para alcanzar y agarrar. La velocidad de contusión fue de  $123 \pm 3,2$  y  $130 \pm 0,8$  mm/s (Figura 18.B), lo que produjo un desplazamiento de tejido de  $1547 \pm 115$   $\mu\text{m}$  y  $1469 \pm 99$   $\mu\text{m}$  (Figura 18.C) en los grupos No Rehab y Rehab, respectivamente.



El epicentro de la lesión afectó a las áreas dorsal y lateral del funículo lateral y casi por completo el asta dorsal de la sustancia gris, media y ventral. Por el contrario, los funículos ventrolaterales, las columnas dorsales y el hemicordio contralesional no se vieron muy afectados (Figura 19A). Todos los animales contusionados presentaron daños tisulares similares a los representados en el diagrama superpuesto (Figura 19B). El porcentaje de tejido de sustancia blanca preservada en el sitio de la lesión versus el no lesionado fue  $42 \pm 4\%$  para el grupo de rehabilitación y  $43 \pm 2\%$  para el grupo de no rehabilitación, y el porcentaje de sustancia gris preservada representó  $47 \pm 3\%$  y  $53 \pm 5\%$ , respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 19C, D).

Durante todo el seguimiento, los animales de No Rehab y Rehab ganaron peso y alcanzaron  $316 \pm 14$  gr y  $339 \pm 8$  gr respectivamente al final del estudio. Después de la LME tres animales fallecieron y dos animales recibieron una lesión incorrecta, por lo que se descartaron ( $N_{total}=13$ ). A lo largo del estudio, todos los animales pudieron moverse y utilizar la extremidad anterior afectada para mantener su postura, moverse y manipular los pellets. No se observaron signos de dolor, disfunción vesical, estrés o malestar. Estos resultados prueban que todos los animales recibieron lesiones de gravedad anatómica similar. Por lo tanto, el deterioro del comportamiento y la recuperación logrados durante el seguimiento no estuvieron sesgados por las diferencias en la conservación de tejidos.



**Figura 18: Parámetros controlados en la contusión cervical.** Se muestran los datos grupales de Fuerza (A), Velocidad (B) y Desplazamiento (C) para los grupos experimentales de No Rehab (granate) y Rehab (blanco).

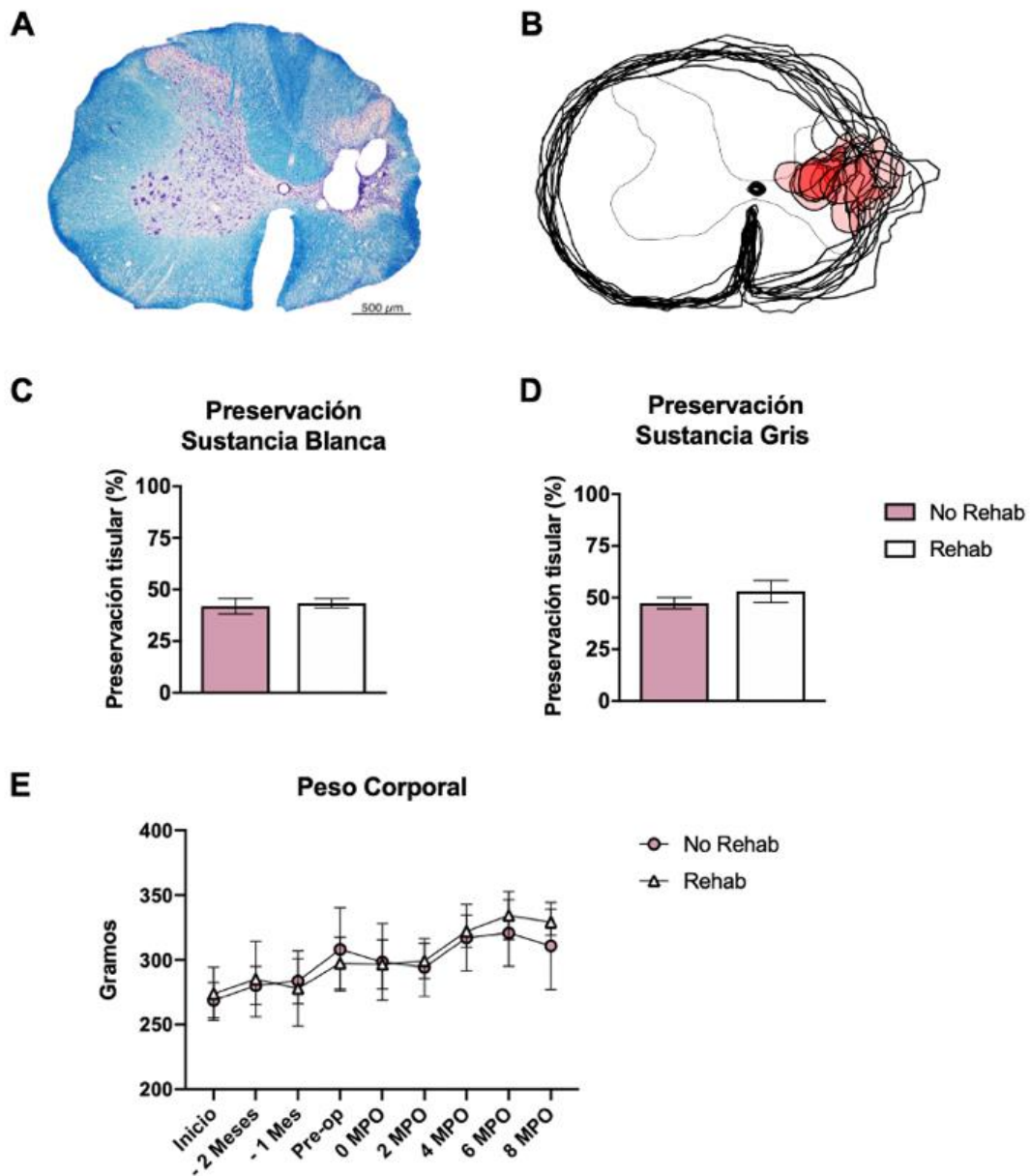


Figura 19: Daño histológico en la zona de la lesión. (A) Fotografía de la sección transversal espinal del nivel C5 teñida con violeta de cresilo y luxol fast blue perteneciente a un animal al que se le infligió una contusión de 100 KDynes en C5. (B) Superposición de dibujos del perímetro de la sección transversal del epicentro de la lesión de todos los animales, que muestran ubicaciones similares de la lesión. (C-D) Histogramas con el porcentaje promedio de sustancia gris (C) y blanca (D) preservada del hemicordio lesionado (con respecto al hemicordio no lesionado). (E) Evolución del peso corporal (gramos) desde el inicio del entrenamiento hasta el final del experimento 8 meses después de la lesión, en el que puede observarse la bajada de peso tras la lesión medular y su posterior recuperación, en ambos grupos experimentales. MPO=Meses postoperatorio. Barra de escala = 500  $\mu$ m.

### 1.2.3 Cambio de pata preferente después de la LME

Después de la lesión medular se dividió a los animales en dos grupos randomizados de Rehab (N=7) y No Rehab (N=6) en los que se evaluó la tarea de R&G cada dos semanas durante los ocho meses de seguimiento. A lo largo de este periodo, la mitad de los animales de los grupos Rehab y NoRehab adoptaron espontáneamente la estrategia de cambiar la preferencia de sus patas delanteras para alcanzar los pellets presentados. Estos animales realizaron, después de la lesión, <50% de los intentos con su pata preferente original desde el día  $23 \pm 6$  en el grupo Rehab y desde el día  $61 \pm 31$  en el grupo No Rehab (diferencia no significativa en el punto de tiempo de cambio de pata), aumentando el uso de la pata no lesionada hasta que exclusivamente solo utilizaban esta pata para realizar todos los intentos. Se intentó averiguar el motivo por el cual los animales cambiaban de pata relacionando diferentes eventos, pero ninguno de ellos mostró una relación directa con el cambio de pata. Los parámetros que se relacionaron fueron el n° de sesión de entrenamiento en el que empezaron a hacer R&G, el % de tejido preservado, el % de acierto antes de la lesión, el tiempo que tardaban en realizar una sesión de entrenamiento (pre-lesión) y su pata preferente (derecha o izquierda). Asimismo, encontramos que la realización del movimiento (% de éxito), antes de la lesión con su pata preferente y después de la lesión con su pata no preferente, era muy similar en cada uno de los sujetos de ambos grupos (Figura 20). Solo aquellos animales que mantuvieron su preferencia original de patas delanteras se incluyeron en el análisis R&G posterior. Todos los animales se incluyeron en el análisis de la locomoción y la evaluación histológica a los 8 meses después de la lesión, ya que no se encontraron diferencias respecto a este entre los animales que cambiaban de pata y los que no cambiaban.

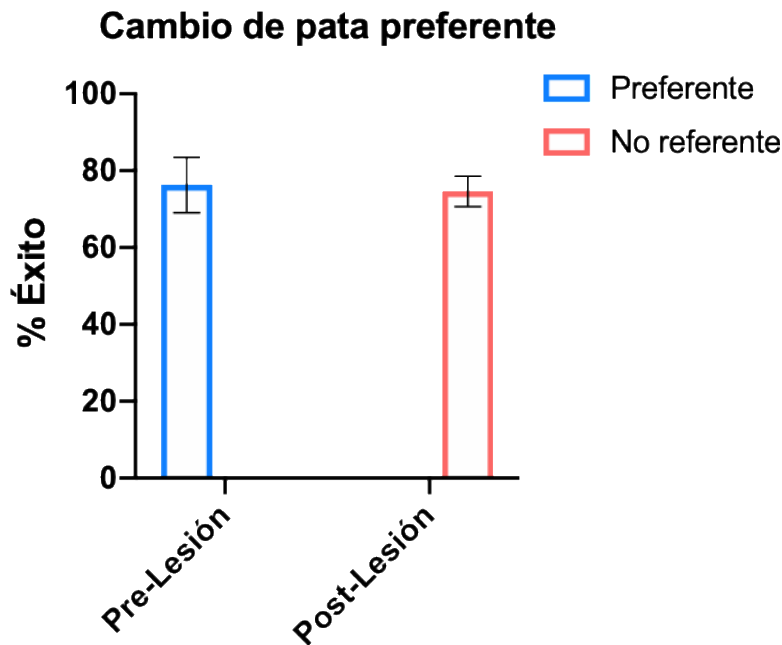
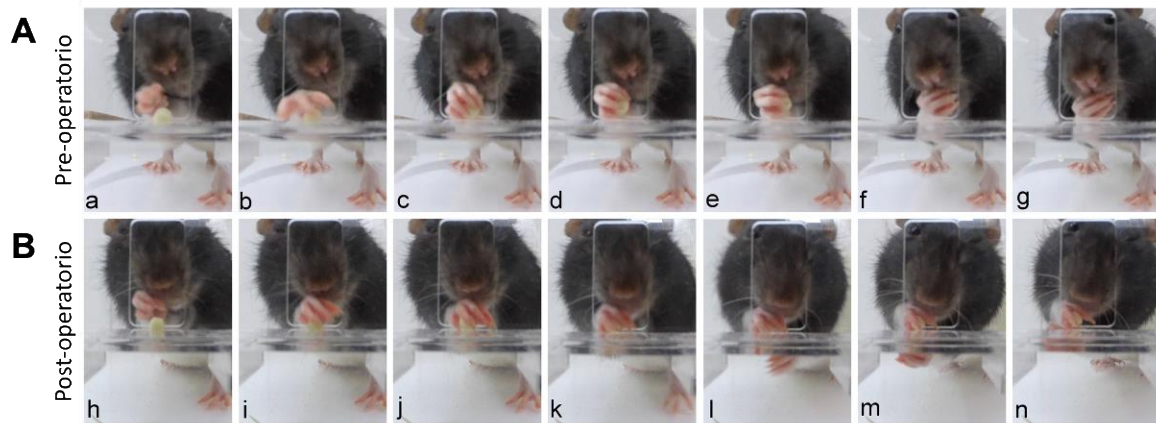


Figura 20: Similitud entre el porcentaje de éxito con ambas patas (preferente y no preferente) antes y después de la lesión de los 6 animales que cambiaban de pata al realizar la prueba de R&G. Después de la lesión, la mitad de los animales de ambos grupos cambiaron de pata para ejecutar el movimiento de R&G, impidiendo el seguimiento de la recuperación. Estos animales obtuvieron unas puntuaciones muy similares intra-individualmente en la ejecución de la tarea entre los tiempos pre-lesión, con su pata preferente, y post-lesión con su pata no preferente.

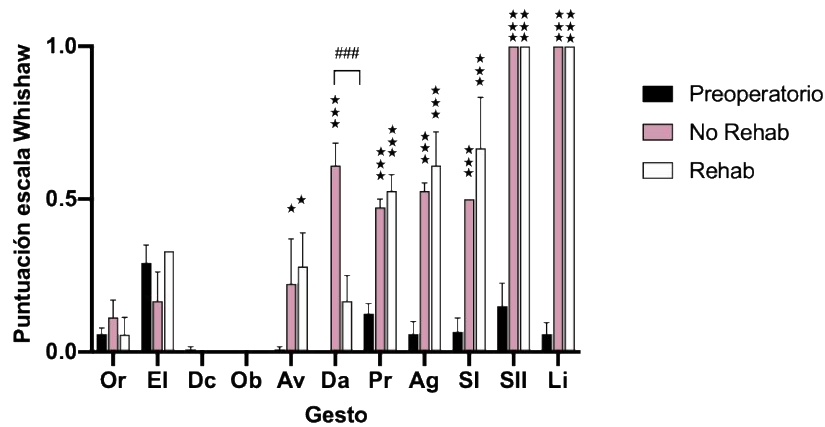
#### 1.2.4 Análisis de gestos Whishaw

El análisis de video detallado de los intentos exitosos realizados 8 meses después de la lesión reveló las similitudes y diferencias en los gestos del movimiento de R&G en ambos grupos (Véase en Materiales y Métodos el apartado 3.3.3 Escala de clasificación del movimiento Whishaw). Previamente a la lesión los animales ejecutaron una secuencia de gestos muy estereotipados (Figura 21.A), algunos de los cuales eran diferentes después de la lesión (Figura 21.B). Ocho meses después de la lesión, los animales de ambos grupos pudieron levantar y extender sus extremidades por la ventana en todos los intentos probados, aunque con un % de éxito muy bajo. Durante la extensión de la pata, la abertura de los dedos se recuperó en menor medida en el grupo de NoRehab y ambos grupos ejecutaron una pronación incompleta en la parte superior del pellet al agarrarlo. Una vez que se agarró el pellet, se retiró la pata con una supinación incompleta hacia la boca y en

las últimas etapas de la recuperación, la extremidad contralateral ayudó, en algunos casos, a conducir la extremidad afectada con el pellet hacia la boca (Fig 21.B). Además, los animales acercaron la cabeza hacia el pellet, en lugar del pellet hacia la boca. El ANOVA de tres vías reveló un efecto significativo del grupo x punto de tiempo x gesto ( $F(10, 40) = 2.92, p < 0.01$ ), y las comparaciones de Bonferroni mostraron diferencias significativas entre los grupos No Rehab y Rehab a los 8 meses durante la extensión de los dedos, pronación, agarre, supinación I&II y los gestos de liberación obtuvieron puntuaciones significativamente mayores para los grupos NoRehab y Rehab al comparar los datos de 8 meses y preoperatorios (Figura 21.C).



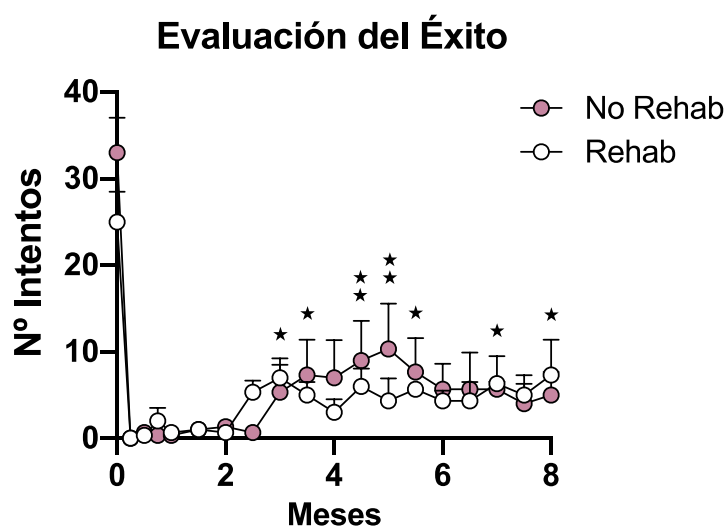
### C Cuantificación escala Wishaw



**Figura 21: Secuencia de gestos en el movimiento de R&G.** La primera fila (A) corresponde a la secuencia fotogramas que muestra los gestos de R&G en un animal totalmente ileso mientras que la segunda fila (B) representa el movimiento exitoso 8 meses después de la LME. (C) Cuantificación en escala Wishaw de los gestos realizados por los grupos Rehab y No Rehab cuando alcanzan y agarran pellets con éxito a los 8 meses después de la lesión frente a antes de la lesión. Gestos: Or: Orientación, El: Elevación, Dc: Dígitos cerrados, Ob: Objetivo, Av: Avance, Da: Dígitos abiertos, Pr: Pronación, Ag: Agarre, SI: Supinación I, SII: Supinación II, Li: Liberación. Posteriormente al ANOVA de tres vías (GRUPO x PUNTO DE TIEMPO x GESTO interacción:  $F_{(10, 40)} = 2.92$ ,  $p < 0.01$ ), el post hoc de Bonferroni mostró diferencias entre los grupos No Rehab y Rehab (###  $p < 0.001$ ) y al comparar 8 meses y datos preoperatorios ( $\star p < 0.05$ ;  $\star\star\star p < 0.001$ ). Los datos preoperatorios de Rehab y No Rehab se representan juntos para facilitar la interpretación visual, pero el análisis se realizó conservando la diferenciación Rehab / No Rehab.

### 1.2.5 Porcentaje de éxito

A los 7 DPO, el número de pellets ingeridos se redujo a 0 en ambos grupos y permaneció sin cambios hasta el ~ 3er mes después de la lesión. Se logró un ligero aumento a  $5.3 \pm 3.9$  y  $5.3 \pm 1.3$  de pellets ingeridos en los grupos No Rehab y Rehab a los 3 y 2.5 meses después de la lesión, respectivamente, sin mejoría adicional durante los siguientes meses de seguimiento funcional (Figura 22). El análisis estadístico ANOVA bidireccional no mostró ningún efecto del grupo de rehabilitación ni interacción entre los factores ( $F_{(1, 4)} = 0,138$ ,  $p = 0,73$  y  $F_{(18, 72)} = 1,12$ ,  $p = 0,35$ , respectivamente) pero sí se observó un efecto significativo del tiempo ( $F_{(18, 72)} = 20,1$ ,  $p < 0,001$ ). El aumento en el número de pellets ingeridos para ambos grupos fue significativo a partir de los 3 meses posteriores a la lesión en comparación con los valores de 7 DPI (comparaciones de Dunnet, Figura 22).



**Figura 22: Recuperación de la destreza manual.** Evaluación de la destreza manual mediante la tarea de R&G en la que se representa el éxito en su ejecución: número promedio de pellets consumidos por los grupos Rehab y No Rehab en cada sesión de prueba a lo largo de los 8 meses de seguimiento. Después de ANOVA bidireccional (efecto PUNTO DE TIEMPO:  $F_{(18, 72)} = 20,1$ ,  $p < 0,001$ ), se realizaron las comparaciones de Bonferroni frente a los valores de 7 dpo ( $\star p < 0,05$ ;  $\star\star p < 0,01$ ) para los valores No Rehab / Rehab juntos.

### 1.2.6 Porcentaje de errores en R&G

Tras la cuantificación del tipo de error en los intentos fallidos se encontraron diferencias drásticas en el tipo de errores realizados durante la tarea. En cada sesión de prueba, los

intentos fallidos se cuantificaron y categorizaron mediante una escala semicuantitativa, según la naturaleza del error cometido (véase en el apartado de Materiales y Métodos). La interrupción de los funículos laterales de la sustancia blanca no impidió que los animales intentaran realizar el movimiento de R&G y ninguno de los animales cometió errores 0 ni 1 (puntuando la incapacidad para levantar la pata o levantarla del suelo, respectivamente, en cualquier momento). El error más severo realizado al final de la evaluación funcional fue el tipo 2, en el que el avance de la pata era demasiado corto para sacar la pata por la ventana. Pocos de estos errores fueron realizados por animales Rehab o No Rehab, sin diferencias entre los grupos (Fig 23.D). En el error tipo 3, la pata se extiende a través de la ventana y la longitud del avance fue lo suficientemente extensa para alcanzar el pellet, sin embargo, el pellet estaba fuera del objetivo desde la dirección del avance de la extremidad. Los animales de ambos grupos realizaron este error de manera similar, mostrando un alto porcentaje durante los primeros dos meses después de la lesión que disminuyó gradualmente con el tiempo ( $F_{(18, 72)} = 2.76$ ,  $p < 0.01$  para el efecto del tiempo) (Fig 23.E). Los animales del grupo Rehab tendieron a realizar este error en un menor porcentaje de intentos, aunque no se observaron diferencias significativas ( $F_{(1, 4)} = 2.52$ ,  $p = 0.18$  para el efecto de grupo). Los tipos de error 4 y 5 involucraron las últimas etapas del intento de R&G e incluyeron errores en el proceso de agarre y transporte del pellet. Mientras que en el error tipo 4 el pellet se desplazó de la plataforma durante la aproximación de los dedos hacia ella, en el error tipo 5 el pellet se cayó una vez agarrado o transportado a la boca. Ambos grupos de animales tuvieron un porcentaje similar de error 4, que se mantuvo constante a lo largo de todo el seguimiento (Figura 23.F). Por el contrario, el tipo de error 5 (Figura X.G) aumentó durante el seguimiento ( $F_{(18, 72)} = 4.14$ ,  $p < 0.001$  para el efecto del tiempo), siendo mayor en el grupo de Rehab ( $F_{(1, 4)} = 10.9$ ,  $p < 0.05$  para el grupo efecto). Las diferencias entre los grupos representaron todo el período de rehabilitación, pero no puntos específicos de tiempo.

El coeficiente de variación del error (CV- error) se calculó para cada punto de tiempo como una medida de la variabilidad del tipo de error (Figura 23.H). La progresión del CV-error fue similar para ambos grupos hasta el mes 3.5, un periodo durante el cual se pudo observar un CV-error aumentado después de la lesión seguido de una disminución parcial.



Después de 3,5 meses, las curvas de los grupos No Rehab y Rehab iniciaron una divergencia progresiva que se hizo más evidente al final del experimento. La intersección entre ambas curvas se marcó arbitrariamente para distinguir las fases I y II (Figura 23.H). Se encontraron diferencias estadísticas en la fase II (prueba de Kolmogorov-Smirnov;  $p < 0,005$ ) pero no en la fase I (prueba de Kolmogorov-Smirnov;  $p = 0,94$ ). En la fase I, la distribución del número total de intentos para cada tipo de error mostró un pico máximo de error tipo 3 en los animales NoRehab, aunque sin diferencias con los otros tipos de error (prueba de Friedman,  $p = 0,30$ ), mientras que el grupo de Rehab tuvo una distribución similar de los tipos de error 3, 4 y 5 (prueba de Friedman,  $p = 0,28$ ). En la fase II, el grupo No Rehab alcanzó una distribución como la obtenida en la fase I por el grupo de Rehab, con una cantidad similar de errores de los tipos 3, 4 y 5, mientras que los animales de Rehab tendieron a tener un pico máximo de error de tipo 5. En la fase I, los errores de tipo 3 fueron los más abundantes realizados por el grupo NoRehab, aunque sin diferencias al compararlos con los otros tipos de error (prueba de Friedman,  $p = 0,30$ ). Los animales de rehabilitación realizaron una cantidad similar de errores de los tipos 3, 4 y 5 (prueba de Friedman,  $p = 0,28$ ). En la fase II, el grupo NoRehab realizó una cantidad similar de tipos de error 3, 4 y 5, mientras que los animales del grupo Rehab tendían a tener un pico máximo de error tipo 5 (prueba de Friedman,  $p < 0,05$ , tipo de error 5 vs tipo de error 2).

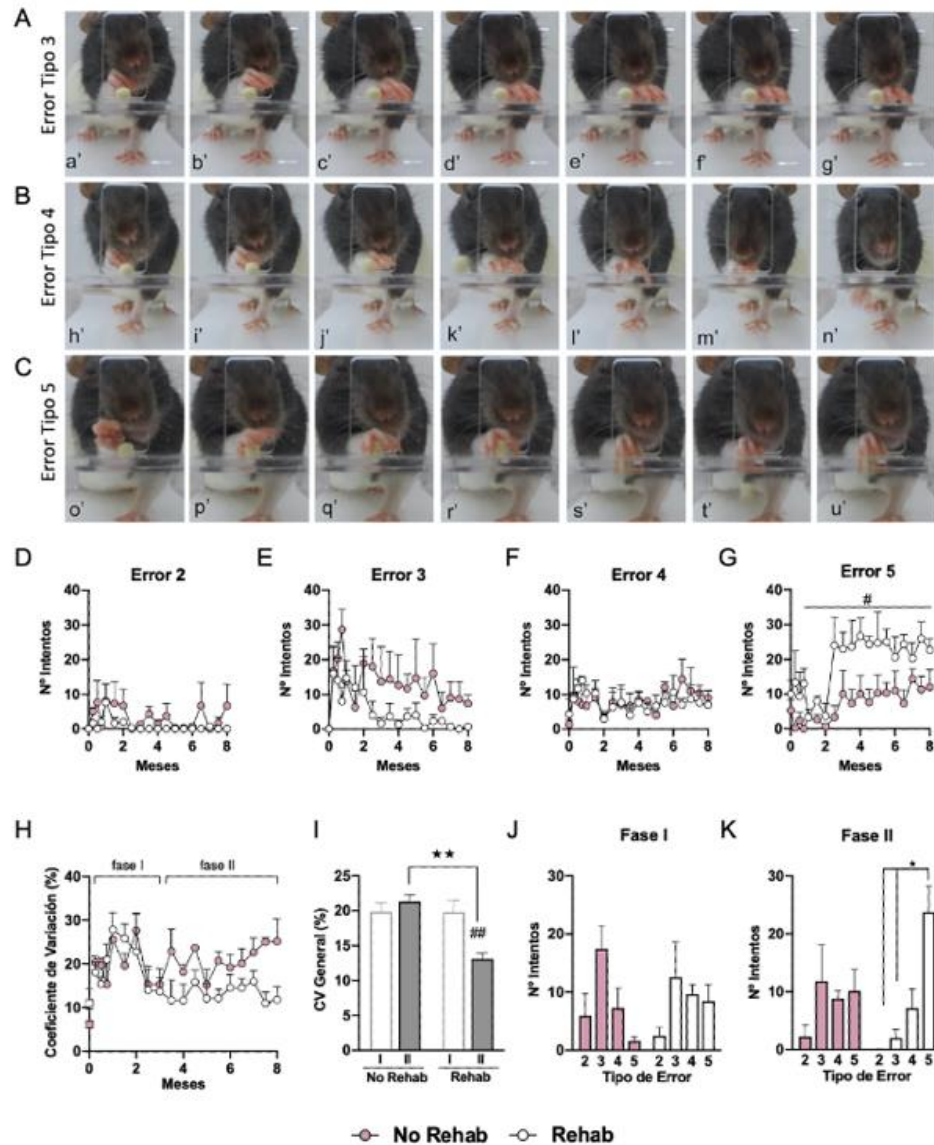


Figura 23: Variabilidad del error en tarea de R&G. Fotografías que muestran la secuencia de gestos de animales 8 meses después de la lesión realizando (A) error tipo 3, (B) error tipo 4 y (C) error tipo 5. Puede observarse el desplazamiento del pellet (B, j') durante la apertura (error tipo 4) y cierre de los dedos (C, s') durante el agarre (error tipo 5). (D-G) Número promedio de intentos de los grupos No Rehab y Rehab con (D) tipo de error 2, (E) tipo de error 3, (F) tipo de error 4 y (G) tipo de error 5 realizados en cada sesión de prueba a lo largo de los 8 meses de seguimiento. La diferencia entre los grupos en el tipo de error 5 representa todo el período ( $F_{(1,4)} = 10,9$ ,  $\#p < 0,05$ ). (H) Coeficiente de variación del tipo de error en los grupos de No Rehab y Rehab durante el seguimiento. Las Fases I y II están arbitrariamente separadas por la intersección de la curva de grupos, como un punto indicativo de la diferente tendencia entre grupos. Después del ANOVA de dos vías para la fase II (efectos de GRUPO y PUNTO DE TIEMPO:  $F_{(1,4)} = 9,67$ ,  $p < 0,05$  y  $F_{(10,40)} = 2,41$ ,  $p < 0,05$ ), las comparaciones de Bonferroni muestran diferencias entre grupos ( $\#p < 0,05$ ). (I) Coeficiente de variación del tipo de error general promedio durante la fase I y la fase II (GRUPO  $\times$  FASE:  $F_{(1,104)} = 11,2$ ,  $p < 0,01$ ), también se muestran las diferencias en la prueba post-hoc de Bonferroni entre grupos ( $\#\#p < 0,01$ ) y entre fases ( $\star\star p < 0,01$ ). Histogramas que muestran la cantidad total de cada tipo de error realizado por los grupos No Rehab y Rehab en (J) fase I y (K) fase II del seguimiento. La prueba de Friedman reveló un efecto TIPO DE ERROR ( $F_{(3,12)} = 9,00$ ,  $p < 0,01$ ) durante la fase II en el grupo de Rehab; se muestran diferencias significativas de Dunn entre los tipos de error ( $\star p < 0,05$ ).

La base de apoyo de los animales fue similar entre los grupos No Rehab y Rehab y también en comparación con los animales no lesionados ( $F_{(2, 13)} = 0.260$ ,  $p = 0.77$ ) (Fig. 24B). Ni la longitud de la zancada ipsi de la extremidad anterior ni la contralesionada difirieron de los valores de control (Figura 24C) y no se encontraron diferencias entre los grupos o los lados ( $F_{(2, 13)} = 0.198$ ,  $p = 0.82$  para el efecto de grupo y  $F_{(1, 13)} = 0.615$ ,  $p = 0.45$  para efectos secundarios). Por otro lado, la distancia entre el segundo y el quinto dedo se redujo en la pata ipsilesionada pero no en la contralesionada en los grupos Rehab y No Rehab en comparación con los animales control ( $F_{(2, 13)} = 4.90$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1, 13)} = 13.5$ ,  $p < 0.01$ ; y  $F_{(2, 13)} = 4.87$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente, para efectos secundarios grupales, secundarios y grupales  $\times$ ) (Fig. 4D). Las comparaciones de Bonferroni confirmaron la ausencia de diferencias entre Rehab y No Rehab ipsilateral entre la distancia del 2° al 5° dedo.

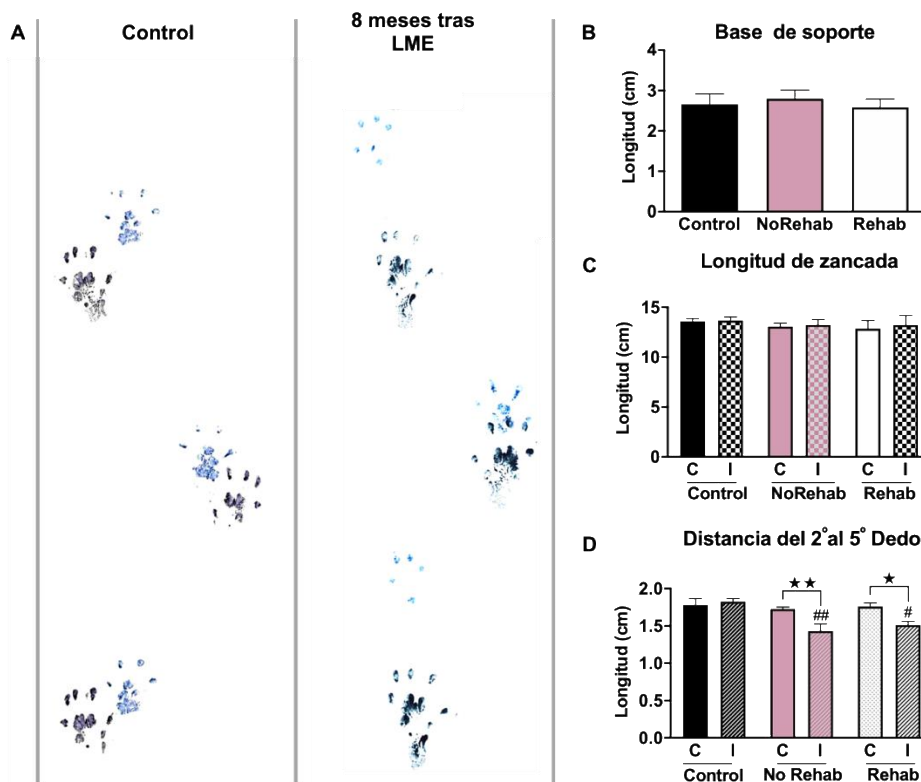


Figura 24: Análisis de la locomoción. (A) Huellas de las patas delanteras derecha e izquierda (azul) y de las patas traseras (negro) de un control ileso y de un animal 8 meses después de la contusión espinal. (B-D) Histogramas de los valores medios promediados de diferentes parámetros de la marcha ((B) base de apoyo, (C) longitud de la zancada y (D) distancia del 2° al 5° dígito) comparando los grupos No Rehab y Rehab con los valores obtenidos de animales de control ileso. (C: contra-lesional; I: ipsi-lesional). La distancia de dígitos mostró un efecto GRUPO X LADO ( $F_{(2, 13)} = 4.87$ ,  $p < 0.05$ ); Se representan las comparaciones entre grupos (# $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs control) de Bonferroni (★ $p < 0.05$ , ★★ $p < 0.01$ ).

## Conclusiones COMPORTAMENTALES:

Tomados en conjunto, estos resultados indican que los animales sometidos a rehabilitación diaria durante largo plazo con tareas específicas de las extremidades anteriores no recuperaron la capacidad de realizar R&G de manera eficiente, ya que no adquirieron la habilidad para agarrar y soltar consistentemente el pellet en la boca. Además, los gestos similares mostrados por ambos grupos de animales sugieren el uso de una estrategia motora común con el R&G. Sin embargo, la diferencia en el número de errores, calidad y evolución a lo largo del tiempo, como lo demuestra el coeficiente de variación del error, indica que la rehabilitación mejoró el R&G al disminuir la variabilidad del error y al llevar el rendimiento del R&G a las últimas etapas de cada intento.

Los resultados referentes al análisis de locomoción evidencian que los animales mantuvieron la capacidad de articular sus extremidades y usar sus patas para moverse. La pata delantera afectada no estaba cerrada y se usó de apoyo plantar para dar pasos. Sin embargo, como se observó durante el análisis de R&G, los dígitos no se extendieron al máximo. La lesión infligida no fue lo suficientemente grave como para restringir el movimiento del animal, por lo tanto, las deficiencias durante el R&G no se debieron a la incapacidad física para usar sus patas delanteras, sino a defectos neurológicos.

### 1.2.7 Extensión de la lesión tisular

Para analizar la extensión rostro-caudal de la lesión, representada como el porcentaje de tejido preservado del lado medular lesionado con respecto al contralesionado, se utilizaron cortes espinales transversales seriados co-marcados con las tinciones de Violeta de Cresilo y Luxol Fast blue desde C2 a T2 (Fig. 25A) El epicentro de la lesión se definió como la sección con la mínima cantidad de tejido espinal conservado. El daño tisular se circunscribió al sitio de la lesión, extendiéndose longitudinalmente 1-1.5 mm rostral y caudal desde el epicentro de la lesión ( $F_{(14, 110)} = 26.2$ ,  $p < 0.0001$  como efecto de la distancia. La extensión del daño tisular fue confirmada por comparaciones de Bonferroni

con respecto a los valores de control obtenidos del tejido no dañado a 6 mm rostral de la lesión). No hubo daños estructurales en los segmentos espinales más allá de este punto. No se encontraron diferencias entre los grupos No Rehab y Rehab ( $F_{(14, 110)} = 0,75$ ,  $p = 0,72$  como efecto de la distancia del grupo) (Fig. 26B). La supervivencia neuronal se evaluó como el porcentaje de células inmuno-positivas al anticuerpo NeuN (Chen et al., 2016; Duan et al., 2016). La supervivencia de las motoneuronas se midió mediante el conteo de motoneuronas teñidas con Violeta de Cresilo que marcaban los somas de tamaño igual o superior a  $100 \times 100 \mu\text{m}$  ubicadas en la lámina IX (106,150) en el lado ipsi con respecto al contralesionado. No se observaron diferencias entre los grupos para los recuentos de células NeuN + o motoneuronas (respectivamente  $F_{(1, 10)} = 0,0$ ,  $p = 0,99$  y  $F_{(1, 10)} = 0,015$ ,  $p = 0,90$ ). La supervivencia de las neuronas se redujo a  $33 \pm 5\%$  y  $31 \pm 6\%$  en los grupos Rehab y NoRehab en la zona de la lesión (Fig. 6C). La recuperación de valores similares a los del lado contralesionado se alcanzó a 2,1 mm rostral y 1,7 mm caudal desde el epicentro (análisis post-hoc de Bonferroni). En el lado de la médula espinal no dañada, el número de motoneuronas aumentó a lo largo del eje cervical rostro-caudal, de acuerdo con la distribución espacial de los grupos de motoneuronas de los músculos de las extremidades anteriores (McKenna et al., 2000) (Fig. 6D). No hubo supervivencia de las motoneuronas en el epicentro de la lesión en ninguno de los grupos y se redujeron drásticamente en la región de la penumbra, extendiéndose rostralmente 1,4 mm y 0,7 mm caudalmente desde el epicentro. Los recuentos de motoneuronas del lado ipsi y contralesionado fueron comparables a 1,75 mm rostral y 1,1 mm caudal desde el epicentro (comparaciones de Bonferroni). No se observó daño en las motoneuronas de ninguno de los animales en los segmentos espinales cervicales distales (Fig. 6D, E), que hospedan las motoneuronas que controlan los músculos distales de las extremidades anteriores (151). Dado que el tracto corticoespinal es una vía descendente importante que controla el control motor fino (152), su integridad se midió mediante el área de inmunotinción de PKC $\gamma$  (153) en los funículos dorsales de la médula espinal cervical (Figura 6F). En los animales control sin lesión, el área corticoespinal disminuyó a lo largo del eje rostro-caudal de la médula espinal (efecto del nivel espinal:  $F_{(2, 24)} = 52,4$ ,  $p < 0,0001$ ) (Fig. 6G). En ninguno de los grupos experimentales la contusión afectó gravemente la integridad del tracto corticoespinal, ya que las áreas cuantificadas en C5 y C8 se asemejaron al área promedio de los animales

ilesos, sin diferencias estadísticas entre los grupos ( $F_{(2, 12)} = 1.26, p = 0.32$  y  $F_{(4, 24)} = 1.48, p = 0.24$  como efectos de la interacción grupo y grupo  $\times$  nivel espinal) (Fig. 5A).

FIGURA

25

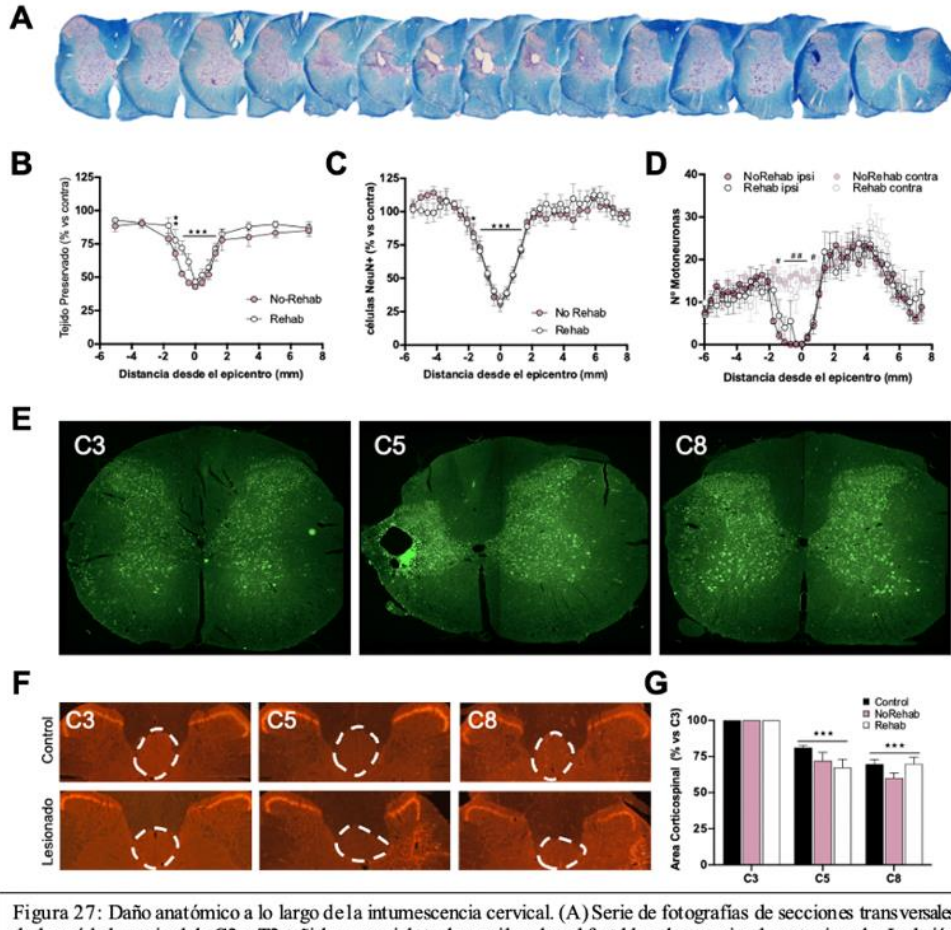


Figura 27: Daño anatómico a lo largo de la intumescencia cervical. (A) Serie de fotografías de secciones transversales de la médula espinal de C2 a T2 teñidas con violeta de cresilo y luxol fast blue de un animal contusionado. La lesión se limita al epicentro y se extiende unos milímetros rostral y caudalmente. (B-C) Cuantificación del (B) parénquima espinal preservado y (C) recuentos de neuronas (NeuN<sup>+</sup>) en el hemicordio lesionado (ipsilateral) en comparación con el hemicordio contralateral para los grupos de No Rehab y Rehab. Se encontró un efecto de DISTANCIA desde el epicentro ( $F_{(14, 110)} = 26.2, p < 0.001$  para tejido preservado y  $F_{(34, 340)} = 25.9, p < 0.001$  para recuento de neuronas). Se muestran las comparaciones de Bonferroni vs segmentos espinales rostrales ( $\star p < 0.05, \star\star p < 0.01, \star\star\star p < 0.001$ ). (D) Cuantificación del número de motoneuronas por sección del lado lesionado en comparación con el no lesionado a lo largo del agrandamiento de la intumescencia cervical (efecto LATERAL:  $F_{(40, 440)} = 15.4, p < 0.001$ ). Las comparaciones entre lados de Bonferroni ( $\# p < 0.05, \#\# p < 0.01$ ) se realizaron para los valores No Rehab / Rehab juntos. (E) Fotografías de cortes transversales de la columna (C3, C5, C8) teñidos con el marcador neuronal NeuN de un animal con una contusión en C5. (F) Fotografías de cortes espinales transversales (C3, C5, C8) que muestran los funículos dorsales de un control y un animal lesionado, con el tracto corticoespinal teñido con PKC $\gamma$  y delineado. (G) Cuantificación de la cantidad de área conservada del tracto corticoespinal en C3, C5, C8. Se encontraron diferencias a lo largo del eje rostrocaudal ( $F_{(2, 24)} = 52.4, p < 0.001$ ), entre C3 y el epicentro (C5) y también entre C3 y los segmentos espinales caudales ( $\star\star\star p < 0.001$ ), pero no entre grupos.

En conjunto, estos resultados indican que una contusión moderada infligida a los funículos laterales dorsales generó un daño local a la médula espinal que afectó exclusivamente al

segmento espinal contusionado. El daño tisular y la muerte neuronal se circunscribieron a la zona de la lesión, sin extenderse a los segmentos distales de la médula espinal cervical que albergan las motoneuronas y las interneuronas segmentarias que controlan los músculos distales de las extremidades anteriores. Además, la lesión apenas afectó el tracto corticoespinal, cuya conservación estuvo cerca de los valores ilesos a lo largo de toda la intumescencia cervical, mostrando como su preservación no es suficiente para mantener la destreza manual.

## 2 Implementación de un programa de rehabilitación en ratones con lme para promover la recuperación de la destreza manual.

Este estudio forma parte del proyecto “Estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal cervical para facilitar la recuperación funcional del brazo y la mano en pacientes con lesión de la médula espinal cervical traumática incompleta”, en el cual participan Guillermo García-Alías como coordinador de proyecto, Andrew Jackson desde el Instituto de Neurociencias de Newcastle University, Joan Vidal desde el Intituto Guttman de Barcelona y Joel C. Glover desde la Universidad de Oslo (UiO). La parte de este proyecto que se llevó a cabo en Olso fue examinar la recuperación de la destreza manual después de la LME cervical en ratones. Los objetivos principales de este proyecto son 1. Caracterizar la LME cervical por contusión en ratones con el dispositivo de Horizon Impactor, 2. Caracterizar la prueba comportamental de destreza manual de R&G, tanto su entrenamiento cómo su análisis y 3. Evaluar el efecto de la rehabilitación en la recuperación de la destreza manual después de una LME por contusión.

Para ello se llevaron a cabo 2 experimentos. El primero sirvió para caracterizar la LME en ratones y establecer un modelo de lesión. En el segundo experimento se realizó la LME establecida y se evaluó el efecto de la rehabilitación en la recuperación de la destreza manual. La tarea de rehabilitación que se llevó a cabo en este experimento fue la misma que se evaluaba, el R&G, de esta forma se pudo observar el efecto de una rehabilitación específica de la tarea.

### 2.1 Caracterización de un modelo de contusión cervical en la médula espinal de ratón

Para la caracterización de la LME se realizó una búsqueda y comparación de los pocos estudios publicados acerca de LME cervical en ratones. El tipo de LME escogida fue la contusión medular con el dispositivo Horizon Impactor, ya que permite la homogeneización metodológica entre laboratorios además de ser uno de los modelos que mejor mimetiza las lesiones traumáticas en humanos. La localización de la lesión fue lateralizada en la ME, en



el segmento medular que pertenece a la vértebra C4, tras definir la pata preferente en el entrenamiento de R&G. Con respecto al parámetro de la intensidad de la intervención, se ha observado que las contusiones centralizadas de 80 KDynes en C5 resultaban en una disminución de la fuerza de las extremidades delanteras que no se recuperaba tras 8 semanas (154). Además se ha visto que las contusiones a nivel de C5 de 75 KDynes mostraban una disminución funcional de la destreza manual en el test de Montoya Staircase que no mostraba recuperación después de 12 semanas (58). Las contusiones de 50 KDynes en C5 provocan una disminución tanto de la fuerza como del uso de la pata lesionada en el test del cilindro, con una posterior recuperación parcial a los 45 DPO (155). Por otra parte, los resultados de las contusiones de 40 KDynes en C5 o en C6 con un tiempo de permanencia del émbolo dentro de la médula (*dwell time*) de 2 segundos, adquieren una recuperación total de la fuerza a las 6 semanas (156). Teniendo en cuenta los anteriores hallazgos, se decidió estudiar los resultados de las lesiones con cuatro niveles de intensidad de la contusión: 40 KDynes (n=2), 50 KDynes (n=2) y 60 KDynes (n=1) sin tiempo de permanencia del émbolo dentro de la médula.

Para analizar la severidad funcional de la lesión se utilizó la escala IBB de forma preoperatoria, 1 y 2 semanas después de la lesión (135).

## **Resultados:**

Todos los animales obtuvieron una puntuación de 9 en la escala IBB antes de la lesión (Figura X.A). Los animales que recibieron una lesión de 40 KDynes obtuvieron una puntuación en la escala IBB de 7 y 8 una semana después de la lesión (Figura X.B), que se recuperó hasta la puntuación de 9 a las 2 semanas después de la lesión (Figura X.C). Esta puntuación refleja que después de la lesión se observó una reducción en el contacto con todos los dedos en el cereal y la posición predominante de la mano era parcialmente extendida pero adaptable. Estos déficits se recuperaron casi por completo a las dos semanas.

Los animales a los que se les infligió una LME de 50 KDynes obtuvieron una puntuación de 2 en la escala IBB una semana después de la lesión (Figura X.D), que se recuperó hasta

una puntuación de  $6,5 \pm 0,5$  a las 2 semanas después de la lesión (Figura X.E). Esta puntuación muestra cómo la lesión disminuye la movilidad de los dedos con una posición un poco agarrotada, fija y flexionada de la mano. Este déficit se recuperó dos semanas después de la lesión aumentando la flexibilidad y el contacto de los dígitos con el cereal, sin alcanzar la recuperación total del movimiento. Por último, el animal del grupo de 60 KDynes también disminuyó su movilidad una semana después de la lesión hasta alcanzar una puntuación de  $1 \pm 1$  en la escala IBB (Figura 28.F), y solo se recuperó hasta la puntuación de  $1,5 \pm 1,5$  en la escala IBB (Figura 28.G). Esto supuso unos déficits comportamentales similares al grupo de 50 KDynes, pero en este caso solo se recuperó parcialmente la capacidad de adaptar la mano al cereal. Para encontrar la contusión óptima que reduzca la destreza manual en un grado recuperable, parcial pero no totalmente, de forma espontánea, se comparó la evolución de la puntuación IBB entre días. El análisis Two-Way ANOVA reveló una interacción entre el factor grupo de fuerza X día ( $F_{(4,6)}=20,78$ ,  $P=0,0012$ ) mostrando diferencias en grupo de 50 KDynes, entre los valores preoperatorio y 7 dpo ( $P=0,0006$ ), 7 dpo y 14 dpo ( $P=0,0064$ ), pero no entre preoperatorio y 14 dpo (Figura X.H). También se observaron diferencias en el grupo de 60 KDynes entre los valores preoperatorios con 7 y 14 dpo ( $P=0,0003$  y  $0,0004$ ), pero no fueron observadas entre los días postoperatorios.

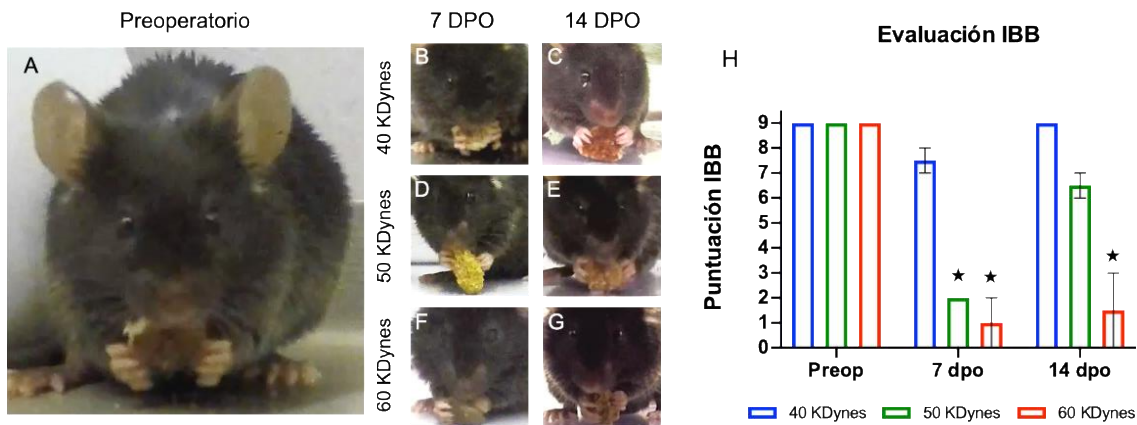


Figura 28: Evaluación de la destreza manual por el método IBB. Un animal sin lesión manipula los cereales con ambas manos adaptadas a la pieza de comida (A). Las lesiones de 40 KDynes no muestran déficits a los 7 DPO (B) ni a los 14 DPO (C), mientras que las lesiones de 50 y 60 KDynes provocan una disminución del contacto de la mano lesionada a los 7 DPO (D y F) que se recupera parcialmente a los 14 DPO (E y G). La puntuación IBB obtenida en cada caso se muestra en la gráfica H, en la que se observan diferencias entre los animales que recibieron una lesión de 50 y 60 KDynes a los 7 DPO y 60 KDynes a los 14 DPO con respecto a sus puntuaciones preoperatorias.

Estos resultados muestran como la lesión de 40 KDynes provoca una ligera disminución en la destreza manual que se recupera por completo después de 2 semanas después de la lesión. Por el contrario, la lesión de 60 KDynes disminuye casi por completo la capacidad manipuladora del animal que no se recupera después de 2 semanas. Sin embargo, la lesión de 50 KDynes disminuye la destreza manual de una forma moderada, la cual es capaz de recuperarse parcialmente de forma espontánea, sin recuperarse por completo, echo que permite observar el efecto de la rehabilitación cuando se aplica.

## 2.2 Efectos de rehabilitación específica en la recuperación de la destreza manual en ratones con contusión cervical

El 2º experimento de este capítulo pretende analizar los efectos de la rehabilitación específica después de una LME cervical por contusión en ratones. Se incluyeron 25 ratonas hembra de la cepa CBL57/6 que se entrenaron en la tarea de R&G y posteriormente se les

infligió una LME por contusión de 50 KDynes lateralizada en el lado de su pata preferente. Después de 3 días de recuperación el Grupo 1 recibió rehabilitación diaria (Grupo Rehab, N=21) mientras que el Grupo 2 (Grupo No Rehab, N=4) no recibió rehabilitación, durante 4 semanas. Ambos grupos fueron evaluados a través de la tarea de R&G el día 3, 5, 7, 14, 21 y 28 postoperatorio. Después de 4 semanas de evaluación postoperatoria los animales fueron sacrificados (Figura 29). El tejido se encuentra en proceso de análisis.

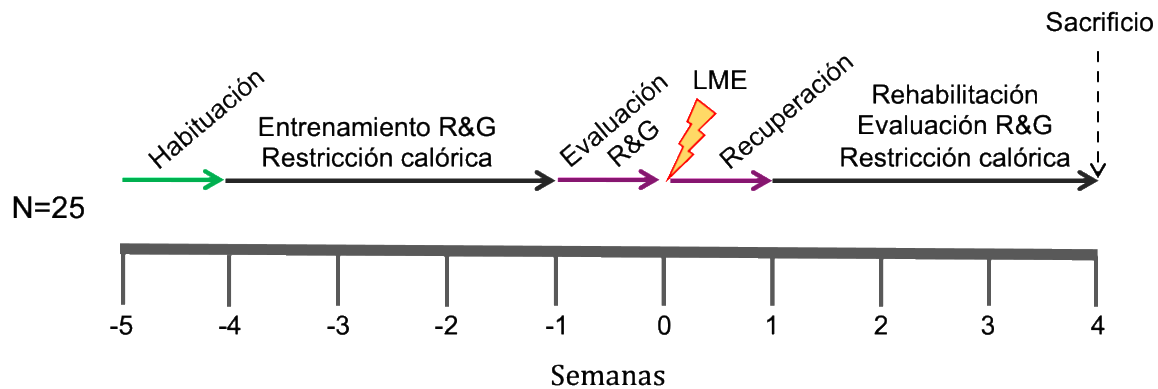
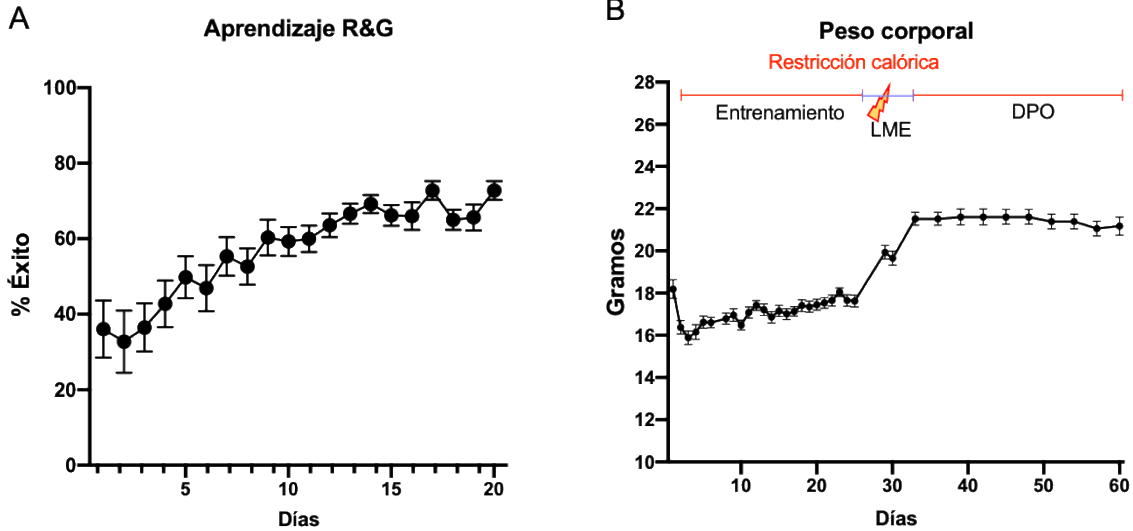


Figura 27: Esquema temporal del diseño experimental

### 2.2.1 Entrenamiento R&G

Se incluyeron 26\* ratonas hembra en el entrenamiento de R&G. Después de una semana de habituamiento, se inició el programa de entrenamiento. Tras 20 sesiones de entrenamiento todos los animales habían aprendido la tarea y alcanzaron un promedio de  $75,9 \pm 2,2$  % en el porcentaje de éxito (Figura 30.A APRENDIZAJE). Para que los animales tuvieran un interés elevado en aprender la tarea, se aplicó una restricción calórica que se mantuvo durante todo el experimento, exceptuando unos días antes y después de la LME. La restricción calórica permitió un crecimiento normal de los animales hasta el final del experimento con un valor de  $19,8 \pm 0,3$  gramos (Figura 30.B.PESO). \*Una ratona falleció después de la cirugía, por lo que el experimento se realizó con 25 animales.



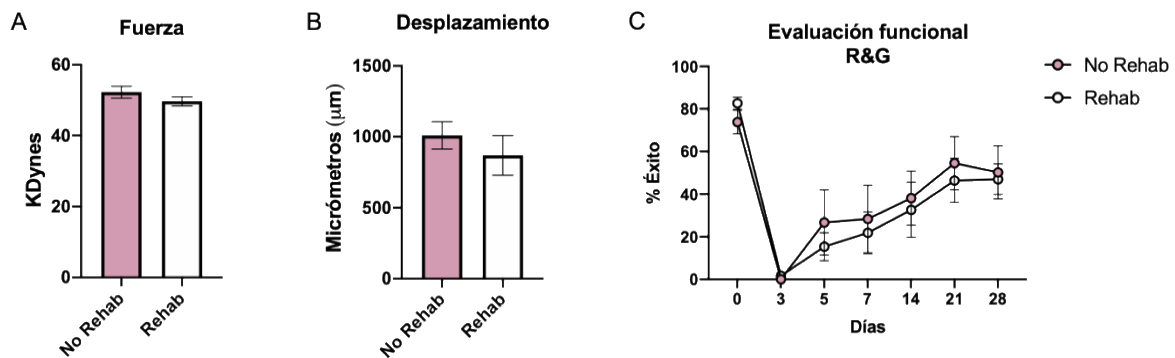
**Figura 28: Entrenamiento de R&G en ratones.** Los animales alcanzaron un  $75,9 \pm 2,2$  % de éxito en la tarea después de 20 sesiones de entrenamiento (A). La restricción calórica se inició al principio del entrenamiento, se interrumpió unos días antes de la lesión (LME=Rayo) y se reinició después de la recuperación de los animales a la lesión hasta el final del experimento.

### 2.2.2 Lesión de médula espinal por contusión

La contusión cervical de 50 KDynes se realizó después de las 20 sesiones de entrenamiento, lateralmente en el lado preferente de cada animal, tal y cómo se determinó en el primer experimento del presente capítulo. La fuerza ejercida en el impacto fue de  $52,25 \pm 1,65$  KDynes en el grupo de No Rehab y de  $51,23 \pm 0,56$  KDynes en el grupo de Rehab (Figura 31.A), con un desplazamiento de  $1071 \pm 135$   $\mu\text{m}$  y  $890,77 \pm 96,98$   $\mu\text{m}$  en los grupos de No Rehab y Rehab, respectivamente (Figura 31.B).

### 2.2.3 Evaluación Funcional de R&G

Después de 3 días de la LME, el número de pellets ingeridos se redujo a 0 en casi todos los animales. En concreto, 8 animales no disminuyeron su % de éxito en la tarea de R&G siendo superior al 10 %. Estos animales fueron excluidos del estudio, todos ellos pertenecían al grupo de Rehab (Grupo de Rehab  $N_{\text{final}}=13$ ). Después de 4 semanas de rehabilitación diaria, el porcentaje de éxito de la tarea de R&G que se alcanzó en el grupo de Rehab fue de  $47 \pm 6,8 \%$ , mientras que el grupo de No Rehab mostró un  $50,2 \pm 12,5 \%$  de éxito. El análisis estadístico Mixed-effects no mostró ningún efecto de la rehabilitación ni interacción con el factor tiempo ( $F(1, 10) = 0.2595$ ;  $F(6, 53) = 0.7205$ ), sin embargo, el efecto del factor tiempo sí fue significativo a partir del día 14 postoperatorio ( $F(2.418, 21.36) = 27.69$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 31.C).



**Figura 29: Lesión de médula espinal por contusión y su evaluación funcional.** Los parámetros de la contusión medidos fueron la fuerza (A) y el desplazamiento (B), que fueron equiparables entre grupos (Rosa: No Rehab y Blanco: Rehab). La evaluación funcional tampoco mostró diferencias entre grupos (C).

Tras este experimento se concluye que se necesitan 20 sesiones de entrenamiento para alcanzar un 75 % de éxito en la tarea de R&G. También se concluye que, a pesar de que la rehabilitación haya consistido en una tarea específica, la intensidad de la rehabilitación ha sido insuficiente por lo que no se han observado cambios entre los dos grupos de rehabilitación. Los siguientes experimentos que se realicen deberían tener en cuenta que la rehabilitación no solo debe ser específica, también debe tener un nivel de intensidad moderado para hacer un efecto.

### 3 Evaluación del efecto de diferentes terapias de rehabilitación en la recuperación de la destreza manual disminuida tras una contusión medular cervical en ratas.

El objetivo del último experimento de esta tesis fue estudiar el efecto de la especificidad de la tarea de rehabilitación sobre la habilidad motora que se quiere recuperar. Para ello se implementaron y caracterizaron tres modelos de rehabilitación de la función manual tras la lesión medular, comparando después sus efectos en la recuperación de la tarea de R&G.

En concreto se incluyeron 30 ratas hembra de la cepa Long Evans a las que se entrenó para la tarea de R&G (Figura 30). Las seis ratas que no aprendieron la tarea conformaron el grupo Sham. Al resto de animales se les provocó una lesión medular lateralizada en su lado preferente por contusión de 90 KDynes. Debido a que en el primer experimento la lesión de 100 KDynes, la recuperación de la función fue muy baja ( $\approx 20\%$ ) se decidió hacer una contusión con una pequeña reducción de la fuerza aplicada (90 KDynes). Tras la LME se distribuyó a los animales en 4 grupos de rehabilitación de 6 individuos/grupo. El primer grupo (CNT) no recibió ninguna rehabilitación diaria, el segundo grupo realizó la manipulación de cereales como tarea rehabilitadora (Cheerios), el tercer grupo recibió una rehabilitación diaria consistente en la tarea de Staircase y el cuarto grupo, en la tarea de R&G. Las rehabilitaciones se realizaban cada día (5 días/semana) por cada uno de los animales desde el 7º DPO hasta el final del experimento, a los 91 DPO. Los animales CNT recibieron una manipulación similar por parte del entrenador al del resto de los grupos. La ejecución de la tarea de R&G fue cuantificada en todos los grupos el día 7, 14 y cada 2 semanas postoperatorias. También fueron cuantificadas las 3 tareas de rehabilitación al principio (10 DPO), en un tiempo intermedio (42 DPO) y al final del experimento (91 DPO). Al final del experimento se evaluó la apertura digital durante la locomoción. Tras la perfusión con PFA al 4%, se diseccionó la médula para, mediante cortes transversales, evaluar el daño tisular a través de tinciones que permiten la cuantificación de la preservación del tejido (SB y SG).

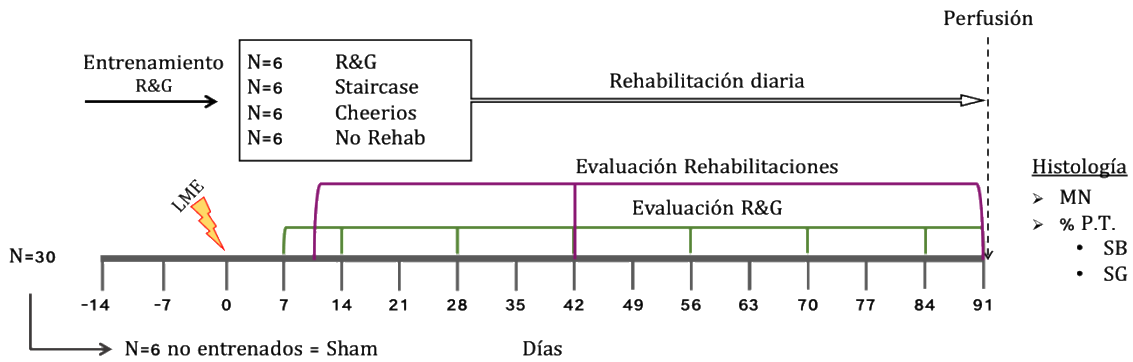


Figura 30 Representación temporal del diseño del experimento 3. MN: Motoneuronas; % P.T: Porcentaje de preservación tisular; SB: Sustancia Blanca; SG: Sustancia Gris.

### 3.1 Entrenamiento de R&G

31 ratas hembra de la cepa Long Evans se incluyeron en el entrenamiento diario de R&G. Los animales que durante 22 sesiones aprendieron la tarea ( $N_{total}=25$ ) alcanzaron un  $75 \pm 1,75$  % de éxito (Figura 31). Los animales que no aprendieron fueron constituyeron el grupo de control histológico o Sham ( $N=6$ ).

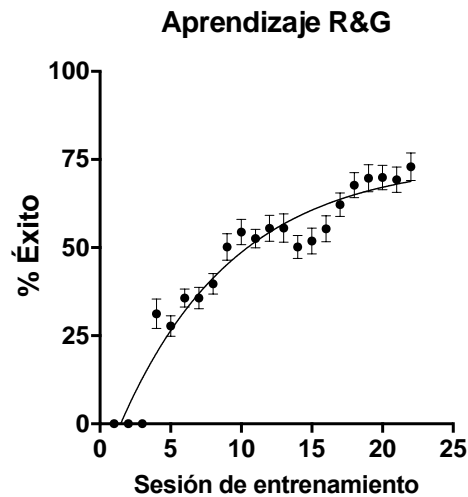
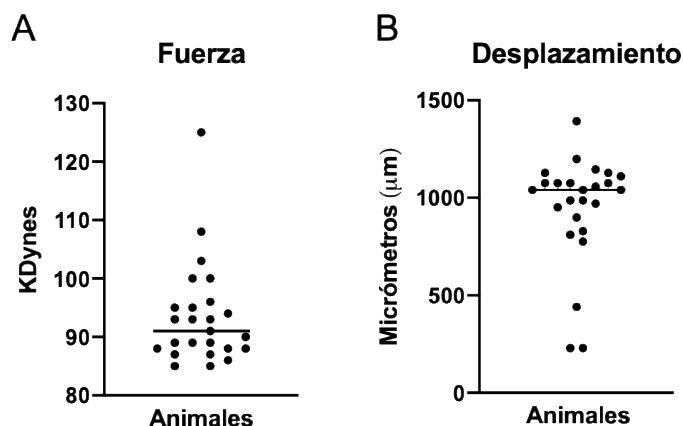


Figura 31: Proceso de aprendizaje de Reaching & Grasping. Antes de la lesión todos los animales aprendieron a alcanzar y agarrar con un  $75 \pm 1,75$  % de éxito tras 22 sesiones de entrenamiento.



### 3.2 Lesión de médula espinal por contusión

Una vez que los animales alcanzaron el *plateau* de aprendizaje de R&G, recibieron una contusión de 90 KDynes (media real de  $93 \pm 8,9$ ) en la superficie lateral del segmento medular C5 (Figura 32.A), generando un desplazamiento de  $947,68 \pm 55,6 \mu\text{m}$  del contusionador sobre el parénquima medular (Figura 32.A), afectando principalmente al funículo lateral del segmento espinal C5, ipsilateral a la pata preferente utilizada para R&G.



**Figura 32: Parámetros de la contusión medular.** (A) Fuerza realizada y desplazamiento generado(B) en la contusión medular de los 24 animales.

La caracterización histopatológica de la lesión se realizó comparando muestras de todos los animales lesionados ( $n=25$ ) con los animales control ( $n=6$ ) al finalizar el seguimiento funcional. La histología mostró que el epicentro de la lesión afectó mayoritariamente al área dorsal y lateral del funículo lateral de la sustancia blanca, con una afectación variable de la sustancia gris, principalmente en la región medial, en algunos casos en el asta dorsal, llegando a eliminarla casi por completo (Figura 36.rat5stairc), y con menor frecuencia en el asta ventral (Figura 33 .rat 28). Los funículos ventrolaterales y dorsales, así como el lado de la médula opuesto a la lesión, no se vieron afectados. Sobre las muestras histológicas se cuantificó la preservación de tejido para la sustancia gris y blanca: en promedio al final del procedimiento la preservación de la sustancia gris corresponde al  $35,58 \pm 4,08 \%$  y la de la sustancia blanca al  $79,78 \pm 2,48 \%$  Figura 36.sb-sg

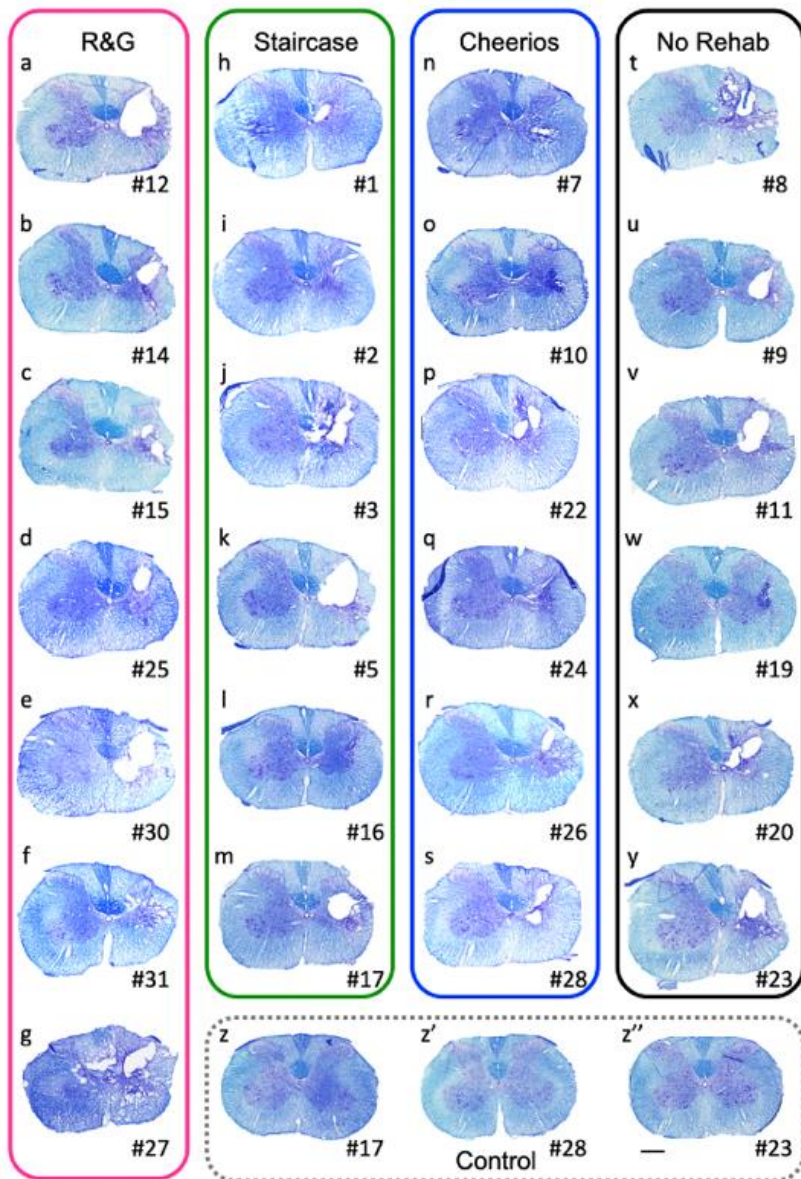
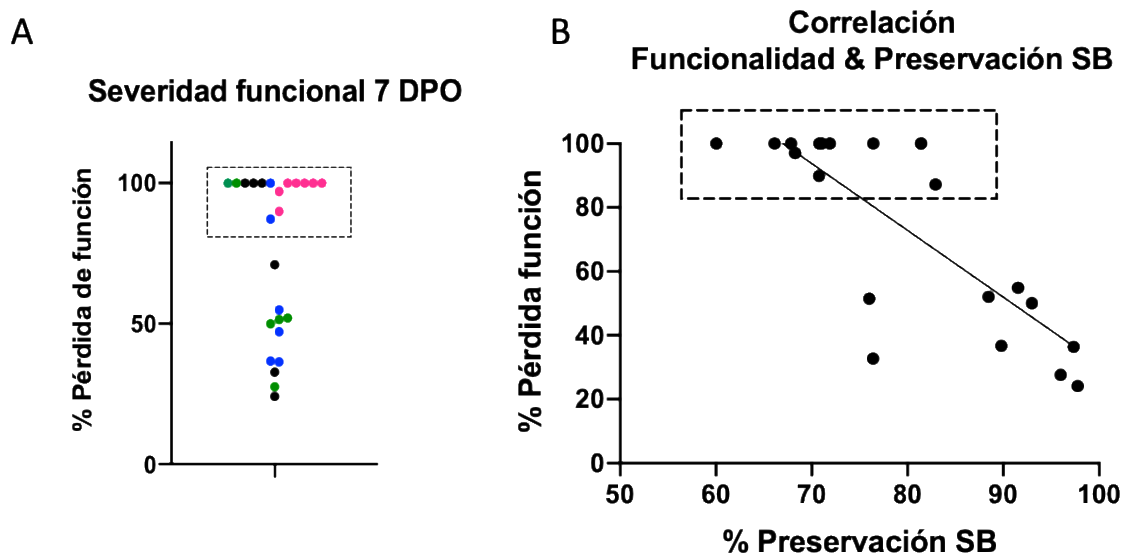


Figura X: Histología de los grupos experimentales No Rehab, R&G, Staircase y Cheerios. Secciones medulares de 35  $\mu\text{m}$  teñidas con violeta de cresilo (SG) y fast blue (SB) del epicentro de cada animal que compone cada grupo (a'-w'). (B) Resultados del % de éxito en la tarea de R&G a los 7 días después de la lesión de todos los animales juntos, la línea de puntos establece el criterio arbitrario de separación de subgrupos según si su puntuación es  $<$  o  $>$  al 10 % de éxito. (C) Representación gráfica de la correlación existente entre los resultados de la evaluación funcional de R&G a los 7DPO (% éxito 7DPO) con la preservación de sustancia blanca (% Preservación SB) ( $R= 0,592$ ;  $P<0,001$ ). (D) Diferencias entre la preservación del tejido de los animales agrupados según el criterio del 10% de éxito, los que realizaban  $<10\%$  de éxito (azul) o  $>10\%$  de éxito (naranja). Las estadísticas mostraron diferencias significativas en la preservación de sustancia blanca entre los grupos ( $P<0,05$ ). Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

La caracterización funcional de la lesión se realizó a los 7 DPO. Algunos animales redujeron totalmente su porcentaje de éxito, mientras que otros preservaron un grado variable de éxito entre el 20 y el 60 %. La distribución de la afectación funcional entre los diferentes grupos de rehabilitación fue heterogénea (Figura 34.A). Por ello, se exploró la correlación entre la severidad histológica y la severidad funcional de la lesión. Si bien en términos generales la severidad funcional es mayor para valores menores de la preservación de sustancia blanca con un P valor <0,0001, los dos parámetros presentan un coeficiente de correlación lineal de  $R^2=0,623$  (Figura 34.B). Sobre esta base, y a posteriori de los procedimientos experimentales, se decidió dividir los animales según si tenían una pérdida relativa de funcionalidad superior al 85%, lo que se corresponde con un porcentaje de éxito absoluto en R&G a 7DPO inferior al 10% y una preservación de sustancia blanca en el hemisferio de la lesión en torno al 75% (con notables excepciones, tanto de casos con alta preservación de la sustancia blanca y alta pérdida de funcionalidad, como de casos con baja preservación de la sustancia blanca y baja pérdida de la funcionalidad). Esta división resulta en 11 animales con pérdida de funcionalidad inferior al 85%, a lo que se denominará en adelante **lesión leve**, y 14 animales con pérdida de funcionalidad superior al 85%, que se denominará en adelante **lesión severa** (Figura 34, región incluida en el rectángulo destacado).



**Figura 34: Caracterización funcional de la lesión a los 7 DPO.** (A) Severidad de la lesión y (B) la correlación entre la funcionalidad y la histología.

### 3.3 Rehabilitación

#### 3.3.1 Programas de rehabilitación

Durante los tres meses tras la lesión, se aplicó y evaluó el efecto de tres tipos de tarea rehabilitadora en la recuperación de la destreza manual de los animales lesionados. Cada grupo de animales realizó un tipo de tarea y los tres grupos se compararon entre sí y con el grupo de animales sin rehabilitación (No Rehab). En las tres tareas de rehabilitación se requiere el uso de las extremidades delanteras, tanto de la musculatura proximal como de la de la muñeca y los dedos. No obstante, aunque los movimientos implicados en cada tipo de rehabilitación utilicen los mismos músculos, al tratarse de movimientos diferentes el patrón de activación neuromuscular (la secuencia concreta de activación muscular y la activación nerviosa que la controla) es diferente en cada tarea.

En la tarea de R&G, el roedor tiene que elevar el brazo del suelo, alargarlo a través de una abertura, abrir los dígitos de la mano, cerrarlos agarrando un pellet, retraer el brazo mientras realiza una supinación que lleve la comida a la boca y abrir los dedos para soltar el pellet.

En la tarea Staircase, la secuencia de gestos que realiza el roedor es muy similar que en el R&G, pero requiere fuerzas diferentes en cada gesto debido al efecto de la gravedad (véase la descripción en la sección de Materiales y Métodos).

En la tarea de manipulación de cereales o Cheerios, el roedor realiza dos secuencias de movimientos consecutivas: (I) coge el cereal con la boca, se sienta para liberar sus brazos, los eleva y agarra el cereal con las dos manos; (II) se lo va comiendo acercándolo y alejándolo de la boca con leves flexiones y extensiones del codo y girándolo con las manos (lo que implica abrir y cerrar los dedos en una posición supina mantenida).

#### 3.3.2 Dosis de rehabilitación

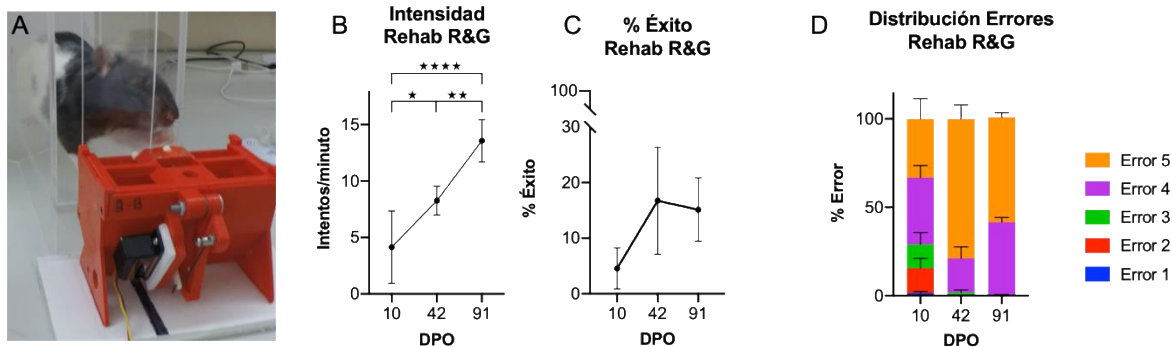
Si bien a fin de comparar el efecto de las diferentes tareas de rehabilitación se intentó administrar dosis equivalentes de cada tarea rehabilitadora (ver Materiales y Métodos), el diseño de las tareas permitió a cada animal cierto control de la cantidad y la intensidad de rehabilitación: en R&G los animales recibían un pellet cuando tenían éxito en agarrar y comer el anterior, por lo que el número total de pellets en 20 minutos, es decir, la intensidad, dependió de la velocidad de cada animal; en el caso de la rehabilitación de

Staircase se fijó un tiempo total de 20 minutos, pero los animales disponían de tantos pellets como pudieran alcanzar y consumir en ese tiempo. Además, en caso de fallo, los pellets volvían a caer a los escalones del setup, permitiendo un número indefinido de repeticiones sucesivas. Nuevamente, la intensidad real dependió de la frecuencia con que cada animal realizaba un nuevo intento. Por último, en el caso de la rehabilitación de Cheerios, se fijó el número total máximo de cereales que un animal podía llegar a manipular y consumir en 15 y el tiempo máximo de duración de la sesión en 20 minutos, aunque tanto el número total efectivamente manipulado y consumido como el tiempo empleado dependieron nuevamente del comportamiento de cada animal. En resumen, se observó que existe una variabilidad importante de la dosis e intensidad de la rehabilitación, en función de la capacidad y la motivación (puesto que el ritmo de ejercicio de cada animal es voluntario en estos diseños de tarea rehabilitadora).

### 3.3.3 Seguimiento de la rehabilitación

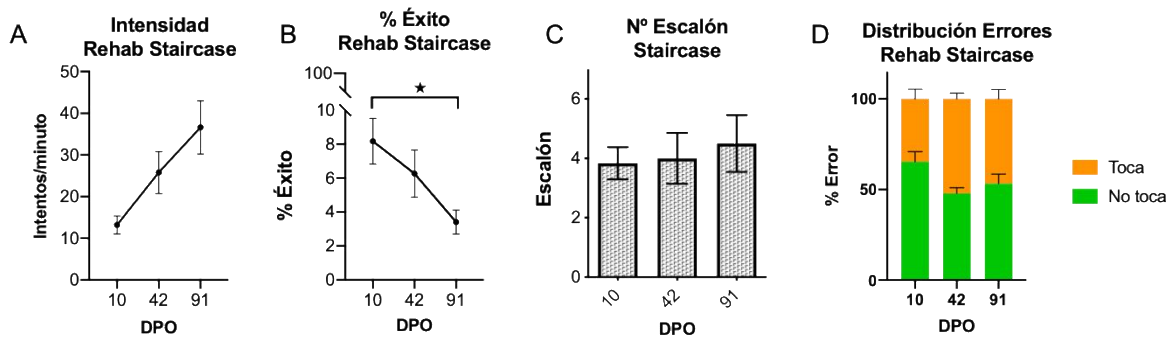
#### Reaching & Grasping

En el grupo de rehabilitación **R&G** (Figura 35.A), todos los animales (n=7) presentaron una lesión severa (Ver apartado sobre LME de este estudio). En esta rehabilitación se definieron tres KPIs: (I) la intensidad de la rehabilitación, (II) el porcentaje de éxito y (III) la distribución en tipos de los errores. De los 7 animales, dos se han excluido de los resultados agregados (ver discusión). A los 10 DPO los animales realizaron la tarea con una intensidad promedio de  $4,13 \pm 1,44$  intentos/minuto. A medida que avanzó la rehabilitación, la intensidad aumentó hasta  $13,57 \pm 0,84$  a los 91 DPO, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los 3 puntos temporales (Figura 35.B). El porcentaje de éxitos aumentó ligeramente a largo del periodo de evaluación, desde un  $4,5 \pm 3,6$  % de éxito a los 10 DPO, hasta un  $15,1 \pm 5,7$  % a los 91 DPO (Figura 35.C). La distribución de los errores que se fue homogeneizando hacia desde la aparición de todo tipo de errores a los 10 DPO hasta la prevalencia de los errores en los movimientos finales de la secuencia (Error 4 y 5) a los 91 DPO (Figura 35.D).



## Staircase

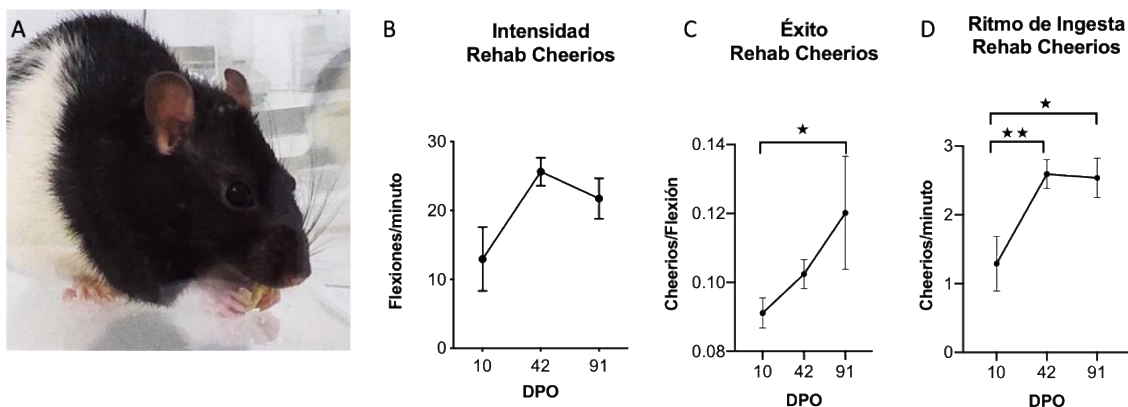
En el grupo de rehabilitación **Staircase** cuatro animales presentaron una lesión leve y dos, una lesión grave. En esta rehabilitación se definieron cuatro KPIs que se resumen a continuación: (I) la intensidad de la rehabilitación, (II) el porcentaje de éxito, (III) el escalón más bajo alcanzado y (IV) la distribución de los errores. La intensidad fue creciente a lo largo de la rehabilitación desde  $13,22 \pm 2,14$  intentos/minuto a los 10 DPO hasta  $36,64 \pm 6,39$  intentos/minuto a los 91 DPO (Figura 36.A). El porcentaje de éxito decreció desde  $8,17 \pm 1,34$  % a los 10 DPO hasta  $3,41 \pm 0,71$  % a los 91 DPO (Figura 36.B). El escalón más bajo alcanzado por los animales se mantuvo constante en promedio (Figura 36.C) si bien los datos individualizados muestran que todas las ratas, excepto una, lograron alcanzar escalones más bajos a lo largo de la rehabilitación. La contribución de este animal, que en los días 42 y 91 no logró alcanzar ningún escalón sesga los datos promedio. En cuanto a la distribución de los errores, los animales mejoraron levemente, pasando de llegar a tocar los pellets en un  $34,65 \pm 5,50$  % de los intentos fallidos a hacerlo en un  $46,78 \pm 5,26$  % de ellos (Figura 36.D). La tendencia de estos KPIs no cambia significativamente si se consideran por separado los animales con lesión grave y los animales con lesión leve.



**Figura 36: Rehabilitación basada en Staircase.** Los animales de este grupo cogían pellets de unas escaleras con la mano. Durante la ejecución de la rehabilitación se evaluó la intensidad (A), el porcentaje de éxito (B), el nº de escalón más bajo que es capaz de alcanzar (C) y la distribución de los errores cometidos (D) en los días 10, 42 y 91 después de la lesión. ★ =  $P < 0,05$ .

## Cheerios

En el grupo de rehabilitación **Cheerios** (Figura 37.A) cuatro animales tuvieron una lesión leve y dos una lesión grave. Para esta rehabilitación se definieron tres KPIs que se resumen a continuación: (I) intensidad de la rehabilitación, (II) el éxito (III) el ritmo de la ingesta. La intensidad aumentó desde  $12,59 \pm 2,92$  flexiones/minuto a los 10 DPO hasta  $25,63 \pm 2,04$  flexiones/minuto a los 42 DPO y se estabilizó en  $21,74 \pm 2,92$  flexiones/minuto a los 91 DPO (Figura 37.B). El éxito aumentó a lo largo de la rehabilitación desde  $0,083 \pm 0,006$  cheerios/flexión a los 10 DPO hasta  $0,12 \pm 0,011$  cheerios/flexión en el punto final de 91 DPO (Figura 37.C). El ritmo de ingesta se elevó drásticamente desde  $1,29 \pm 0,40$  cheerios/minuto a los 10 DPO hasta  $2,59 \pm 0,21$  cheerios/minuto cuando alcanzaron los 42 DPO, manteniéndose a  $2,54 \pm 0,29$  cheerios/minuto a los 91 DPO (Figura 37.D).



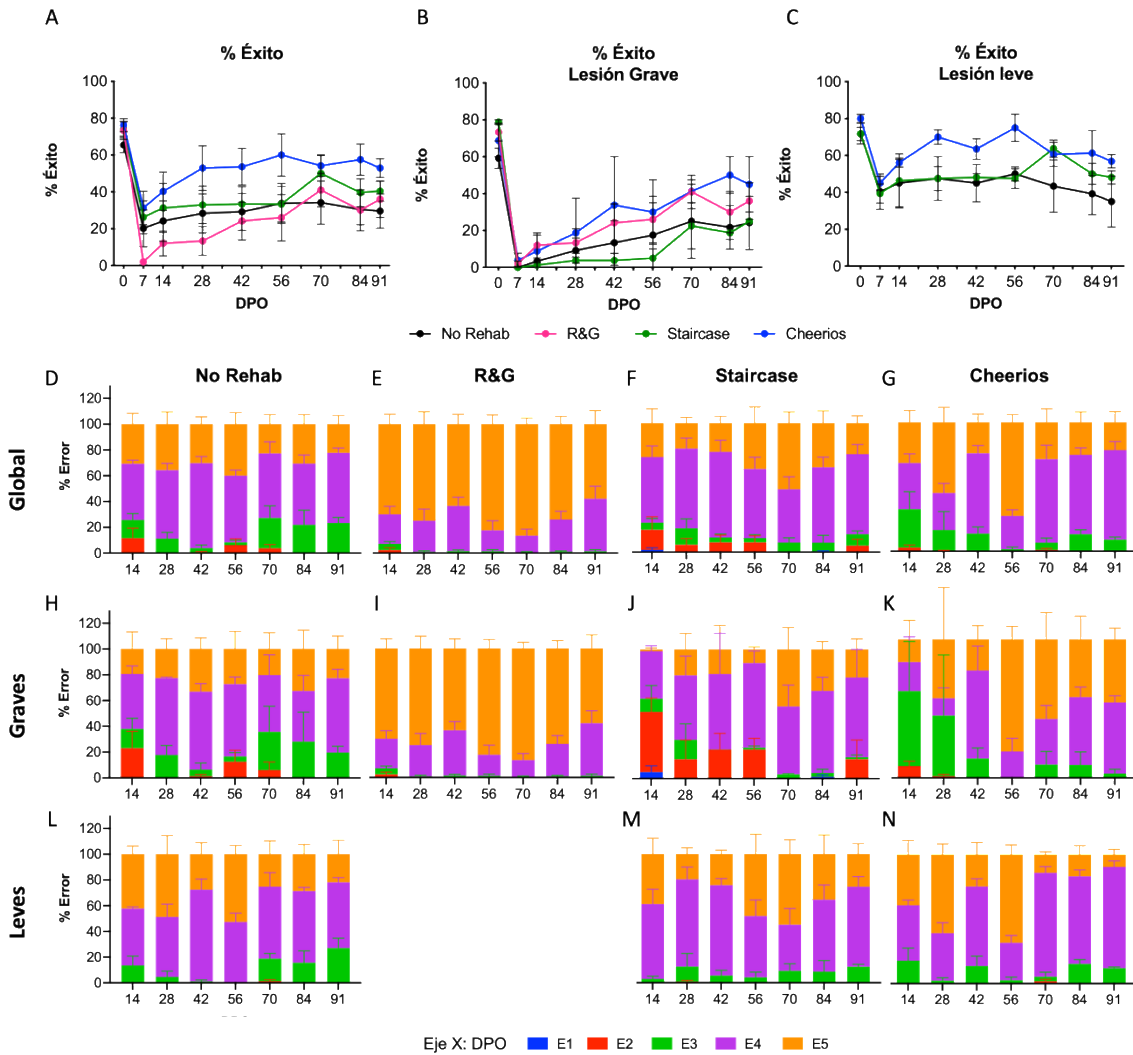
**Figura 37: Rehabilitación de Cheerios.** Los animales comían cereales que cogían con la boca y manipulaban con las manos (A). Durante la ejecución de la rehabilitación se evaluó la intensidad (B), el éxito (C) y el ritmo de ingesta (D) en los días 10, 42 y 91 después de la lesión. ★= P<0,05 ★★=P<0,001.

### 3.4 Efecto de la rehabilitación

La destreza manual se evaluó, mediante el test de Reaching & Grasping, antes de la lesión y cada dos semanas desde 7 DPO hasta 91 DPO, además para observar con mayor detalle los efectos agudos de la rehabilitación se evaluó también a 14 DPO. Se cuantificaron el porcentaje de éxito (Figura 38.A-C) y la distribución de los errores (Figura 38.D-N) para cada grupo de rehabilitación. Aunque algunos grupos muestran un porcentaje de éxito más elevado a lo largo de la evaluación, estas diferencias no resultaron significativas entre grupos ni con el control (grupo de No Rehab) (Figura 38.A). Para profundizar en el análisis se subdividió cada grupo entre animales con lesión grave y animales con lesión leve. En el caso de la lesión grave, el porcentaje de éxito tras la lesión estuvo por debajo del 10% en todos los grupos y la evolución mantuvo una tendencia creciente en todo el periodo observado (Figura 38.B). En contraste, en el caso de la lesión leve, todos los grupos tuvieron un porcentaje de éxito tras la lesión alrededor del 40% y la evolución se vuelve decreciente a partir de la mitad del periodo observado (Figura 38.C). Con respecto a la evolución en la distribución de los tipos de error en cada grupo. Las tres rehabilitaciones muestran un patrón de evolución diferente del grupo No Rehab. En el caso de R&G los errores más severos desaparecen desde el principio de la rehabilitación, siendo el error más prevalente el de tipo 5 y aumentando ligeramente la proporción del error 4 hacia el final de la rehabilitación. En el caso del grupo Staircase el patrón es el más parecido al de No Rehab: los errores más severos permanecen durante todo el proceso, los errores más prevalentes son el 4 y el 5 y hay una ligera tendencia creciente de los errores menos severos que se invierte hacia el final (Figura 38.F). El grupo de Cheerios también sigue un patrón parecido al de No Rehab aunque con un descenso más marcado a lo largo del proceso del error de tipo 3, también presenta una tendencia al aumento del error de tipo 5 en la primera



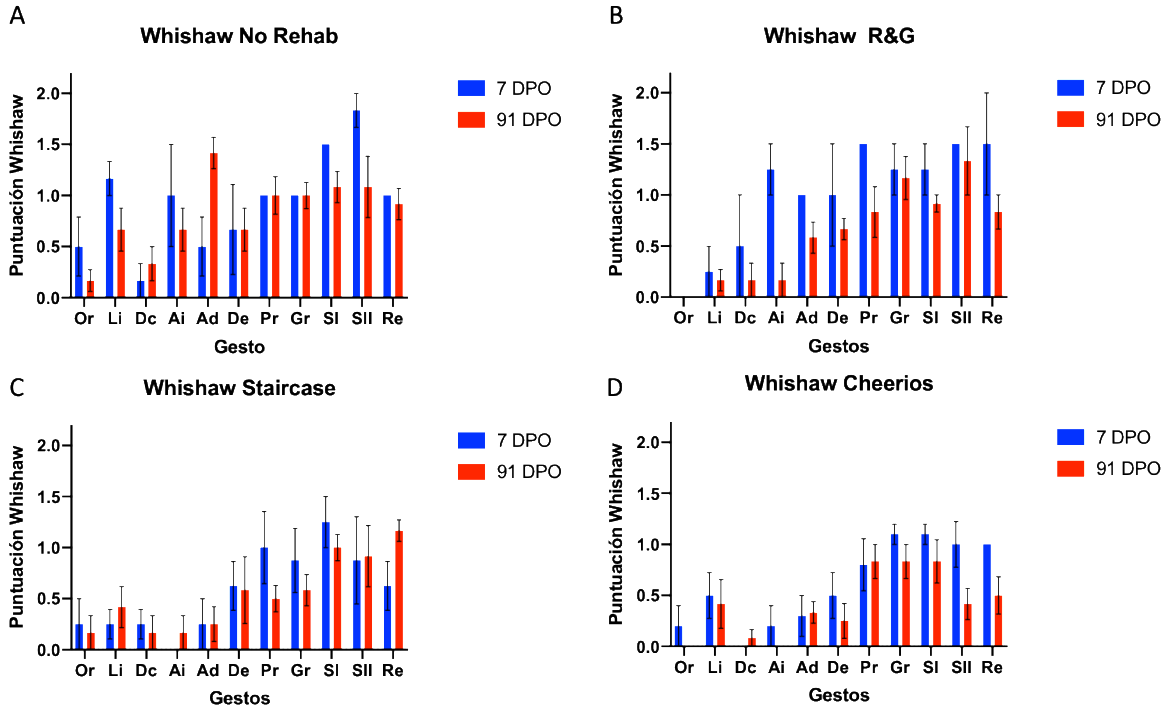
mitad del periodo que disminuye marcadamente en favor del error de tipo 4 hacia el final (Figura 38.G). Los datos que muestran la evolución de los animales con lesiones más graves muestran patrones diferentes entre ellos. En el grupo de No Rehab se observa un patrón global muy similar al de los datos globales (Figura 38.H). En el caso del grupo de R&G los datos son los mismos que los globales, ya que todos los animales de este grupo tuvieron una lesión grave (Figura 38.I). Los animales con lesión grave del grupo de Staircase tuvieron la prevalencia más alta de los errores más severos de todos los grupos durante toda la rehabilitación, mientras que, entre los errores menos severos, prevaleció el error 4 sobre 5 (Figura 38.J). En el grupo de Cheerios la prevalencia de errores severos fue disminuyendo desde el principio de la rehabilitación hasta la mitad de la misma, tendencia que se revirtió parcialmente hacia el final de la evaluación, donde prevalecieron los errores menos severos (Figura 38.K). Los gráficos de los animales con lesiones leves presentan una evolución temporal muy similar: los errores más severos no se observan en todo el proceso, siendo el error de tipo 3 el más severo observado en estos grupos. El grupo de No Rehab con lesión leve no presentó errores de tipo 1 y 2 en todo el proceso de rehabilitación (Figura 38.L). En cuanto a su evolución, las proporciones de cada error se mantiene aproximadamente constantes durante todo el periodo con una tendencia a aumentar con un ligero aumento en la proporción de los errores 4 y 5 hacia 56 DPO que se invierte en las observaciones posteriores. La evolución del grupo de Staircase es prácticamente idéntica al grupo de No Rehab (Figura 38.M). El grupo de Cheerios es muy similar al resto de los grupos leves exceptuando que, a partir de la segunda mitad de la evolución, hay una prevalencia notable del grupo 4 con respecto al resto de errores (Figura 38.N).



**Figura 38: Efecto de la rehabilitación en la destreza manual.** Se muestra la evolución temporal del porcentaje de éxito en R&G global (A), y separando lesiones graves (B) y leves (C) para cada tipo de rehabilitación. (D-N) Evolución de la distribución de los tipos de errores para cada tipo de rehabilitación con agrupación global (D-G), por lesión grave (H-K) y por lesión leve (L-N).

### 3.4.1 Análisis de Whishaw

De los 11 gestos en los que se descompone el análisis de Whishaw con una puntuación entre 0 y 2 en orden creciente según los déficits en el gesto, las únicas diferencias que se han encontrado entre el día 7 y el 91 postoperatorio intragrupales han sido en el grupo de rehabilitación de R&G, en el que el gesto de alcance se ha mejorado significativamente durante la rehabilitación desde  $1,25 \pm 0,25$  a los 7 DPO hasta  $0,167 \pm 0,167$  a los 91 DPO ( $*p < 0,05$ ) (Figura 39). El resto de los grupos no muestran mejoría en ninguno de los gestos.



**Figura 39: Análisis de Whishaw.** Puntuaciones al inicio y al final de la rehabilitación para los 11 gestos en los que se descompone el R&G, para los grupos que recibieron diferentes rehabilitaciones. (A) Grupo de No Rehab, (B) grupo de R&G, (C) grupo de Staircase y (D) grupo de Cheerios.

## DISCUSIÓN

En esta tesis se han realizado una serie de experimentos para evaluar los efectos de la rehabilitación de las extremidades delanteras en la recuperación de la destreza manual para agarrar piezas de comida en roedores con una lesión por contusión la médula cervical.

En primer lugar, los resultados obtenidos tanto en ratas como en ratones han mostrado que es factible usar un modelo de contusión para producir lesiones reproducibles, consistentes, graduables en la severidad y que generan daño permanente en la médula espinal cervical, si bien aun existe un amplio margen de mejora en cuanto a la precisión y exactitud de las lesiones producidas. Tanto en los estudios en ratas como en ratones, las contusiones cervicales han infligido una lesión tisular que ha afectado tanto a células de la sustancia gris como a los tractos espinales exclusivamente ubicados en la zona de la contusión, provocando pérdida crónica de las habilidades de control motor fino de las extremidades delanteras de los animales. Los estudios de caracterización han evidenciado que, a diferencia de lesiones en el funículo dorsal, lesiones de los tractos presentes en la región medial del funículo lateral impiden a los animales poseer el control fino para realizar R&G aunque preserven otras habilidades motoras, como mantenerse erguidos a cuatro patas, mover los brazos, caminar y tener un movilidad casi normal. Es más, las diferencias observadas en la evolución de los roedores con las lesiones que ese han clasificado como graves y leves sugieren que es posible afectar a tractos que controlan movimientos más y menos finos dentro de la propia secuencia de R&G como apoya la observación de que los errores asociados a movimientos más groseros (errores que hemos clasificado como de tipo 1 y 2) mejoran notablemente en los animales con lesiones graves en cuyas histologías la lesión se concentra en la región dorso medial del funículo lateral. Además, se ha constatado la estrechez de la ventana de severidad para realizar estos estudios: Contusiones de poca severidad generan tan poco daño tisular que son insuficientes para provocar déficits funcionales, mientras que lesiones de mayor impacto, generan tanta lesión de sustancia blanca y gris que provocan hemiplejia de la pata ipsi-lesional, incapacitando al animal de la pata y realizar cualquier tipo de rehabilitación. De tal forma que sólo contusiones moderadas que afectan a la parte medial del funículo lateral son las óptimas para generar déficits de control motor fino, y es por ello, que ha sido el modelo de contusión para los estudios a largo plazo.

Los resultados, tanto en ratas como en ratones, muestran que la rehabilitación diaria de las patas delanteras promueve la recuperación del control de las extremidades delanteras para realizar movimientos finos, y muestran la necesidad de realizar rehabilitación específica del movimiento que se quiere mejorar. De esto modo, los estudios con ratas han mostrado que la rehabilitación de movimientos de agarre sobre una rejilla, que mimetizan, pero no son idénticos los movimientos de R&G, no llegaron a promover la recuperación funcional para realizar R&G ya que los animales no eran capaces de realizar con éxito todos los gestos que componen el movimiento de R&G. No obstante, la rehabilitación disminuye la variabilidad

del tipo de error cometido, ya que a diferencia de los animales sin rehabilitación, los animales con rehabilitación concentran la mayoría de errores en las últimas fases del ciclo de R&G, sobretodo al desplazar la pieza de chocolate al ser agarrada. Los resultados ponen de relieve que la plasticidad que la rehabilitación ha generado en el sistema neuromuscular no ha sido suficiente para recuperar de forma eficiente el control motor fino de las manos, sugiriendo la necesidad de combinarla con otras intervenciones experimentales promotoras la plasticidad, o en contra, la necesidad de optimizar la terapia rehabilitadora. Optamos por la segunda opción, con la intención de maximizar potencial que la rehabilitación pudiera ejercer sobre la plasticidad neural. Ratonos con contusión cervical incluidos en un régimen de rehabilitación específica, en la que se rehabilitó el mismo movimiento que se evaluaba (R&G) recuperaron la habilidad para realizar R&G, evidenciando que la intensidad de la rehabilitación y sobretodo los gestos empleados y repetidos en la rehabilitación determinan qué movimientos tienen posibilidad de mejora. No obstante, dado el elevado coste en tiempo que la rehabilitación específica exige, en el último estudio se comparó los efectos en la recuperación de R&G en ratas incluidas en distintas terapias de rehabilitación de las extremidades delanteras. Los resultados corroboran los obtenidos previamente en ratones, y confirman la necesidad de realizar terapias de rehabilitación que serán específicos a la tarea rehabilitar. es que la rehabilitación específica exige un coste de tiempo muy elevado, De los diferentes modelos de lesión presentes en la literatura se han descartado las de compresión, hipoxia / isquemia, distracción y dislocación debido a su baja reproducibilidad y a la dificultad de asignar un valor numérico a la intensidad del tratamiento. Las LME basadas en una hemisección de la médula espinal presentan la mayor resolución anatómica de entre los métodos considerados; sin embargo, depende en gran medida la habilidad y del entrenamiento del experimentador. Además, la hemisección, ya sea lateral o dorsal, provoca una pérdida de funcionalidad muy severa en la que los animales no son capaces de levantar ni extender la pata (146,147). Las LME basadas en contusión presentan una fisiopatología análoga a las LME más prevalentes en humanos (157). Por ello, se descartó la lesión por hemi-sección y se escogió la lesión por contusión.

## 1 Rehabilitación para la recuperación de la destreza manual

En el estudio de rehabilitación a largo plazo, mostramos que los animales con una contusión moderada en la médula espinal cervical que tuvieron rehabilitación diaria de las extremidades superiores (que consiste en alcanzar y agarrar semillas de girasol desde una rejilla) mejoraron sus habilidades de alcance tras ocho meses de rehabilitación diaria. Sin embargo, la rehabilitación fue insuficiente para promover la recuperación funcional completa del punto final, ya que los animales con y sin rehabilitación lograron una recuperación incompleta similar al usar con éxito la pata para comer pellets en la tarea de

R&G. Los gestos del movimiento, mediante el análisis de Whishaw, durante estos intentos exitosos fueron similares en ambos grupos de animales pero diferentes de los realizados antes de la lesión. Este hecho nos sugiere que la estrategia motora para realizar R&G que se adapta después de la lesión, es similar entre los animales que recibieron rehabilitación y los que no.

La mayoría de los errores producidos por los animales rehabilitados durante cada intento sucedieron en las últimas etapas del ciclo R&G, afectando la prensión y el transporte a la boca. Sin embargo, los animales no rehabilitados realizaron errores en una variedad de etapas del ciclo que incluyen la prolongación de la pata para llegar a la pastilla, el avance de la extremidad, la apertura de la pata, la prensión y la retracción de la pata. La variabilidad en la ejecución motora es un efecto común de la LME y puede contribuir al deterioro de la función motora volitiva (Little et al., 1999). Por lo tanto, interpretamos que la variabilidad reducida del error de los animales rehabilitados indica que, la rehabilitación sensoriomotora facilitó la recuperación del movimiento específico de la tarea al consolidar la planificación de la ejecución y el tipo de errores cometidos durante los intentos de alcance. El aprendizaje de una habilidad motora se asocia con una reducción en la variabilidad del circuito neuronal que controla el desempeño de una tarea motora (Ziegler et al., 2010). El entrenamiento repetitivo refuerza o debilita las sinapsis sensoriomotoras implicadas, lo que da como resultado un funcionamiento de la red neuronal con menos variabilidad (Song et al., 2000). Es importante destacar que las diferencias observadas en la variabilidad del error entre los grupos Rehabilitación y No Rehabilitación evolucionaron a lo largo del período de rehabilitación de 8 meses, volviéndose particularmente evidente al final de la rehabilitación: mientras que los animales del grupo de Rehabilitación mantuvieron una baja variabilidad a partir del tercer mes, las ratas del grupo No Rehab tendieron a aumentar su variabilidad de errores. Esto sugiere que la plasticidad dependiente de la actividad puede no limitarse a las primeras semanas después de la lesión y que las intervenciones de rehabilitación a largo plazo pueden resultar útiles incluso en las etapas crónicas posteriores a la lesión. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que explora los efectos de una rehabilitación sensoriomotora tan prolongada en roedores y sugiere que

las intervenciones basadas en la actividad pueden ser necesarias para mantener la recuperación a largo plazo (Torres-Espin et al. ., 2018).

La similitud entre los gestos realizados por los animales rehabilitados y no rehabilitados sugieren el uso de una estrategia motora común en el R&G. Después de una lesión, las ratas pueden realizar intentos exitosos desarrollando otros movimientos compensatorios, que pueden incluir la ausencia de pronación de la pata o arrastrar el pellet hacia la boca una vez agarrado (García-Alías et al., 2009; Kanagal y Muir, 2009). Se producen compensaciones similares en roedores con accidente cerebrovascular de la corteza motora (Alaverdashvili y Whishaw, 2013). Sin embargo, en este estudio no se observó ninguno de estos comportamientos. De hecho, la naturaleza de la rehabilitación debe influir en las habilidades del animal para retener o reaprender estas u otras habilidades motoras y es plausible que la inclusión de otros paradigmas de rehabilitación, como alcanzar en una escalera (Gallegos et al., 2020; Wang et al., 2011), producción de fuerza en las extremidades anteriores (Ganzer et al., 2018; Hays et al., 2013), ambiente enriquecido (Dai et al., 2009; Starkey et al., 2014), carrera de ruedas (Sandrow-Feinberg et al., 2009) y la locomoción (Prosser-Loose et al., 2015) reducirían aún más la variabilidad en los errores y mejorarían el porcentaje de éxito en el R&G. En el primer estudio, la rehabilitación consistió en alcanzar y manipular semillas de girasol desde el fondo de una rejilla, lo que previamente ha demostrado mejorar la recuperación de R&G de un solo pellet (García-Alías et al., 2009). El uso de esta tarea difería de la tarea de R&G, que se utilizó exclusivamente para evaluar la recuperación de la destreza. Por el contrario, para rehabilitar la destreza manual se utilizó el estiramiento en una rejilla y, de manera similar a las tareas empleadas en los centros de rehabilitación humana, se alentó a los animales a realizar estos movimientos solo después de recibir la lesión.

El análisis anatómico del daño tisular indica que la función de la destreza manual puede disminuir drásticamente dañando solo ~ 50% del tejido del hemicordio espinal en el segmento medular C5, afectando principalmente la región dorsal y medial de los funículos laterales y parcialmente la materia gris y extendiéndose sólo 1,5 mm rostral y 1,5 mm caudal al epicentro.

Infligimos una hemicontusión controlada con el método estandarizado de **Horizon Impactor** (Scheff et al., 2003) debido a la similitud con la fisiopatología causada en las LME en humanos, lo que la hace idónea para la investigación traslacional (158).

Se pueden infligir lesiones de gravedad gradual aumentando la fuerza aplicada a la médula espinal (159,160) . Se tuvo especial cuidado para elegir la fuerza de contusión adecuada, ya que no se pretendía impedir la movilidad de las extremidades anteriores del animal o, por otro lado, no ejercer ningún efecto sobre la función R&G. Otros estudios han mostrado una extensión de la lesión comparable (2 a 6 mm) con contusiones similares.

Es importante destacar que las interneuronas y motoneuronas se conservaron completamente a 1,5 mm por debajo del sitio de la lesión, en la médula espinal ipsilesionada. Esto sugiere que los grupos de motoneuronas de los músculos distales de las extremidades anteriores permanecieron preservados (140). Por lo tanto, las alteraciones de la extensión y flexión de los dedos observadas durante el R&G y la locomoción no se debieron a la pérdida neuronal local, sino a la falta de conectividad funcional entre los circuitos neuronales necesarios para el rendimiento del R&G.

Tras observar la preservación del tracto corticoespinal y de la función locomotora, controlada por los axones reticuloespinales de la región ventral de los funículos laterales, suponemos que las vías descendentes que controlan el R&G transcurren por la región medial de los funículos laterales (158).

Los estudios con lesiones selectivas de la médula espinal apoyan la idea de que la parte medial de los funículos laterales, que alberga los axones descendentes del núcleo de la parte ventral de la formación reticular medular (142,143) o del tracto rubroespinal (132,144), son importantes para preservar la función de R&G.

El papel y la relación de los tractos espinales para controlar la función motora fina aún no está claro; Si bien el tracto corticoespinal ha centrado la mayor parte de la atención por ser receptor de intervenciones restauradoras, nuevos estudios destacan la plasticidad de otros tractos motores descendentes para conducir la recuperación. En comparación con otros



estudios, que probaron los déficits conductuales después de la contusión del tracto corticoespinal, en este estudio informamos el enfoque opuesto, en el que se han dañado otros tractos, pero no el corticoespinal. Aunque los funículos dorsales cervicales no estaban muy desorganizados, para obtener una interpretación concluyente, teñimos el tracto corticoespinal con PKC para corroborar su preservación a lo largo de la médula espinal cervical. Los resultados indican que la preservación del tracto corticoespinal no es suficiente para retener la destreza manual y sugiere el papel mínimo de este tracto en la función motora de las extremidades superiores de los roedores (Alstermark y Pettersson, 2014).

## 2 Contención de problemas en los protocolos de rehabilitación; La optimización continúa

A lo largo de todos los estudios hemos identificado y afrontado una serie de problemas que impedían o dificultaban el desarrollo de la rehabilitación y la evaluación de R&G. La rehabilitación de la función manual, a diferencia de la rehabilitación locomotora, presenta dos dificultades particulares. En primer lugar, los roedores, al igual que los humanos, presentan un brazo preferente para realizar R&G, y en segundo lugar, la rehabilitación es voluntaria; el animal ha de estar interesado y motivado en realizarla.

El problema más notorio ha sido el cambio de pata preferente para realizar R&G a las pocas semanas de la lesión cervical (estudio 1). Los roedores poseen una pata preferente para realizar R&G y la destreza o zurdera de cada animal queda patente a las pocas sesiones de iniciar el entrenamiento. En otros trabajos no se ha constatado el cambio de pata tras una lesión. En realidad, lo sorprendente es que animales con una lesión unilateral mantuvieran como preferente la pata ipsi-lesional, mientras que la pata contra-lesional estaba intacta. En la mayoría de los trabajos, la lesión es bilateral, por tanto, afectando a ambas patas, y se puede interpretar el innecesario cambio de pata. Dado que la lesión del funículo lateral ha resultado ser la más ha afectado las habilidades manuales, ha sido el modelo utilizado en nuestros estudios. El cambio de pata ha sido, sin duda, un factor limitante, ya que los animales han tenido que ser excluidos de la evaluación de R&G. Para paliar el uso de la pata contra-lesional se ha diseñado e implementado unas cajas de evaluación de R&G con

la ventana en una posición muy cercana a la pared lateral en vez de central (estudio 3). De este modo, el animal solo puede usar una pata (la próxima a la pared lateral) para extender la pata a través de la ventana.

El segundo problema encontrado ha sido el descenso de la motivación de los animales para realizar la rehabilitación (estudio 1). A lo largo del periodo de rehabilitación los animales mostraron un desinterés gradual por agarrar las semillas debajo de la gradilla. Nos hemos esforzado en promover el interés del animal por participar, pero con escaso éxito. Incluso estando en un régimen de restricción calórica. Con tal de controlar la cantidad de rehabilitación realizada, en los siguientes estudios se ha cuantificado la intensidad de la rehabilitación realizada por cada animal a lo largo del periodo postlesión. Esta cuantificación permite un control fino para correlacionar la cantidad de rehabilitación real realizada y el grado de recuperación funcional.

Por último, hemos observado que los animales en las jaulas de estabulario utilizan las manos para manipular los pedazos de comida. Esta actividad espontánea puede interferir no solo con la rehabilitación, sino que puede suponer una actividad para los animales de los grupos control. Los animales manipulan la comida, independientemente de su tamaño. No hemos encontrado ninguna medida correctora, pero tenemos en cuenta esta actividad en todos los animales.

## CONCLUSIONES

- Las contusiones de 50 KDynes no ejercieron una lesión suficiente para provocar déficits funcionales, con independencia de la localización. Por el contrario, la contusión de 150 KDynes infligió una lesión demasiado severa, ya que disminuyó la destreza manual en muy alto grado y de forma irrecuperable. En cuanto a las lesiones de 100 KDynes, a pesar de que la preservación histológica fue muy similar entre ellas ( $\approx 80\%$ ), dieron lugar a resultados funcionales diferentes según la localización de la lesión: mientras que las lesiones laterales tuvieron una disminución funcional que se recuperó por completo, las lesiones muy laterales mostraron una disminución funcional inicial similar para la que no se alcanzó una completa recuperación en el tiempo del estudio y como ya se vio en el primer experimento, las lesiones centrales no causaron ningún déficit funcional.
- La recuperación completa y espontánea de la funcionalidad en las lesiones centrales y laterales hace que estos tipos de lesión no resulten adecuados para experimentos orientados a observar el efecto de la rehabilitación. Por el contrario, la lesión de 100 KDynes muy lateralizada resulta idónea para explorar el efecto de la rehabilitación por permitir observar una recuperación funcional que espontáneamente no llega a ser completa.
- Estos resultados muestran como la lesión de 40 KDynes provoca una ligera disminución en la destreza manual que se recupera por completo después de 2 semanas después de la lesión. Por el contrario, la lesión de 60 KDynes disminuye casi por completo la capacidad manipuladora del animal que no se recupera después de 2 semanas. Sin embargo, la lesión de 50 KDynes disminuye la destreza manual de una forma moderada, la cual es capaz de recuperarse parcialmente de forma espontánea, sin recuperarse por completo, echo que permite observar el efecto de la rehabilitación cuando se aplique.
- Los animales inscritos en todos los regímenes de rehabilitación han mantenido su actividad durante la rehabilitación durante los tres meses posteriores a la lesión. Las rehabilitaciones son útiles

- Se han identificado y cuantificado variables de eficiencia e intensidad de la rehabilitación que han mostrado una evolución favorable durante los tres meses postoperatorios. La intensidad de cada rehabilitación se puede cuantificar y caracterizar. Los animales con cheerios y rehabilitación R&G mostraron una mejora en la recuperación de la función motora experta de las extremidades anteriores en comparación con los animales no rehabilitados y en rehabilitación de escaleras. Sin embargo, debido a la variabilidad de la lesión, se necesitan animales adicionales para confirmar robustamente estos resultados. No todas las Rehabilitaciones son iguales, ¡solo algunas facilitan la recuperación motora! Desde (R&G) pero también (cheerios) los regímenes de rehabilitación promovieron la recuperación motora. No está claro si la rehabilitación tiene que ser necesariamente específica de la tarea.

## REFERENCIAS

1. Conta, A., and Stelzner D. The Spinal Cord - 1st Edition [Internet]. The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas. [cited 2020 Oct 2]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/the-spinal-cord/watson/978-0-12-374247-6>
2. Snell. Neuroanatomía clínica, 6ª edición. Editorial médica Panamericana.
3. TACCHETTI ARBGAEGC. ATLAS ANATOMIA HUMANA (3 TOMOS) | ALFONSO RODRÍGUEZ BAEZA. GIUSEPPE ANASTASI. EUGENIO GAUDIO. CARLO TACCHETTI [Internet]. ATLAS ANATOMIA HUMANA (3 TOMOS). [cited 2020 Oct 5]. Available from: <https://www.casadellibro.com/libro-atlas-anatomia-humana-3-tomos/9788870516555/7248659>
4. Harrison M, O'Brien A, Adams L, Cowin G, Ruitenber MJ, Sengul G, et al. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. Neuroimage [Internet]. 2013;68:22–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.11.048>
5. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. J Comp Neurol [Internet]. 1952 [cited 2020 Oct 6];96(3):415–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14946260/>
6. LAWRENCE, D. G. & K. THE FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE MOTOR SYSTEM IN THE MONKEY. Brain,. 1970;91(1), 15–(3).
7. Kaas JH, Qi HX, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM. Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord [Internet]. Vol. 209, Experimental Neurology. Exp Neurol; 2008 [cited 2020 Oct 6]. p. 407–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17692844/>
8. Miall RC. Systems descending from the brainstem: Basic principles. In: Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. Springer New York; 2013. p. 1101–13.
9. Navarro Acebes X, Udina Bonet E. Neurofisiología de la espasticidad. Evaluación clínica y Trat la espasticidad [Internet]. 2009;1–15. Available from:

<http://www.tirant.com/derecho/detalle?articulo=9788498352528>

10. Vogelaar CF, Estrada V. Experimental Spinal Cord Injury Models in Rodents: Anatomical Correlations and Assessment of Motor Recovery. *Recover Mot Funct Follow Spinal Cord Inj.* 2016;3–36.
11. Grégoire Courtine<sup>1</sup>, Mary Bartlett Bunge<sup>2</sup>, James W Fawcett<sup>3</sup>, Robert G Grossman<sup>4</sup>, Jon H Kaas<sup>5</sup>, Roger Lemon<sup>6</sup>, Irin Maier<sup>7</sup>, John Martin<sup>8</sup>, Randolph J Nudo<sup>9</sup>, Almudena Ramon- Cueto<sup>10</sup>, Eric M Rouiller<sup>11</sup>, Lisa Schnell<sup>9</sup>, Thierry Wannier<sup>11</sup>, Martin E Schwab<sup>9</sup> and VRE. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nat Med.* 2007;13(5):561–6.
12. Mohan R, Tosolini AP, Morris R. Targeting the motor end plates in the mouse hindlimb gives access to a greater number of spinal cord motor neurons: An approach to maximize retrograde transport. *Neuroscience* [Internet]. 2014;274(June):318–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.045>
13. Grillner S. The motor infrastructure: From ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(7):573–86.
14. Barlow SM, Estep M. Central pattern generation and the motor infrastructure for suck, respiration, and speech. *J Commun Disord.* 2006;39(5):366–80.
15. Lavrov I, Musienko PE, Selionov VA, Zdunowski S, Roy RR, Reggie Edgerton V, et al. Activation of spinal locomotor circuits in the decerebrated cat by spinal epidural and/or intraspinal electrical stimulation. *Brain Res.* 2015;1600:84–92.
16. Toossi A, Everaert DG, Perlmutter SI, Mushahwar VK. Functional organization of motor networks in the lumbosacral spinal cord of non-human primates. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49328-1>
17. MILAN R. DIMITRIJEVIC<sup>b,d e</sup>, YURI GERASIMENKO<sup>c A</sup>, PINTER<sup>d MM</sup>. Evidence for a Spinal Central Pattern Generator in Humans. *Ann N Y Acad Sci.* (860:360-76. doi: 10.1111/j.1749-6632.):1–27.
18. Grillner S, El Manira A. Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. *Physiol Rev.* 2020;100(1):271–320.

19. Sillar KT, McLean DL. Spinal Network Development. *Encycl Life Sci.* 2010;(June).
20. Grillner S. Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron.* 2006;52(5):751–66.
21. Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates-An overview. *Brain Res Rev.* 2008;57(1):2–12.
22. Grillner S, Zangger P. On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res.* 1979;34(2):241–61.
23. Tunstall MJ, Roberts A, Soffe SR. Modelling inter-segmental coordination of neuronal oscillators: Synaptic mechanisms for uni-directional coupling during swimming in *Xenopus* tadpoles. *J Comput Neurosci.* 2002;13(2):143–58.
24. Grillner S, Kozlov A, Dario P, Stefanini C, Menciassi A, Lansner A, et al. Modeling a vertebrate motor system: pattern generation, steering and control of body orientation. *Prog Brain Res.* 2007;165(06):221–34.
25. Biewener A, Daniel T. A moving topic: Control and dynamics of animal locomotion. *Biol Lett.* 2010;6(3):387–8.
26. Kirshblum SC, Waring W, Biering-Sorensen F, Burns SP, Johansen M, Schmidt-Read M, et al. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med.* 2011;34(6):547–54.
27. Kumar R, Lim J, Mekary RA, Rattani A, Dewan MC, Sharif SY, et al. Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg* [Internet]. 2018;113:e345–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.02.033>
28. Kang Y, Ding H, Zhou H, Wei Z, Liu L, Pan D, et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *J Neurorestoratology.* 2017;Volume 6:1–9.
29. Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, Hagen EM, Rahimi-Movaghar V. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Eur Spine J.* 2015;24(5):905–18.
30. Christopher S Ahuja, Satoshi Nori, Lindsay Tetreault, Jefferson Wilson, Brian Kwon, James Harrop, David Choi MGF. *Traumatic Spinal Cord Injury Repair and Pathophysiology. Neurosurgery.* 2017;
31. Chen Y, Tang Y, Vogel LC, Devivo MJ. Causes of spinal cord injury. *top spinal*

- cord inj Rehabil. 2013;19(1):1–8.
32. Yılmaz T, Turan Y, Keleş A. Pathophysiology of the spinal cord injury. *J Clin Exp Investig.* 2015;5(1):131–6.
  33. Nas K, Yazmalar L, Şah V, Aydın A, Öneş K. Rehabilitation of spinal cord injuries. *World J Orthop.* 2015;6(1):8–16.
  34. Allen AR. SURGERY OF EXPERIMENTAL LESION OF SPINAL CORD EQUIVALENT TO CRUSH INJURY OF FRACTURE DISLOCATION OF SPINAL CORD. *J Am Med Assoc.* 1911;LVII(11):878-.
  35. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury a nugget. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(2):281–99.
  36. Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: A four-phase model. *Spinal Cord.* 2004;42(7):383–95.
  37. Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience.* 1999;93(4):1383–9.
  38. Li J, Wuliji O, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):24438–75.
  39. Sadrzadeh SMH, Anderson DK, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin potentiates central nervous system damage. *J Clin Invest.* 1987;79(2):662–4.
  40. Dan Shlosberg, Mony Benifla, Daniela Kaufer and AFD. Blood–brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2010;6(7):393–403. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
  41. Whetstone WD, Hsu JYC, Eisenberg M, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Blood-spinal cord barrier after spinal cord injury: Relation to revascularization and wound healing. *J Neurosci Res.* 2003;74(2):227–39.
  42. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2003;41(7):369–78.
  43. Profyris C, Cheema SS, Zang DW, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2004;15(3):415–36.
  44. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res*



- Bull. 1999;49(6):377–91.
45. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011;12(7):388–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3053>
  46. López-Vales R, David S. Bioactive lipids in inflammation after central nervous system injury. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1127:181–94.
  47. Adams M, Cavanagh JFR. International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis (ICCP): Another step forward for spinal cord injury research. *Spinal Cord*. 2004;42(5):273–80.
  48. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global Prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol*. 2014;6:309–31.
  49. Anderson KD. Targeting recovery: Priorities of the spinal cord-injured population. *J Neurotrauma*. 2004;21(10):1371–83.
  50. Mekhail M, Almazan G, Tabrizian M. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: A review. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2012;96(3):322–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.01.008>
  51. Wilson JR, Fehlings MG. Riluzole for acute traumatic spinal cord injury: A promising neuroprotective treatment strategy. *World Neurosurg* [Internet]. 2014;81(5–6):825–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2013.01.001>
  52. Lu X, Battistuzzo CR, Zoghi M, Galea MP. Effects of training on upper limb function after cervical spinal cord injury: A systematic review. *Clin Rehabil*. 2015;29(1):3–13.
  53. Gad P, Lee S, Terrafranca N, Zhong H, Turner A, Gerasimenko Y, et al. Non-invasive activation of cervical spinal networks after severe paralysis. *J Neurotrauma*. 2018;35(18):2145–58.
  54. Fouad K, Ng C, Basso DM. Behavioral testing in animal models of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2020;333(May).
  55. Amo-Aparicio J, Martínez-Muriana A, Sánchez-Fernández A, López-Vales R. Neuroinflammation Quantification for Spinal Cord Injury. *Curr Protoc Immunol*. 2018;123(1):1–15.
  56. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, et al. Spinal cord

- injury models: A review. *Spinal Cord* [Internet]. 2014;52(8):588–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sc.2014.91>
57. Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma*. 2002;19(2):175–90.
  58. Streijger F, Beernink TMJ, Lee JHT, Bhatnagar T, Park S, Kwon BK, et al. Characterization of a cervical spinal cord hemicontusion injury in mice using the infinite horizon impactor. *J Neurotrauma*. 2013;30(10):869–83.
  59. Goodrich RPFJT, The. III. The Edwin Smith surgical Papyrus. *Child's Nerv Syst*. 1999;(15):281–5.
  60. Kirshblum S, Snider B, Eren F, Guest J. Characterizing Natural Recovery after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2021;18:1–18.
  61. Fehlings MG, Uldreaj A, Badner A. Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury. *F1000Research*. 2017;6(0):1–13.
  62. Oudega M, Bradbury EJ, Ramer MS. Combination therapies [Internet]. 1st ed. Vol. 109, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2012. 617–636 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52137-8.00038-3>
  63. Dietrich WD, Levi AD, Wang M, Green BA. Hypothermic Treatment for Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*. 2011;8(2):229–39.
  64. Pizzolato C, Gunduz MA, Palipana D, Wu J, Grant G, Hall S, et al. Non-invasive approaches to functional recovery after spinal cord injury: Therapeutic targets and multimodal device interventions. *Exp Neurol* [Internet]. 2021;339(December 2020):113612. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113612>
  65. Wells JEA, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*. 2003;126(7):1628–37.
  66. Lu P, Tuszynski MH. Growth Factors and Combinatorial Therapies for CNS Regeneration. *Exp Neurol*. 2007;209(2):313–20.
  67. García-Alfás G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat*

- Neurosci. 2009;12(9):1145–51.
68. Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*. 2002;416(6881):636–40.
  69. Fouad K, Dietz V, Schwab ME. Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res Rev*. 2001;36(2–3):204–12.
  70. Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, et al. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord. *Nat Med [Internet]*. 2018 May 1 [cited 2020 Apr 24];24(4):484–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4502>
  71. Lu P, Woodruff G, Wang Y, Graham L, Hunt M, Wu D, et al. Long-Distance Axonal Growth from Human Induced Pluripotent Stem Cells after Spinal Cord Injury. *Neuron*. 2014 Aug 20;83(4):789–96.
  72. Bartlett RD, Burley S, Ip M, Phillips JB, Choi D. Cell therapies for spinal cord injury: Trends and challenges of current clinical trials. *Neurosurgery*. 2020;87(4):E456–72.
  73. Liu W, Xu B, Xue W, Yang B, Fan Y, Chen B, et al. A functional scaffold to promote the migration and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury repair. *Biomaterials [Internet]*. 2020;243:119941. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119941>
  74. Zhang Q, Shi B, Ding J, Yan L, Thawani JP, Fu C, et al. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. *Acta Biomater [Internet]*. 2019;88:57–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.056>
  75. Wagner FB, Mignardot JB, Le Goff-Mignardot CG, Demesmaeker R, Komi S, Capogrosso M, et al. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature [Internet]*. 2018;563(7729):65–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0649-2>
  76. Sadowsky CL, McDonald JW. Activity-based restorative therapies: Concepts and applications in spinal cord injury-related neurorehabilitation. *Dev Disabil Res Rev*. 2009;15(2):112–6.

77. Kloosterman MGM, Snoek GJ, Jannink MJA. Systematic review of the effects of exercise therapy on the upper extremity of patients with spinal-cord injury. *Spinal Cord*. 2009;47(3):196–203.
78. Torres-Espín A, Forero J, Fenrich KK, Lucas-Osma AM, Krajacic A, Schmidt E, et al. Eliciting inflammation enables successful rehabilitative training in chronic spinal cord injury. *Brain*. 2018;141(7):1946–196.
79. HOULE JD, KELLIE MORRIS M, SKINNER RD, GARCIA-RILL E, PETERSON CA. EFFECTS OF FETAL SPINAL CORD TISSUE TRANSPLANTS AND CYCLING EXERCISE ON THE SOLEUS MUSCLE IN SPINALIZED RATS. *Muscle Nerve*. 1999;(July):846–56.
80. Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Go F. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. 2005;193:411–9.
81. Gómez-Pinilla F, Huie JR, Ying Z, Ferguson A, Crown E., Baumbauer K., et al. BDNF and Learning: Evidence that Instrumental Training Promotes Learning within the Spinal Cord by Up-Regulating BDNF Expression. 2007;148(4):893–906.
82. Girgis J, Merrett D, Kirkland S, Metz GAS, Verge V, Fouad K. Reaching training in rats with spinal cord injury promotes plasticity and task specific recovery. 2007;
83. Batty NJ, Fenrich KK, Fouad K. The role of cAMP and its downstream targets in neurite growth in the adult nervous system. *Neurosci Lett* [Internet]. 2016;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.033>
84. Bachmann LC, Lindau NT, Felder P, Schwab ME. Sprouting of Brainstem-Spinal Tracts in Response to Unilateral Motor Cortex Stroke in Mice. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(9):3378–89. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4384-13.2014>
85. Li Q, Houdayer T, Liu S, Belegu V. Induced Neural Activity Promotes an Oligodendroglia Regenerative Response in the Injured Spinal Cord and Improves Motor Function after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(24):3351–61.
86. Fouad K, Bennett DJ, Vavrek R, Blesch A. Long-term viral brain-derived neurotrophic factor delivery promotes spasticity in rats with a cervical spinal cord hemisection. 2013;4(November):1–10.
87. Laird AS, Carrive P, Waite PME. Effect of Treadmill Training on Autonomic

Dysreflexia in Spinal Cord – Injured Rats. 2009;910–20.

88. Yang Q, Wu Z, Hadden JK, Odem MA, Zuo Y, Crook RJ, et al. Persistent Pain after Spinal Cord Injury Is Maintained by Primary Afferent Activity. 2014;34(32):10765–9.
89. Stoneham ET, Sanders EM, Sanyal M, Dumas TC. Rules of engagement: Factors that regulate activity-dependent synaptic plasticity during neural network development. *Biol Bull*. 2010;219(2):81–99.
90. Bye EA, Harvey LA, Gambhir A, Kataria C, Glinsky J V., Bowden JL, et al. Strength training for partially paralysed muscles in people with recent spinal cord injury: A within-participant randomised controlled trial. *Spinal Cord* [Internet]. 2017;55(5):460–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sc.2016.162>
91. Warburton DER, Eng JJ, Krassioukov A, Sproule S. Cardiovascular health and exercise rehabilitation in spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*. 2007;13(1):98–122.
92. Hodgson J a, Edgerton R. Can the mammalian lumbar spinal cord learn a motor task?
93. Starkey ML, Bleul C, Kasper H, Mosberger AC, Zörner B, Giger S, et al. High-impact, self-motivated training within an enriched environment with single animal tracking dose-dependently promotes motor skill acquisition and functional recovery. *Neurorehabil Neural Repair*. 2014;28(6):594–605.
94. Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci*. 2001;21(14):5272–80.
95. Battistuzzo CR, Callister RJ, Callister R, Galea MP. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(8):1600–13.
96. Harvey LA. Physiotherapy rehabilitation for people with spinal cord injuries. *J Physiother* [Internet]. 2016;62(1):4–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphys.2015.11.004>
97. Barbeau H, Rossignol S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res*. 1987;412(1):84–95.

98. Van Meeteren NLU, Eggers R, Lankhorst AJ, Gispen WH, Hamers FPT. Locomotor Recovery after Spinal Cord Contusion Injury in Rats is Improved by Spontaneous Exercise. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):1029–37.
99. Ganzer PD, Manohar A, Shumsky JS, Moxon KA. Therapy induces widespread reorganization of motor cortex after complete spinal transection that supports motor recovery. *Exp Neurol* [Internet]. 2016;279:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.022>
100. DeVeau KM, Harman KA, Squair JW, Krassioukov A V., Magnuson DSK, West CR. A comparison of passive hindlimb cycling and active upper-limb exercise provides new insights into systolic dysfunction after spinal cord injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2017;313(5):H861–70.
101. Kuerzi J, Brown EH, Shum-Siu A, Siu A, Burke D, Morehouse J, Smith RR and MD. Task-specificity vs Ceiling Effect: Step-training in shallow water after spinal cord injury Kuerzi. *Exp Neurol* [Internet]. 2010;224(1):178–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
102. Bertelli JA, Mira JC. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat. *J Neurosci Methods*. 1993;46(3):203–8.
103. Gensel JC, Tovar CA, Hamers FPT, Deibert RJ, Beattie MS, Bresnahan JC. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(1):36–54.
104. Irvine KA, Ferguson AR, Mitchell KD, Beattie SB, Lin A, Stuck ED, et al. The Irvine, Beatties, and Bresnahan (IBB) forelimb recovery scale: An assessment of reliability and validity. *Front Neurol*. 2014;5 JUL(July):1–19.
105. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777–87.
106. Dunham KA, Siriphorn A, Chompoonong S, Floyd CL. Characterization of a graded cervical hemiconfusion spinal cord injury model in adult male rats. *J Neurotrauma*. 2010;27(11):2091–106.

107. Allred RP, Adkins DL, Woodlee MT, Husbands LC, Maldonado MA, Kane JR, et al. The Vermicelli Handling Test: A simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats. *J Neurosci Methods*. 2008;170(2):229–44.
108. Metz GAS, Whishaw IQ. Skilled reaching an action pattern: Stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behav Brain Res*. 2000;116(2):111–22.
109. Karl JM, Whishaw IQ. Rodent skilled reaching for modeling pathological conditions of the human motor system. *Neuromethods*. 2011;61(2):87–107.
110. Iwaniuk AN, Whishaw IQ. On the origin of skilled forelimb movements. *Trends Neurosci*. 2000;23(8):372–6.
111. C.P. Montoya \*, L.J. Campbell-Hope KDPSBD. The “staircase test” a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. 1991;36(*J. Neurosci. Methods*):219–28.
112. Whishaw IQ, O’connor WT, Dunnett SB. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain*. 1986;109(5):805–43.
113. Adkins DL, Ferguson L, Lance S, Pevtsov A, Mcdonough K, Stamschror J, et al. Combining Multiple Types of Motor Rehabilitation Enhances Skilled Forelimb Use Following Experimental Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2016;29(10):989–1000.
114. Torres-Espín A, Forero J, Schmidt EKA, Fouad K, Fenrich KK. A motorized pellet dispenser to deliver high intensity training of the single pellet reaching and grasping task in rats. *Behav Brain Res [Internet]*. 2018;336(August 2017):67–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.033>
115. Ellens DJ, Gaidica M, Toader A, Peng S, Shue S, John T, et al. An automated rat single pellet reaching system with high-speed video capture. *J Neurosci Methods [Internet]*. 2016;271:119–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.009>
116. Wong CC, Ramanathan DS, Gulati T, Won SJ, Ganguly K, Service R, et al. An automated behavioral box to assess forelimb function in rats. *J Neurosci Methods*. 2015;(415):30–7.

117. Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP. Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behav Brain Res.* 1992;47(1):59–70.
118. Krisa L, Runyen M, Detloff MR. Translational challenges of rat models of upper extremity dysfunction after spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil.* 2018;24(3):195–205.
119. Hilton BJ, Anenberg E, Harrison TC, Boyd JD, Murphy TH, Tetzlaff W. Re-Establishment of Cortical Motor Output Maps and Spontaneous Functional Recovery via Spared Dorsolaterally Projecting Corticospinal Neurons after Dorsal Column Spinal Cord Injury in Adult Mice. *J Neurosci* [Internet]. 2016;36(14):4080–92. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3386-15.2016>
120. Piecharka DM, Kleim JA, Whishaw IQ. Limits on recovery in the corticospinal tract of the rat: Partial lesions impair skilled reaching and the topographic representation of the forelimb in motor cortex. *Brain Res Bull.* 2005;66(3):203–11.
121. Leech KA, Kinnaird CR, Holleran CL, Kahn J, Hornby TG. Effects of locomotor exercise intensity on gait performance in individuals with incomplete spinal cord injury. *Phys Ther.* 2016;96(12):1919–29.
122. Wessels M, Lucas C, Eriks I, De Groot S. Body weight-supported gait training for restoration of walking in people with an incomplete spinal cord injury a systematic review. *J Rehabil Med.* 2010;42(6):513–9.
123. Barr AE, Safadi FF, Gorzelany I, Amin M, Popoff SN, Barbe MF. Repetitive, Negligible Force Reaching in Rats Induces Pathological Overloading of Upper Extremity Bones. *J Bone Miner Res.* 2003;18(11):2023–32.
124. Barbe MF, Barr AE, Gorzelany I, Amin M, Gaughan JP, Safadi FF. Chronic repetitive reaching and grasping result in decreased motor performance. 2003;21.
125. Wang D, Ichiyama RM, Zhao R, Andrews MR, Fawcett JW. Chondroitinase combined with rehabilitation promotes recovery of forelimb function in rats with chronic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2011;31(25):9332–44.
126. García-Alfás G, Truong K, Shah PK, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of subcortical pathways promote recovery of skilled hand function in rats after corticospinal and rubrospinal tract injuries. *Exp Neurol.* 2015;226:112–9.



127. Shin HY, Kim H, Kwon MJ, Hwang DH, Lee KY, Kim BG. Molecular and cellular changes in the lumbar spinal cord following thoracic injury: Regulation by treadmill locomotor training. *PLoS One*. 2014;9(2):1–15.
128. Sharp KG, Duarte JE, Gebrekristos B, Perez S, Steward O, Reinkensmeyer DJ. Robotic rehabilitator of the rodent upper extremity: A system and method for assessing and training forelimb force production after neurological injury. *J Neurotrauma*. 2016;33(5):460–7.
129. Nica I, Deprez M, Nuttin B, Aerts JM. Automated assessment of endpoint and kinematic features of skilled reaching in rats. *Front Behav Neurosci*. 2018;11(January):1–15.
130. Kleim JA, Jones TA. Principles of experience-dependent neural plasticity: Implications for rehabilitation after brain damage. *J Speech, Lang Hear Res*. 2008;51(1):225–39.
131. Torres-Espín A, Beaudry E, Fenrich K, Fouad K. Rehabilitative Training in Animal Models of Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(16):1970–85.
132. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1–21.
133. VandenBerg PM, Hogg TM, Kleim JA, Whishaw IQ. Long-Evans rats have a larger cortical topographic representation of movement than Fischer-344 rats: A microstimulation study of motor cortex in naïve and skilled reaching-trained rats. *Brain Res Bull*. 2002;59(3):197–203.
134. Niedzielak T, Ravenelle R, Joseph M, Calhoun C, Plotkin B, Jones R, et al. 5-HT1A and  $\alpha$ 2 adrenergic receptor levels are associated with high anxiety-like patterns and impulsivity in selectively bred Long Evans rats. *Behav Brain Res*. 2020;383(January).
135. Irvine KA, Ferguson AR, Mitchell KD, Beattie SB, Lin A, Stuck ED, et al. The Irvine, Beatties, and Bresnahan (IBB) forelimb recovery scale: An assessment of reliability and validity. *Front Neurol*. 2014;5 JUL(July):1–19.
136. Whishaw IQ, Whishaw P, Gorny B. The structure of skilled forelimb reaching in the rat: A movement rating scale. *J Vis Exp*. 2008;(18):1–2.
137. Chen CC, Gilmore A, Zuo Y. Study motor skill learning by single-pellet reaching

- tasks in mice. *J Vis Exp*. 2014;(85):1–7.
138. Hunanyan AS, García-Alías G, Alessi V, Levine JM, Fawcett JW, Mendell LM, et al. Role of chondroitin sulfate proteoglycans in axonal conduction in mammalian spinal cord. *J Neurosci*. 2010;30(23):7761–9.
  139. Ferrucci M, Lazzeri G, Flaibani M, Biagioni F, Cantini F, Madonna M, et al. In search for a gold-standard procedure to count motor neurons in the spinal cord. *Histol Histopathol*. 2018;33(10):1021–46.
  140. Tosolini AP, Morris R. SPATIAL CHARACTERIZATION OF THE MOTOR NEURON COLUMNS SUPPLYING THE RAT FORELIMB. NSC [Internet]. 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.054>
  141. Chen K, Liu J, Assinck P, Bhatnagar T, Streijger F, Zhu Q, et al. Differential histopathological and behavioral outcomes eight weeks after rat spinal cord injury by contusion, dislocation, and distraction mechanisms. *J Neurotrauma*. 2016;33(18):1667–84.
  142. Fenrich KK, May Z, Torres-Espín A, Forero J, Bennett DJ, Fouad K. Single pellet grasping following cervical spinal cord injury in adult rat using an automated full-time training robot. *Behav Brain Res*. 2016;299:59–71.
  143. Ganzer PD, Meyers EC, Sloan AM, Maliakkal R, Ruiz A, Kilgard MP, et al. Awake behaving electrophysiological correlates of forelimb hyperreflexia, weakness and disrupted muscular synchronization following cervical spinal cord injury in the rat. *Behav Brain Res* [Internet]. 2016;307:100–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.042>
  144. James ND, Shea J, Muir EM, Verhaagen J, Schneider BL, Bradbury EJ. Chondroitinase gene therapy improves upper limb function following cervical contusion injury. *Exp Neurol* [Internet]. 2015;271:131–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.022>
  145. Walker CL, Wang X, Bullis C, Liu NK, Lu Q, Fry C, et al. Biphasic bisperoxovanadium administration and Schwann cell transplantation for repair after cervical contusive spinal cord injury. *Exp Neurol* [Internet]. 2015;264:163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.12.002>
  146. Martinez M, Brezun JM, Bonnier L, Xerri C. A new rating scale for open-field

- evaluation of behavioral recovery after cervical spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2009;26(7):1043–53.
147. Onifer SM, Zhang YP, Burke DA, Brooks DL, Decker JA, McClure NJ, et al. Adult rat forelimb dysfunction after dorsal cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2005;192(1):25–38.
  148. Jin Y, Bouyer J, Haas C, Fischer I. Evaluation of the anatomical and functional consequences of repetitive mild cervical contusion using a model of spinal concussion. *Exp Neurol* [Internet]. 2015;271:175–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.001>
  149. Côté MP, Detloff MR, Wade RE, Lemay MA, Houlié JD. Plasticity in ascending long propriospinal and descending supraspinal pathways in chronic cervical spinal cord injured rats. *Front Physiol*. 2012;3 AUG(August):1–15.
  150. Ijima Y, Furuya T, Koda M, Matsuura Y, Saito J, Kitamura M, et al. Experimental rat model for cervical compressive myelopathy. *Neuroreport*. 2017;28(18):1239–45.
  151. McKenna JE, Prusky GT, Whishaw IQ. Cervical motoneuron topography reflects the proximodistal organization of muscles and movements of the rat forelimb: A retrograde carbocyanine dye analysis. *J Comp Neurol*. 2000;419(3):286–96.
  152. Lemon RN. Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31(Cm):195–218.
  153. Akinori M. Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog Neurobiol*. 1998;54(5):499–530.
  154. Reinhardt DR, Stehlik KE, Satkunendrarajah K, Kroner A. Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function. *Exp Neurol* [Internet]. 2020;331(June):113381. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113381>
  155. Li K, Nicaise C, Sannie D, Hala TJ, Javed E, Parker JL, et al. Overexpression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 exacerbates phrenic motor neuron degeneration, diaphragm compromise, and forelimb motor dysfunction following cervical contusion spinal cord injury. *J Neurosci*. 2014;34(22):7622–38.
  156. Watson JL, Hala TJ, Putatunda R, Sannie D, Lepore AC. Persistent at-level thermal hyperalgesia and tactile allodynia accompany chronic neuronal and astrocyte

activation in superficial dorsal horn following mouse cervical contusion spinal cord injury. *PLoS One*. 2014;9(9).

157. Dietz V, Schwab ME. From the rodent spinal cord injury model to human application: Promises and challenges. *J Neurotrauma* [Internet]. 2016;22(4):1–18. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2015.0377>
158. Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res*. 2002;137:231–55.
159. Walker CL, Zhang YP, Liu Y, Li Y, Walker MJ, Liu N-K, et al. Anatomical and functional effects of lateral cervical hemicontusion in adult rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2016 May;34(3):389–400.
160. Mondello SE, Sunshine MD, Fishedick AE, Moritz CT, Horner PJ. A Cervical Hemi-Contusion Spinal Cord Injury Model for the Investigation of Novel Therapeutics Targeting Proximal and Distal Forelimb Functional Recovery. *J Neurotrauma*. 2015 Dec;32(24):1994–2007.

## LISTA DE ABREVIATURAS

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nerviosos periférico

ME: Médula espinal

LME: Lesión de médula espinal

TCE: Tracto corticoespinal

TRE: Tracto rubroespinal

R&G: Reaching & Grasping o movimiento de alcance y agarre

DPO: Días postoperatorio

SB: Sustancia blanca

SG: Sustancia gris

KDynes: Kilodinas

KPI: Key performance indicators o indicadores clave del rendimiento.

# Anexo 1 – Adaptación del diseño del Motorized Pellet Dispenser

## **Motorized Pellet Dispenser (adapted version)**

This document is intended to provide a guide for assembling an adapted version of the *Motorized Pellet Dispenser v1.0* developed by Torres-Espín et al., 2017 <sup>[1]</sup>, used under Creative Common license CC-BY-NC-SA. Original source with the 3D design and the assembly instructions can be found in the following shared folder:

<https://drive.google.com/drive/folders/0B4tLAWCy1g1KNmU2V1JlcEQyMVE?resourcekey=0-13rEt7bSVTaIII4RtPLHuwt>.

[1] Abel Torres-Espín, Juan Forero, Emma Schmidt, Karim Fouad, Keith K. Fenrich. A motorized pellet dispenser to deliver high intensity training of the single pellet task in rats. *Behavioural Brain Research*, 2017.

## **Modifications from the previous version**

Initially, original version of the dispenser was built following the instructions. The device was successful in delivering pellets; however, following issues were noticed:

1. Pellets hop from the pellet-holder when presented by the mobile arm, in some cases ending up misplaced or even dropped back to the hopper. This issue occurs at any speed setting, but specially at slow speeds, where the control of the displacement becomes irregular. This produces an abrupt advance of the arm, which also cause the pellet to hop when reaching the end position.
2. At fast speed settings, about 1 out of 10 times the arm tip collects 2 pellets. Three possibilities arise: they are presented at the same time, they obstruct the lid aperture and the arm tip gets stuck, or one or both of them are fragmented.
3. The arm stops at a variable height position, even with maintained velocity and end-position settings.
4. Animal's paw gets stuck on the lid pellet-aperture or in the rubber part of the pellet-holder when performing R&G.
5. Achievable minimum distance between the dispenser tip and the training-cage window was superior to the project requirements of 10 mm.

In order to mitigate these issues and thus improve the dispenser effectiveness and operating speed, modifications focused on upgrading the servo control system and reshaping some pieces of the design. A brief summary of this modifications is listed below:

- **Control board:** *SparkFun Servo Trigger* board was replaced by *Pololu Maestro Servo Controller* board, which brings a finer and more configurable control of the servo-motors and allows to customize their movement by defining simple programs. The better servo-control yields a smoother movement of the arm and more precision over its end-position, minimizing issue #1 and #3. Also, the programable feature enables to address issue #2; defining a small pause in the middle of the advance of the arm causes any of the extra-pellets collected to fall back into the hoper. Moreover, with this new control board, multiple dispensers can be controlled at once, since it disposes of multiple input/output (I/O) channels.
- **Pellet-aperture:** bottom edges of the aperture were rounded to reduce friction between the pellet-holder and the pellet-aperture of the lid piece. This helps to improve the consistency in the end-position of the arm tip, relative to issue #3. Also, a ring sticker was adhered centered on top of the pellet-aperture to prevent that the animal's nails get stuck with the pellet-holder rubber or the pellet-aperture plastic, reducing issue #4.
- **Hoper pieces:** in order to fit the requirement mentioned in issue #5, protruding material at the front of the dispenser was removed, modifying both hoper sides and hoper lid pieces. These changes were translated to the 3D design in order to make them replicable.

The following shared folder link contain all the 3D piece designs for mounting the current version dispenser and control box (modified pieces are specified as second versions) and the script program required to command the dispenser:

[No encuentro el link que creaste oli, pegalo aqui](#)

## Physical and Hardware Assembly

### List of components

- **Dispenser:**

Use the components indicated in the original assembly manual.

- **Control Box (1 unit):**
  - **3D-printed pieces:**
    - *Control box Base* (Control box - Base v2.stl)
    - *Control box Lid* (Control box - Lid.stl)
  - **Box cover screws:** 4 units, M4 x 15 mm self-tapping metallic screws with rounded head.
  - **Internal screws:** 8 units, M1.7 x 5 mm self-tapping metallic screws.
  - **Servo controller:** Micro Maestro 6-Channel USB Servo Controller (from Pololu brand), assembled version (e.g., Pololu part number 1350).
  - **AC-DC wall power adapter:** Power output of 4 A at 5 V, with 2.1 mm DC-Jack output connector (e.g., RS components part number 175-3321).
  - **DC power socket:** 2.1 mm power socket DC-Jack, panel mount for hole diameter of 7.5 mm (e.g., Digi-Key part number CP-5-ND).
  - **Triple Servo connector:** Multiwire triple-servo MPX Plug, female to male, panel mount for 19.3 mm x 7 mm hole (e.g., RedwingRC part number MPX-Triple-6/6).
  - **Prototyping PCB:** Double-sided prototyping board of 2 cm x 8 cm and 0.1" (2.53 mm) spacing (e.g., Proto-supplies part number PCB-16).
  - **Buttons:** 3 push-button switches SPST-NO (single pole single throw, normal open), panel mount for a hole diameter of 12.7 mm (e.g., Digi-Key part number RP3502ABLK).
  - **Resistors:** 3 through-hole carbon resistor of 10 k $\Omega$ , 1/4 W and 5% tolerance.
  - **Cables with connectors:**
    - [1 unit] Supply line pair with plug: female 0.1" connector (e.g., BEC connector) with 5-10 cm leads, lead section between 20-22 AWG. (e.g., Pololu part number 2180).
    - [4 units] 2-pin female to female jumper cable, 0.1" header connectors, cable section between 26-30 AWG and length of 5-10 cm (e.g., SparkFun part



number PRT-10362).

- [1 unit] 3-pin female to female jumper cable, 0.1" header connectors, cable section between 26-30 AWG and length of 5-10 cm (e.g., SparkFun part number PRT-10363).
- [1 unit] Female to female jumper cable, 0.1" header connectors, cable section between 26-30 AWG and length of 5-10 cm (e.g., Pololu part number 3832).
- **Pin header:** 40 pin - single row, male straight pin header, 0.1" spacing.
- **Shorting block:** Jumper for 0.1" spacing header pins (e.g., Pololu part number 971).
- **Shrink wrap**
- **Tools:** Soldering material.

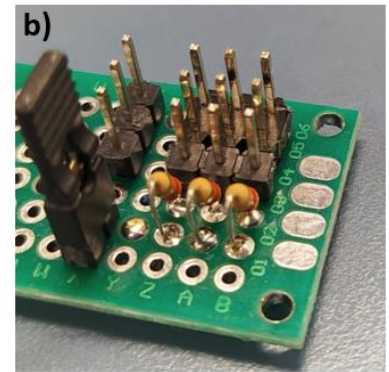
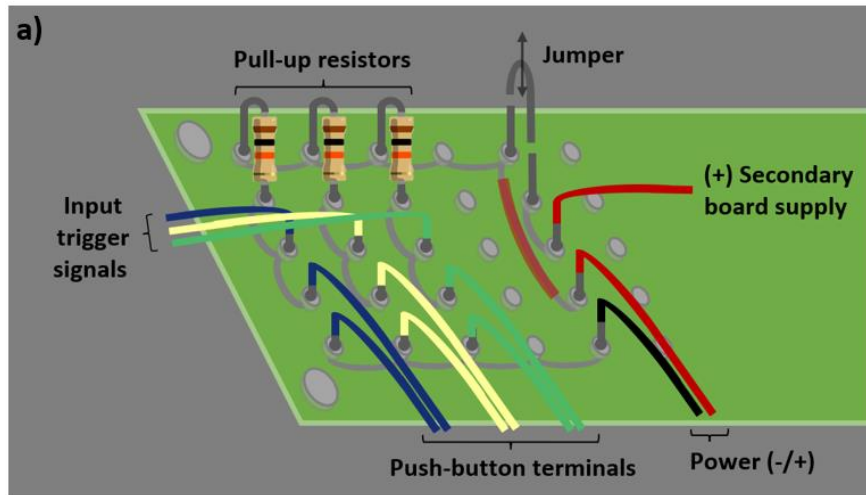
### **Building instructions**

- **Dispenser:**

Follow the instructions from the original assembly manual to build a copy of the dispenser.

- **Control Box:**

1. Print the two pieces of the control box using a 3D printer, following the recommended printing orientations indicated in the original assembly manual.
2. The small prototyping PCB will serve to place the auxiliar circuits required for the application: a circuit for the pushbuttons, that ensures a proper reading of their trigger-signals; and a supply connection that, when closed, enables to power the rest of the control board when not connected by USB. Build the circuits as illustrated in *Figure 1*. Place the components (resistors and pin-headers) on top of the board and solder them at the reverse side, as shown in the schema. To set the interconnections use thin wire segments or, simply, bridge points with welding.



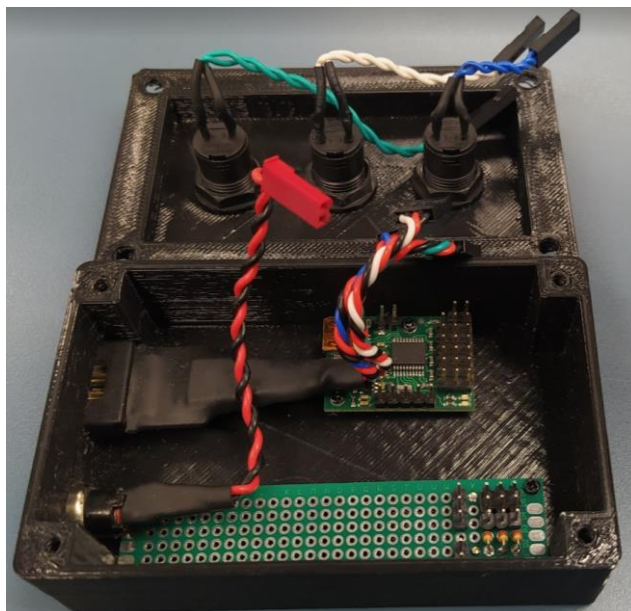
**Figure 1.** Auxiliar circuits mounted on the prototyping board. **a)** Schematic view of the circuits. Interconnections are meant to be placed in the bottom side of the PCB. **b)** Top view of the soldered circuits.

3. Solder the pealed ends of the supply cable pair to the terminals of the DC-plug socket and cover the welding with shrink wrap to prevent short circuits. Repeat the process for the pushbuttons, previously removing and peeling one of the ends of each jumper cable pair. Result should resemble *Figure 2*.



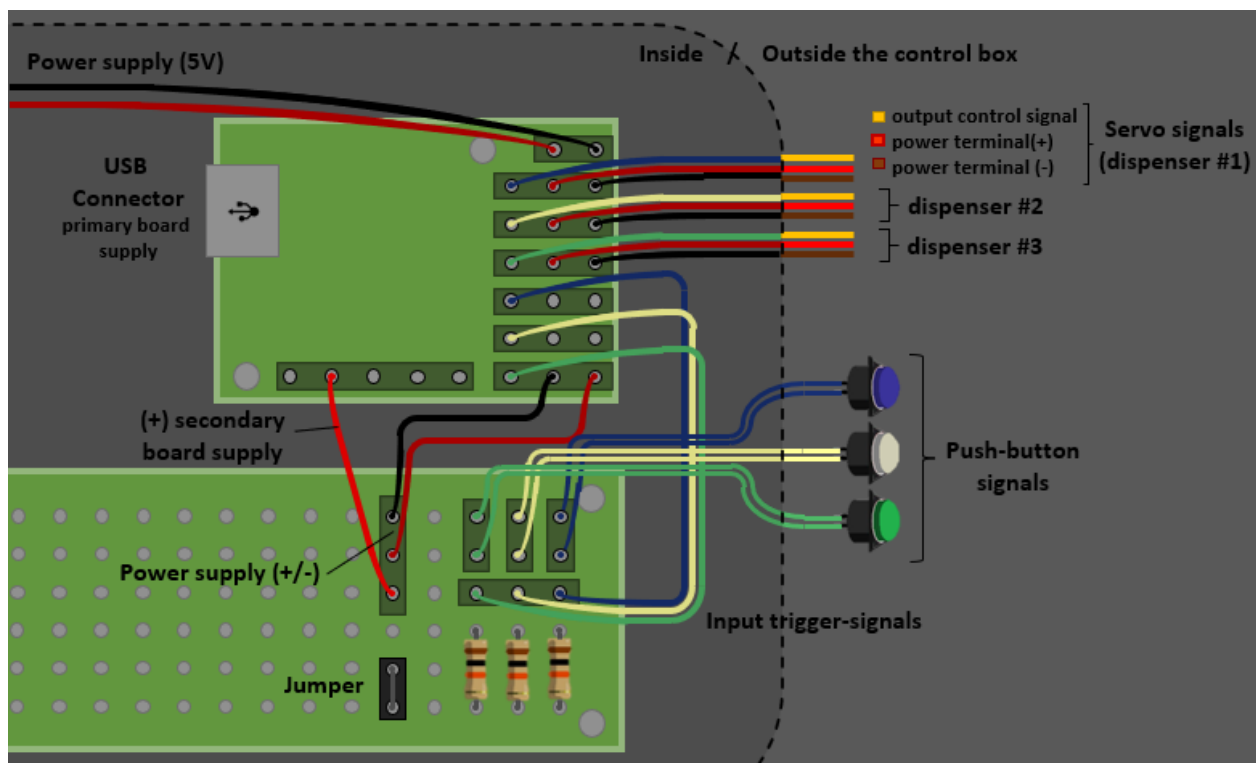
**Figure 2.** DC-plug socket and pushbutton terminals soldered to their cables.

4. Screw the two boards and the triple-servo connector socket (female part) to the control box with the inner screws (M1.7) and attach the DC plug socket and the three pushbuttons with their respective tightening nut, as shown in *Figure 3*.



**Figure 3.** Control Box with all the elements (control board, prototyping board, multi-servo connector, power supply and pushbuttons) installed but unconnected.

- Interconnect the devices and circuits as schematized in *Figure 4*.



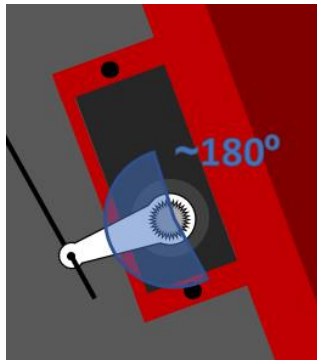
**Figure 4.** Electrical connection scheme between the elements of the control box.

- Connect the servomotor of each dispenser to be used to the control box. After doing all the necessary adjustments (follow the next section) close the control box and

screw the lid.

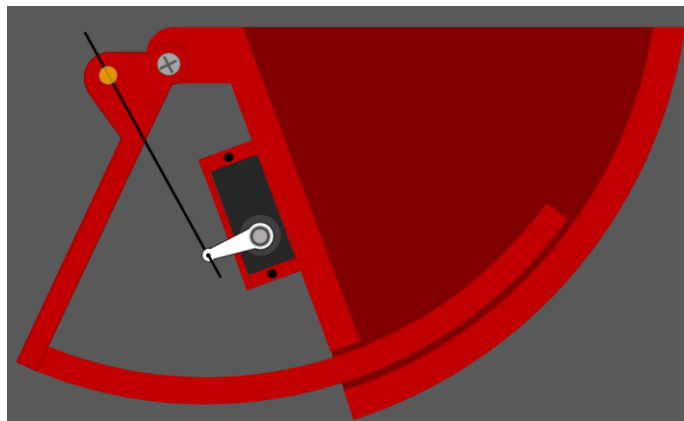
### Adjustment of the dispensers

1. The range of rotation of the servomotor is limited to approximately 180 degrees. Considering that, modify the position of the servo horn on the output gear to have full range of motion, as illustrated in *Figure 5*. Once the proper position is set, secure the piece to the output gear with a screw.



**Figure 5.** Convenient range of motion of the servomotor at its mounted position on the dispenser.

2. Adjust the length of the push rod to ensure the proper transmission of the displacement from the servomotor to the arm of the dispenser. Leave loose the push rod connector at the arm piece with that purpose. Move and hold both the arm and the servo horn at their half range position (see *Figure 6*) and tighten the push rod connection.



**Figure 6.** Recommended length adjustment of the push rod: at half rotation of the servomotor, the arm should be also at half range position.

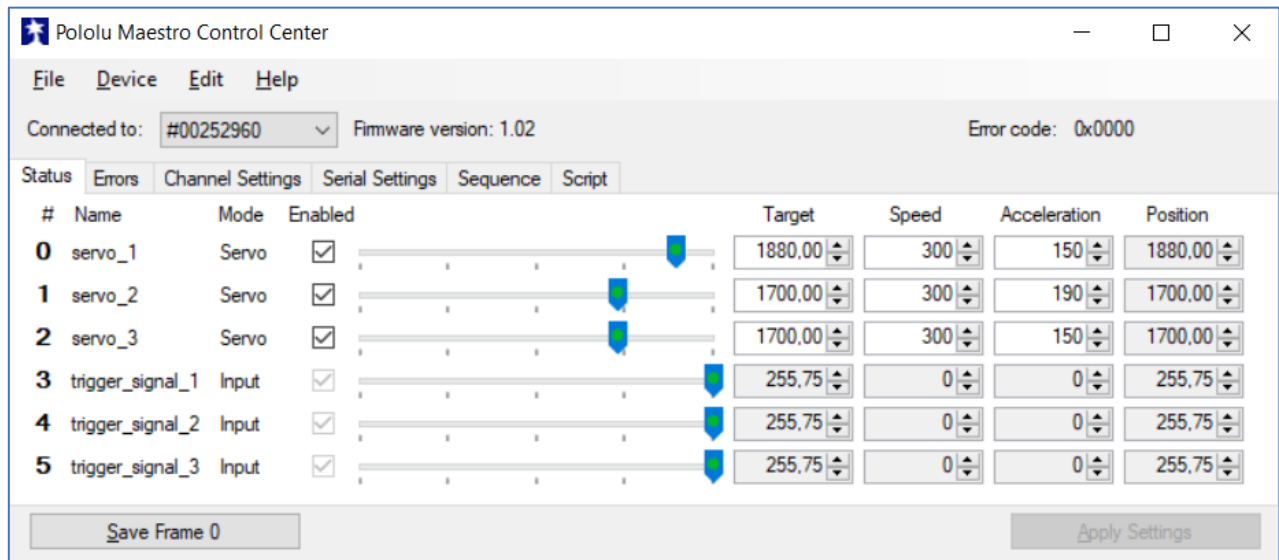
3. On a computer running Windows operative system, install the software to monitor

and program the control board via USB. Required files and the installation instructions can be found in the manufacturer source: <https://www.pololu.com/docs/0J40/3.a>.

Disassemble the control board from the bottom of the control box while keeping all the connections, to be able to access the USB port. Make sure to disable the secondary board supply from the I/O stage (removing the jumper) to have the USB as a unique supply source for the microcontroller. Connect the control board to the computer by USB and power the I/O stage and the auxiliar circuits by also connecting the wall power adapter.

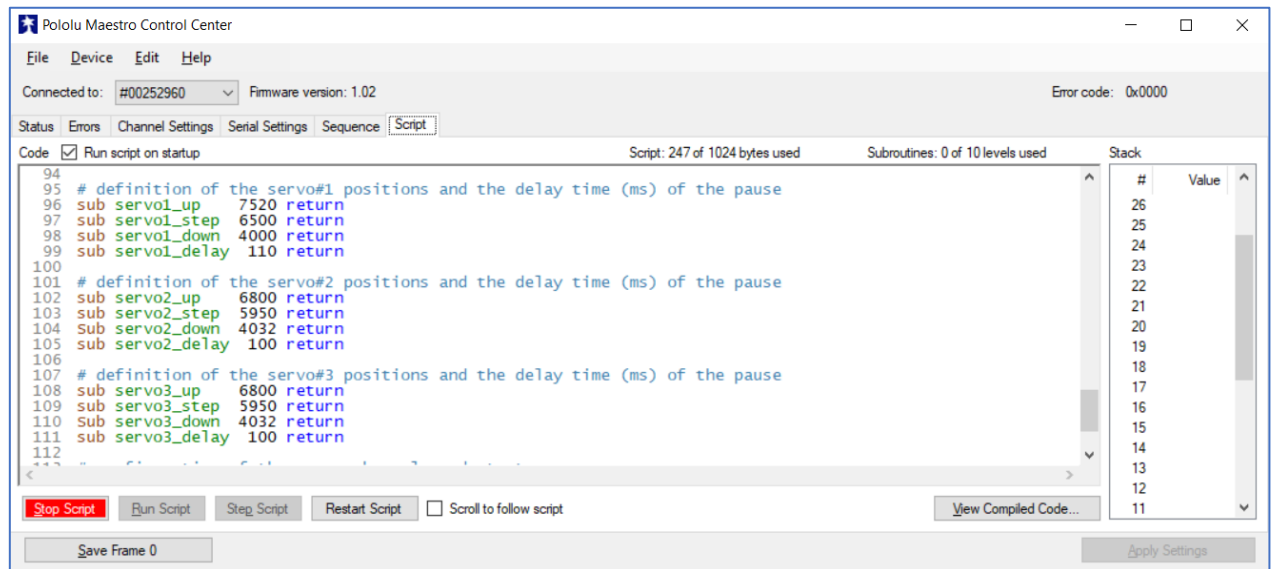
With this connection scheme, launch the Maestro Control Center application installed previously. Load the settings file by accessing “File>Open settings file”, select the file “*Settings\_control\_board.txt*” and click the button “*Apply Settings*” at the bottom. This will load into the control board the configuration of each I/O channel and the script to control the dispensers. Pause the execution (“*stop*” red button) of the ongoing script in the “*Script*” tab to be able to adjust the positions of the servos.

Go to the “*Status*” tab (see *Figure 7*) and modify the servo positions (move their sliders) to determine the convenient upper and lower arm position for each dispenser. Note those maximum and minimum position values for each servo.



**Figure 7.** Maestro Control Center program interface, ‘Status’ tab. View of the live status of the input and output channels (i.e., the lecture of the trigger signals and the position and configuration of the servomotors).

- Switch back to the “Script” tab to edit the script, focusing in the section of the code shown in *Figure 8*. Change the maximum and minimum position value (up/down positions) of each servo by the values previously found multiplied by four (to match the change in resolution). Load the script to the control board by clicking to “Apply Settings” and run the script to test it. Those position values might still need to be tuned, repeat the process of modifying and testing their outcome until reaching the desired behaviour. Also, if required, the pause that is performed in the middle of the ascent can be adjusted in position (step position) and duration (delay time, in ms).



**Figure 8.** Maestro Control Center program interface, ‘Script’ tab. Shown section of the script enables to adjust the range of motion of the dispensers individually.

- Check the “Run script on startup” option to enable the program execution in the control board when disconnected from the USB. Save the modifications introduced on a new settings file. Finally, disconnect the USB from the control board, screw it back to the bottom of the control box and enable the secondary board supply from the I/O stage (place back the jumper). The dispensers can be autonomously operated now, requiring only supply from the wall power adapter.