



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA



**POTENCIAL APLICACIÓN DE TERAPIA CELULAR EN EL TRAUMA MEDULAR
CANINO**

Por

Florencia ODRIOZOLA SOUZA

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Medicina.

MODALIDAD: Revisión Monográfica

MONTEVIDEO

URUGUAY

2021

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dra. Jacqueline Maisonnave

Segundo miembro



Dr. Kevin Yaneselli

Tercer miembro



Dra. Daniela Izquierdo

Cuarto miembro



Dra. Alejandra Mondino

Quinto miembro



Dr. Luis Delucchi

Fecha de defensa: 26 de agosto del 2021.

Autora: Florencia Odriozola.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia por el esfuerzo y la oportunidad de dejar mi ciudad natal para estudiar en Montevideo y alcanzar una de mis más grandes metas, la de ser médica veterinaria, por no dejarme bajar los brazos cuando todo parecía gris, por no presionarme y siempre tener las palabras más alentadoras. Como también agradecerle a mi hermano y compañero por soportarme y enseñarme a convivir todos estos años.

A mis amigas de facultad, por ser fundamentales en esta carrera universitaria.

A mi tutor, el Dr. Kevin Yaneselli por sus horas de dedicación y buena disposición, por brindarme las herramientas necesarias para realizar esta monografía, por transmitirme tranquilidad y seguridad en todo momento, por motivarme a que podía lograrlo.

A mi co-tutora la Dra. Alejandra Mondino por proponerme e incentivar me con la temática de dicha tesis. Agradecerle por su buena voluntad, paciencia y calidez al hablar. Por su atención sin importar día y hora ya que por más de encontrarse en otro país nunca fue un impedimento para avanzar.

Al Dr. Luis Delucchi, por aceptar ser mi co-tutor, por despertar en mí la fascinación por la neurología veterinaria y por enseñarme las bases clínicas para utilizarlas a futuro.

Un agradecimiento especial a Julia y Alejandra de biblioteca por ayudarme con bibliografía y facilitarme artículos cuando por sí sola no podía hacerlo.

Por último, a los integrantes del tribunal de esta tesis de grado, por brindarme su tiempo y atención.

TABLA DE CONTENIDO	
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	6
LISTADO DE TABLAS	9
LISTADO DE FIGURAS	10
RESUMEN.....	11
SUMMARY	12
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general	14
2.1.1. Objetivos específicos	14
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Sistema Nervioso (SN).....	15
3.1.1. Desarrollo del SN	15
3.1.2. Características anatómo-fisiológicas del SN del perro (<i>Canis familiaris</i>) ..	17
3.3 Fisiopatología del trauma medular agudo (TMA)	23
3.4 Signos clínicos	26
3.5 Clasificación de las enfermedades medulares	29
3.5.1 Enfermedades traumáticas de médula espinal	29
a) Fracturas, luxaciones y luxofracturas de la columna vertebral	29
b) Enfermedad de disco intervertebral	29
3.6 Métodos diagnósticos.....	31
3.7 Tratamientos tradicionales de patologías medulares	33
3.7.1. Tratamiento conservador	34
3.7.2 Tratamiento quirúrgico	34
3.7.3 Rehabilitación.....	35
3.8. Terapia celular para patologías medulares.....	36
3.8.1 Características de las células madre/progenitoras y sus propiedades terapéuticas.....	36
3.8.2 Capacidad de neurodiferenciación de células madre adultas y células progenitoras.	38
3.8.3 Seguridad y eficacia de las terapias celulares en TMA	41
Modelos caninos con lesiones inducidas	43

Casos de estudio con lesiones naturales en caninos	53
CONSIDERACIONES FINALES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AF: anillo fibroso

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

C/D: congeladas y descongeladas

CME: células madre embrionarias

CMM: células madre mesenquimales

CMM-MO: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea

CMM-TA: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

CMM-TA+HO-1: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea con expresión de HO-1

CMN: células madre neurales

CMNA: células madre neurales adultas

CMNE: células madre neurales embrionarias

CnAT: colinacetiltransferasa

COX: enzima ciclooxigenasa

COX-2: enzima ciclooxigenasa- 2

CPN: células progenitoras neurales

CS: células de Schwann

DDEC: dientes deciduos exfoliados caninos

DIV: disco intervertebral

EA: electroacupuntura

G- CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GABA: ácido γ -aminobutírico

GAGs: glicosaminoglicanos

GDNF: factor neurotrófico derivado de la línea glial

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

HO-1: enzima hemoxigenasa
HP: histopatología
IHQ: inmunohistoquímica
IL-1 beta: interleucina 1 -beta
IL-12: interleucina 12
IL-6: interleucina 6
INF- gamma: interferón gamma
IPSC: induced pluripotent stem cells
IV: intravenoso
LCR: líquido cefalorraquídeo
MAP2: proteína asociada a microtúbulos
MAs: miembros anteriores
MO: médula ósea
MPs: miembros posteriores
MPSS: metilprednisolona
NGF: factor de crecimiento nervioso
NMI: neurona motora inferior
NMS: neurona motora superior
NP: núcleo pulposo
NS: nódulos de Schmorl
NT: neurotransmisores
NT-3: neurotrofina 3
PDP: percepción de dolor profundo
PT: placas terminales
RM: resonancia magnética
RX: radiografía
SB: sustancia blanca

SCU: sangre de cordón umbilical

SDF-1: factor derivado de células estromales

SF: solución fisiológica

SG: sustancia gris

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

ST: sin tratamiento

TA: tejido adiposo

TC: tomografía computarizada

TDD: tensor de difusión

TENS: electroestimulación nerviosa transcutánea

TMA: trauma medular agudo

TNF- alfa: factor de necrosis tumoral

TNG- beta: factor de crecimiento transformante beta

VEFG: factor de crecimiento endotelial vascular

ZT: zona de transición

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Signos clínicos asociados a lesión de neuronas motoras. NMS: neurona motora superior. NMI: neurona motora inferior. 26

Tabla 2. Trabajos de lesiones de médula espinal inducidas y naturales donde se utilizan células madre como medida terapéutica. Abreviaturas: Congeladas/Descongeladas (C/D), células madre (CMM), CMM derivadas de médula ósea (CMM-MO). 62

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso.	14
Figura 2. Estructura de las meninges	18
Figura 3 Columna vertebral canina, clasificación de tipos vertebrales y sus segmentos	19
Figura 4. Localización de los componentes del circuito motor	21
Figura 5. Signos clínicos observados según segmentos medulares comprometidos	27
Figura 6. Clasificación de células madre según su potencialidad y origen.	37
Figura 7. Evidencia de la capacidad neurogénica de las CMM-MO	40
Figura 8. Tipos y vías de administración de CMM utilizadas en lesiones de médula espinal canina.	41
Figura 9. Efectos del trasplante de CMM en modelo de lesión medular inducida.	47
Figura 10. Patrón de distribución de fibras nerviosas regeneradas en sitio de lesión medular inducida.	48
Figura 11. Evolución de un canino con lesión natural de médula espinal por fractura vertebral tratado con CMM-MO	56
Figura 12. Aplicación de CMM por vía percutánea.	57

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre terapia celular basada en células madre mesenquimales (CMM) aplicadas a lesiones de médula espinal en caninos. A su vez, para una mejor comprensión del tema se planteó un breve recordatorio anatómico, fisiológico y patológico sobre el sistema nervioso, haciendo énfasis en el sistema nervioso central y en la fisiopatología del trauma medular. Sumado a esto, se describieron las enfermedades caninas más comunes propensas a ocasionar daño medular, así como métodos diagnósticos. En la actualidad los tratamientos disponibles no siempre alcanzan los resultados deseados, los tiempos de recuperación son prolongados y la regeneración del tejido dañado no es posible; por lo cual surge la necesidad de encontrar nuevas terapias alternativas. En esta tesis, con el objetivo de estudiar la seguridad y eficacia terapéutica se seleccionaron artículos científicos actuales relacionados con la aplicación de terapia celular en lesiones medulares (LME) tanto inducidas como naturales. Las consideraciones finales de la exhaustiva revisión nos indica que debido a que la terapia con CMM se encuentra aún en fase experimental, a pesar de tener prometedores resultados, presenta aún grandes obstáculos que no permiten su aplicación en la clínica diaria. Las principales limitaciones encontradas son la estandarización de diversos parámetros como el tipo y cantidad de células, así como la vía y momento de administración. Estas son algunas de las interrogantes que aún están en estudio. Otras interrogantes son qué tipo de pacientes se beneficiarían con estas terapias, cuál es su eficacia y si deben ser combinadas con otras terapias. Por último, se encuentra un campo emergente en la medicina regenerativa, si bien es cierto que se podrían obtener beneficios, aún requiere generar más evidencia científica con ensayos clínicos experimentales sobre la terapia celular en LME en caninos para estandarizar su aplicación, determinar su eficacia y seguridad en detalle.

SUMMARY

This work consisted in a bibliographic review about cellular therapy based on the application of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) on spinal cord injuries in dogs. Additionally, in order to improve the comprehension of the topic, a brief anatomical, physiological and pathological description of the nervous system with focus in the central nervous system and the pathophysiology of spinal cord trauma was performed. Furthermore, we described the most common canine diseases that can cause spinal cord injury as well as their diagnostic approach. Nowadays the treatment options that are available for these diseases do not always achieve the expected outcomes; the recovery periods are long, and regeneration of the damaged tissue is not possible. Therefore, new alternative therapies are needed. In this thesis, we selected articles published in the past few years related to the application of cellular therapy on natural or induced spinal cord injuries (SCI) with the goal of studying their safety and therapeutic efficacy. Additionally, the final considerations of this exhaustive review points towards the fact that because MSC therapies are still in experimental phases, even if they have promising results, they still have important obstacles that do not allow its use in the daily clinical practice. The main limitations founded are the lack of standardization of several parameters such as, the type and amount of cells as well as its route and time of administration; this are the inquiries that are still being studied. Other questions are, what kind of patients benefit from the use of these therapies? what is the efficacy? and, do need to be combined with other therapies? Finally, an emergent field can be found in the regenerative medicine. While it is true that it could lead to benefic results, in order to standardize the application and determine its efficacy and safety in detail, it still needs to generate more scientific evidence by means of clinical experimental studies about cellular therapy on SCI in dogs.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas son una de las principales causas de muerte en perros adultos (Fleming, Creevy y Promislow, 2011 y O'Neil, McGreevy, Thomson y Brodbelt, 2013). Existen diversas neuropatologías en los caninos domésticos; de acuerdo a su etiología, es posible clasificarlas utilizando la regla nemotécnica "VITAMIN D", en patologías vasculares, idiopáticas, traumáticas/tóxicas, anomalías congénitas, metabólicas, infecciosas y/o inflamatorias, neoplásicas/nutricionales y degenerativas (Pellegrino, 2014). Por otra parte, de acuerdo a la región que afectan, pueden dividirse en aquellas que impactan sobre el sistema nervioso central (SNC) o sobre el sistema nervioso periférico (SNP). Aquellas que afectan el SNC pueden, a su vez, subclasificarse en dos categorías: encefálicas y medulares (Casallas, Duran, Pacheco y Rueda, 2018). Las patologías medulares son las patologías del SNC con mayor prevalencia en caninos a nivel nacional (Mondino, Piaggio, Loureiro, Vasconcellos y Delucchi, 2015) y regional (Pellegrino, 2011). Estas enfermedades, pueden llevar a una pérdida transitoria o permanente de las funciones viscerales (Wang, et al. 2017). Independientemente de su causa suelen presentar una amplia gama de sintomatología clínica, muchas veces devastadora, que va desde la presencia de dolor leve a la posible paresia o parálisis de los cuatro miembros y/o incontinencia urinaria y fecal (Coates, et al. 2012; Dewey y Da costa. 2016). Esto conlleva a que muchos pacientes permanezcan parcial o completamente dependientes físicamente de sus propietarios por el resto de sus vidas (Šulla, Balik, Hornak y Ledecy, 2018). Las lesiones traumáticas de la médula espinal (ME) son las patologías que ocurren con mayor frecuencia en caninos (Wang, et al. 2017; Webb, Ngan y Fowler, 2018). Dentro de ellas, las causas principales son los traumas producidos por hernias de discos intervertebrales debidas a cambios degenerativos de los mismos y por fuentes externas como, por ejemplo, accidentes automovilísticos (Bruce y col. 2008; Wang, et al. 2017). Dado que, mediante la instauración de los tratamientos tradicionales muchas veces no se obtienen los resultados deseados, surge la necesidad de generar nuevas opciones terapéuticas. Una alternativa o complemento para las terapias tradicionales que resulta prometedora es la medicina regenerativa, principalmente el empleo de células madre mesenquimales (CMM), del inglés *mesenchymal stromal/stem cells* – MSCs, u otros progenitores neuronales (Khan, Mafi y Mafi, 2017). El potencial terapéutico de las CMM está dado por las siguientes propiedades: 1) capacidad de diferenciación en linajes mesodérmicos y también en células del ectodermo, como neuronas, por el fenómeno de transdiferenciación; 2) inmunomodulación en el sitio de lesión y la capacidad de suprimir o disminuir la inflamación; 3) regulación de la regeneración tisular (Khan, et al. 2017; Wu, et al. 2018).

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica sobre nuevas opciones terapéuticas basadas en el uso de CMM u otro progenitor celular para el trauma medular en caninos.

2.1.1. Objetivos específicos

- a) Describir la fisiopatología, signos clínicos como diagnóstico y tratamientos tradicionales del trauma medular a consecuencia de patologías más frecuentes en caninos destacándose la enfermedad de disco intervertebral como las fracturas y/o luxaciones vertebrales.
- b) Realizar una revisión bibliográfica sobre la aplicación de terapia celular en lesiones de médula espinal inducidas y naturales en caninos para conocer los aspectos de eficacia y seguridad terapéutica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sistema Nervioso (SN)

El sistema nervioso es un sistema muy complejo, que tiene la responsabilidad de regular las reacciones de supervivencia de cada especie. Si bien constituye un único sistema, es dividido para su estudio en sistema nervioso central (SNC), formado por encéfalo y médula espinal (ME), y en sistema nervioso periférico (SNP), integrado por fibras nerviosas craneales, espinales y autónomas con sus ganglios asociados. Las células que componen al SN pueden dividirse en dos grandes categorías; neuronas y células de soporte que constituyen la neuroglia o glia (De Lahunta, Glass y Kent, 2015; Dyce, Sack y Wensing, 2007).

3.1.1. Desarrollo del SN

Durante la embriogénesis se forman tres capas germinales, que darán origen a todos los tejidos y órganos; ectodermo, mesodermo y endodermo (Uemura, 2015). El SN aparece muy tempranamente durante el proceso de neurulación como un engrosamiento del ectodermo, denominado placa neural o neuroectodermo, que se ubica dorsalmente a la notocorda a lo largo del embrión. Este proceso ocurre por inducción neural de la notocorda y del mesodermo. La placa neural, comienza a invaginarse a lo largo de su eje formando el surco neural, hasta que los extremos laterales se fusionan centralmente formando el tubo neural (Figura 1) (Sanes, Reh y Harris, 2012). La fusión comienza en el centro del tubo neural, los extremos abiertos del tubo neural son llamados neuroporos (De Lahunta, et al. 2015). Por otra parte, la placa neural y el ectodermo inducen a las células ectodérmicas a desarrollar características mesenquimatosas formando la cresta neural, a partir de la cual se originará el sistema nervioso periférico y autónomo (Mancini, Milh y Chabrol, 2015).

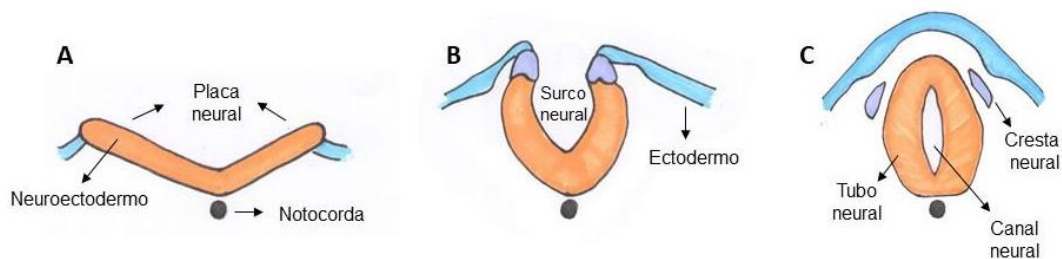


Figura 1. Etapas del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso. El proceso ocurre a partir del engrosamiento del neuroectodermo, luego su invaginación central da origen a la placa neural. La notocorda forma el esqueleto axial del embrión que perdura hasta la formación de las vértebras (A). Se forma el surco neural y pliegues laterales del ectodermo (B) que da lugar al tubo neural y canal neural a ambos costados está la cresta neural (C). Elaboración propia basada en imágenes de Sanes, et, al. 2012.

A partir del cierre de los neuroporos, quedarán determinadas las dos grandes divisiones del sistema nervioso central. Por un lado, el extremo anterior o cefálico originará las tres vesículas primarias que darán origen al encéfalo (Cunningham y Klein, 2009). Estas son; el cerebro anterior o prosencéfalo, el cerebro medio o mesencéfalo y el cerebro posterior o rombencéfalo (Bayona, 2012). A partir del proencéfalo se origina el telencéfalo (corteza cerebral, ganglios basales, sistema límbico) y diencefalo (tálamo, hipotálamo, neurohipófisis), el mesencéfalo continúa como tal, el romboencéfalo se diferencia en metencéfalo (cerebelo y protuberancia) y mielencéfalo (bulbo raquídeo) (De Lahuta, et al. 2015). Por otro lado, el extremo posterior del tubo neural dará lugar al cordón espinal (Uemura, 2015).

El ectodermo del tubo neural está compuesto por un epitelio pseudoestratificado, con células con gran actividad mitótica que se diferencian en neuroblastos (células precursoras de neuronas) y espongioblastos (precursores de las células gliales) (De Lahunta, et al. 2015). Está organizado en tres capas; en la más interna, la capa endodermal, ocurre la mitosis de células neuroepiteliales de las cuales algunas permanecen para tapizar el cerebro y la médula espinal adulta y la mayoría migran hacia la capa media o manto donde se diferencian en neuronas o glía. Las neuronas envían sus axones fuera del lumen del tubo, formando la capa externa o marginal, una zona pobre en células. La zona del manto formará luego la sustancia gris, y la zona marginal la sustancia blanca (Bayona, 2012; Sanes, et al. 2012).

La mayoría de las neuronas se establecen antes del nacimiento, una vez que una neurona madura no vuelve a sufrir mitosis y persiste durante toda la vida del animal. Por lo tanto, la vida adulta está marcada por una disminución gradual de su número (Dyce, et al. 2007). Sin embargo, se ha comprobado que nichos de células progenitoras permanecen en la vida postnatal como reserva para la neurogénesis adulta. Antes del nacimiento, células madre neurales (CMN) y precursores neurales presentes en la pared de los ventrículos laterales dan origen a neuroblastos y células de la glía radial que migran hacia la zona subventricular rostral e hipocampo. Estas células podrán diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en la adultez (Amrein y Lipp, 2009; De Lahunta, et al. 2015; Duan, et al. 2016; Kempermann, 2015; Orechino, et al. 2018). Las regiones del sistema nervioso con capacidad neurogénica en la adultez varían según especies; en roedores por ejemplo predomina en el hipocampo (Kempermann, 2015), mientras que en primates y caninos los nichos se encuentran principalmente en la zona subventricular rostral del encéfalo (Orechino, et al. 2018). Además, en la médula espinal, se ha demostrado la existencia de tres tipos de células progenitoras neurales: los progenitores de astrocitos, los progenitores de oligodendrocitos y las células endodermales. Sin embargo, los progenitores de oligodendrocitos y astrocitos, como su nombre lo indica, no son multipotentes, por lo tanto, dan origen solamente a oligodendrocitos y astrocitos respectivamente. Las células endodermales progenitoras, por el contrario, poseen potencialidad neurogénica,

pero, tras lesiones en la médula espinal tienden a diferenciarse en glia y no en neuronas (Hachem, Mothe y Tator. 2020; Habib, et al. 2016).

3.1.2. Características anatómo-fisiológicas del SN del perro (*Canis familiaris*)

El sistema nervioso, como fue expresado anteriormente, se divide para su estudio en 2 regiones principales; el SNC que consiste en el encéfalo y la médula espinal; y el SNP formado por doce pares de nervios craneales y nervios espinales, así como por sus ganglios asociados. El SNP permite al SNC comunicarse con todos los tejidos corporales. El SNC está formado por 2 tipos principales de células, las neuronas y las células gliales. Las neuronas son la unidad funcional básica del SN, son células altamente especializadas para la señalización eléctrica a través de largas distancias (Dyce, et al. 2007). Son células excitables capaces de recibir e integrar información a partir de receptores sensoriales y transmitir información a otras neuronas u órganos efectores mediante sinapsis. Existen tres tipos de neuronas, las neuronas sensitivas, aquellas que transportan información desde receptores celulares en órganos sensoriales a otras neuronas, las motoneuronas las cuales transmiten información desde el eje neural hasta músculos somáticos o viscerales y las interneuronas quienes generan conexiones entre neuronas mediante cortos axones (Thomson y Hahn, 2012).

La mayor parte de la comunicación entre neuronas y de éstas a órganos efectores, ocurre mediante sinapsis químicas, con la participación de neurotransmisores (NT) (Velayos y Diéguez, 2015). Estos, son sustancias químicas que se encuentran dentro de vesículas presinápticas que se liberan mediante estímulos a la hendidura sináptica, para unirse a receptores presentes en la membrana postsináptica donde ejercen su acción excitatoria o inhibitoria. El principal NT inhibitorio del SNC es el GABA, mientras que el glutamato es el principal excitatorio (Rubio y Boggio, 2015). Además, encontramos a la glicina, otro NT inhibitorio, principalmente del tronco encefálico y médula espinal, implicado en la coordinación de respuestas reflejas, procesamiento de señales sensoriales y sensación de dolor (Zafra y Giménez, 2008). Los axones son las proyecciones de las neuronas que permiten la comunicación entre células excitables y se encargan de conducir el potencial de acción. Algunos de ellos presentan vaina de mielina que les confiere una rápida acción, con mayor eficiencia energética y mayor velocidad de transmisión. La mielina previene el intercambio iónico necesario para la despolarización de la membrana celular y la generación del potencial de acción, por lo tanto, en los axones mielínicos, el potencial de acción se transmite de forma saltatoria por interrupciones de la mielina a intervalos regulares conocidas como nodos de Ranvier. Otros axones carecen de mielina y si bien son capaces de conducir el potencial de acción éste es conducido a menor velocidad y con mayor gasto energético (Thomson y Hahn, 2012). Las células gliales, si bien no son capaces de transmitir señales eléctricas, cumplen funciones esenciales de sostén, defensa y nutrición a las neuronas, así como también modulan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Douglas y Stevens-Graham, 2002; Purves, et al. 2004).

Todo el SNC está recubierto por tres capas de tejido conectivo derivadas de la cresta neural y parte del mesodermo conocidas como meninges (Figura 2). Éstas, a diferencia del resto del SN, tienen un origen mesenquimal. La duramadre es la capa más gruesa y externa, se encuentra fusionada al periostio en estrecha asociación con la cavidad craneana, a nivel de las dos primeras vértebras cervicales se separa del periostio por tejido conjuntivo laxo y tejido adiposo (De Lahunta, et al. 2015). Alrededor del encéfalo, la duramadre da origen a membranas que separan regiones encefálicas entre sí (Decimo, Fumagalli, Berton, Krampera y Bifari, 2012; Haines y Mihailoff, 2018). La membrana intermedia, la aracnoides, es una membrana celular fina que está unida a la duramadre suprayacente. Recibe este nombre porque envía trabéculas a la membrana más interna, la piamadre, que recuerdan a una tela de araña. El espacio que recorren estas trabéculas es llamado espacio subaracnoideo. En este espacio se encuentran gran cantidad de vasos sanguíneos y el líquido cefalorraquídeo (LCR) producido por los plexos coroideos (Cunningham y Klein, 2009; Haines y Mihailoff, 2018; König y Liebich, 2008) a través de una ultrafiltración selectiva del plasma sanguíneo (De Lahunta, et al. 2015). Por último, la piamadre, se encuentra en íntimo contacto con el encéfalo y la médula espinal y acompaña todos sus surcos y elevaciones. La aracnoides y piamadre son también conocidas como leptomeninges (Haines y Elden, 2018).

La función principal de las meninges y LCR es la protección del SNC, se encargan de mantener estable el entorno neuronal proporcionando micronutrientes y transportando desechos metabólicos hacia el exterior; también absorben fuerzas en movimientos bruscos del cuerpo y amortiguan impactos que podrían causar lesiones (De Lahunta, et al. 2015). Se comprobó la existencia de nichos celulares con potencialidad neurogénica en las meninges, que podrían actuar como precursores endógenos que contribuyen a la recuperación del SNC tras una lesión (Decimo, et al. 2012).

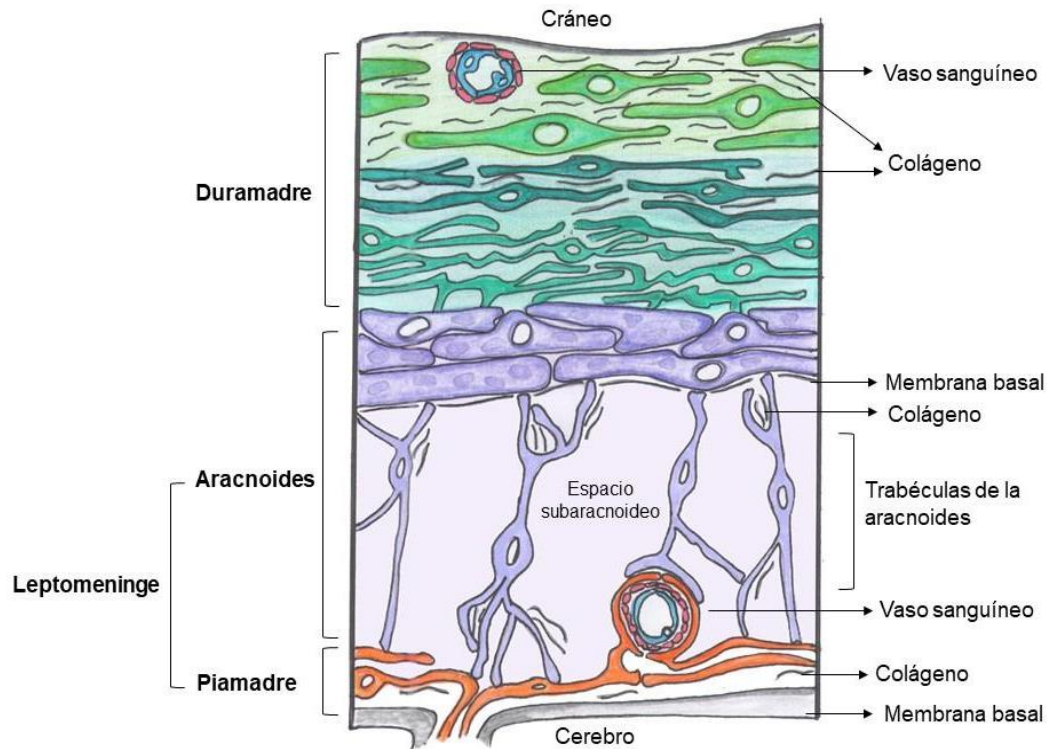


Figura 2. Estructura de las meninges. Elaboración propia basada en imágenes de Haines y Mihailoff, 2019.

El encéfalo puede ser dividido en tres regiones principales: el telencéfalo (hemisferios cerebrales), el cerebelo (metencéfalo dorsal) y el tronco encefálico que conecta con la médula espinal. Este último, está compuesto por el mielencéfalo (médula oblonga), el metencéfalo ventral (puente), el mesencéfalo o cerebro medio y el diencefalo (tálamo e hipotálamo) (Cunningham y Klein. 2009; De Lahunta, et al. 2015). Cada una de estas regiones posee una compleja estructura interna; por ejemplo, cada hemisferio cerebral, posee una superficie exterior, la corteza cerebral (sustancia gris) compuesta por varias capas celulares. Además, internamente a la corteza, existen grandes cantidades de sustancia blanca subcortical junto con algunos agregados de sustancia gris que forman los núcleos basales y la amígdala (Haines y Mihailoff, 2019).

El diencefalo es el centro del encéfalo, está compuesto por el tálamo e hipotálamo los cuales consisten en conjuntos de pequeños núcleos celulares. El tálamo se encarga de modular la información que llega a la corteza cerebral y el hipotálamo mantiene la homeostasis mediante la regulación del sistema nervioso autónomo y el control hormonal de la hipófisis mantiene la homeostasis. El mesencéfalo es importante para el procesamiento y la transmisión de la información visual y auditiva que ingresa al cerebro, además, controla movimientos oculares (De Lahunta, et al. 2015). El tronco encefálico se encuentra encargado de controlar diversas funciones esenciales para la vida; en primer lugar, controla los estados de consciencia ya que en él se encuentra la formación reticular, quien origina el centro reticular activador ascendente encargado

de activar la corteza cerebral, permitiendo la vigilia, la respuesta frente a estímulos y los procesos atencionales. Además, el tronco encefálico controla diversas funciones vegetativas, por ejemplo, la actividad cardiovascular y respiratoria, la función salival, el vómito, entre otras. Adicionalmente, colabora con el cerebelo en la integración de movilidad, postura y equilibrio (Uemura, 2015).

Por otra parte, la ME, puede ser dividida en segmentos que se relacionan a pares de nervios espinales en: 8 segmentos cervicales, 13 torácicos, 7 lumbares, 3 sacros y 5 caudales, un conjunto de terminaciones de raíces nerviosas que forman la cauda equina (Robbins, et al. 2010). El tamaño de los segmentos depende del volumen del tejido al que inervan; por ejemplo, la inervación de los miembros torácicos y pélvicos determina un incremento en sustancia blanca y cuerpos neuronales conocidos como intumescencia cervicotorácica ubicada entre C6-T2 y la intumescencia lumbosacra en L4 - S3 respectivamente. La ME se encuentra protegida por la columna vertebral formada por un conjunto de vértebras, 7 cervicales (C1-C7), 13 torácicas (T1-T13), 7 lumbares (L1-L7) y 3 sacras (S1- S3) (Dyce, Sack y Wensing, 2007) (Figura 3). La mayoría de los segmentos espinales se encuentran ubicados cranealmente a la vértebra del mismo nombre. En perros de razas medianas a grandes la médula espinal termina a nivel de las vértebras L6-L7 mientras que en perros pequeños ocurre un espacio vertebral más hacia caudal (Dewey y Da Costa, 2015).

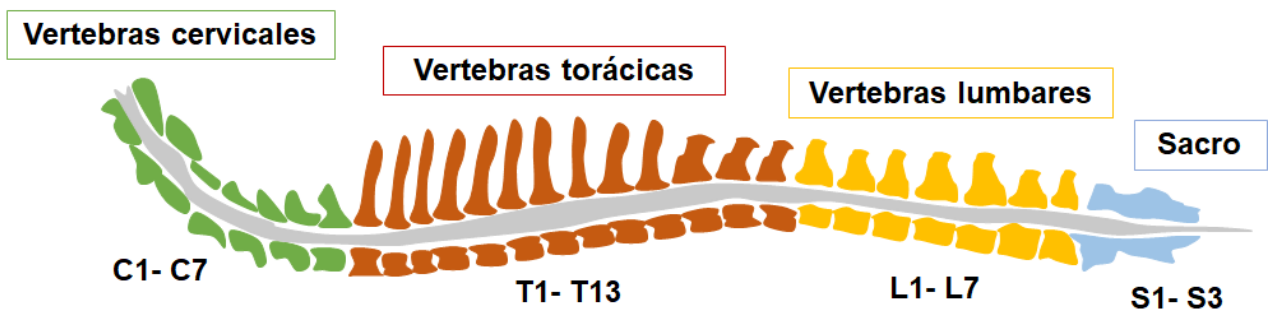


Figura 3. Columna vertebral canina, clasificación de tipos vertebrales y sus segmentos. Elaboración propia.

Los cuerpos vertebrales de C2 a S1 y todas las vértebras coccígeas están interconectadas por discos intervertebrales (DIV). Los DIV proporcionan estabilidad a la columna vertebral al unir las vértebras, además de permitir el movimiento. A su vez, protege a la médula espinal y facilita la salida y entrada de nervios periféricos. Cada DIV está formado por 4 regiones: núcleo pulposos central (NP), zona de transición (ZT), anillo fibroso (AF) y las placas terminales cartilaginosas (PT). El NP es una masa gelatinosa ubicada dorsalmente dentro del DIV y limitado por la ZT, formado hasta en un 88% por agua en animales jóvenes. Deriva de la notocorda y en el proceso de maduración a medida que el individuo crece, las células notocordales son reemplazadas por células similares a condrocitos. Sus componentes celulares producen colágeno tipo II y proteoglicanos formados por glicosaminoglicanos (GAGs) como el condroitín-6-sulfato y queratán sulfato, a este complejo se le agrega el ácido

hialurónico formando agregados de alta presión osmótica motivo por el cual el NP retiene agua, proporcionando estabilidad y protección frente a fuerzas compresivas (Fenn y Olby, 2020). Está encargado de regular la presión osmótica del DIV, absorber y resistir cargas principalmente en movimientos y compresiones axiales. La TZ es la transición entre el NP y el AF, es una matriz fibrosa formada por condrocitos y fibrocitos a medida que se acerca al AF. El AF se caracteriza por la formación de laminillas concéntricas de fibrocartílago, se lo puede dividir en AF interno, formado principalmente por condrocitos, se une a las placas terminales cartilaginosas y el AF externo, formado por cantidades crecientes de colágeno tipo I, sobre los huesos vertebrales adyacentes. También está formado por agua, aunque en menor medida (60%) siendo más rígido y menos flexible, su función es estabilizar y proteger al NP de fuertes presiones. Ninguna de las estructuras previamente mencionadas cuenta con irrigación sanguínea. Únicamente el anillo externo del AF tiene una ligera inervación. Las PT son ligamentos longitudinales, dorsal y ventral que fijan los DIV a las vértebras adyacentes, manteniéndolos en su lugar, a su vez se encargan de absorber impactos y se nutren por ósmosis y difusión a través de una rica red vascular proveniente de arterias epifisarias. Los DIV presentan un espesor menor en su porción dorsal, la cual contacta con el canal medular, siendo ésta una zona susceptible al daño (Bergkunt et al. 2013; Fenn y Olby, 2020; Smolders, et al. 2013).

Al corte transversal se distinguen dos zonas: la sustancia gris (SG) y la sustancia blanca (SB). Además, cada zona de la ME puede dividirse funcionalmente, el cuerno de la SG puede hacerlo en hasta 10 regiones mientras que la SB puede dividirse en más de una docena de áreas (Thomson y Hahn, 2012). La SG se encuentra en el interior, en forma de H o "mariposa", formada por un asta dorsal (sensitiva) y un asta ventral (motora). A nivel de los segmentos espinales torácicos y lumbares existe una pequeña asta lateral formada por los cuerpos neuronales de neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático. La SB rodea a la SG y está formada por axones mielínicos agrupados en tres cordones o funículos; dorsal, lateral y ventral (Dewey y Da Costa, 2015). La SB consiste en fibras nerviosas aferentes que provienen de las raíces dorsales y eferentes que forman las raíces ventrales de los nervios espinales y grupos de fibras organizadas longitudinalmente. El sistema motor está formado por neuronas motoras superiores (NMS) que organizan y dirigen la actividad de neuronas motoras inferiores (NMI) (Thomson y Hahn, 2012). Las NMS se encuentran en su totalidad en el SNC, sus somas se ubican en núcleos motores del tronco encefálico y prosencéfalo y sus axones se conectan con NMI mediante sinapsis directas o indirectas por interneuronas. Los cuerpos neuronales de las NMI se ubican principalmente en la sustancia gris de la ME, en las intumescencias cervicotorácicas y lumbosacras, pero también pueden encontrarse en el tronco encefálico. Sus axones forman nervios espinales y craneales. Los nervios espinales se proyectan hacia a órganos efectores, se encargan de inervar músculos, generar el tono muscular y participar en los reflejos espinales (Figura 4) (Cunningham y Klein, 2009; Dewey y Da Costa, 2015; Thomson y Hahn, 2012).

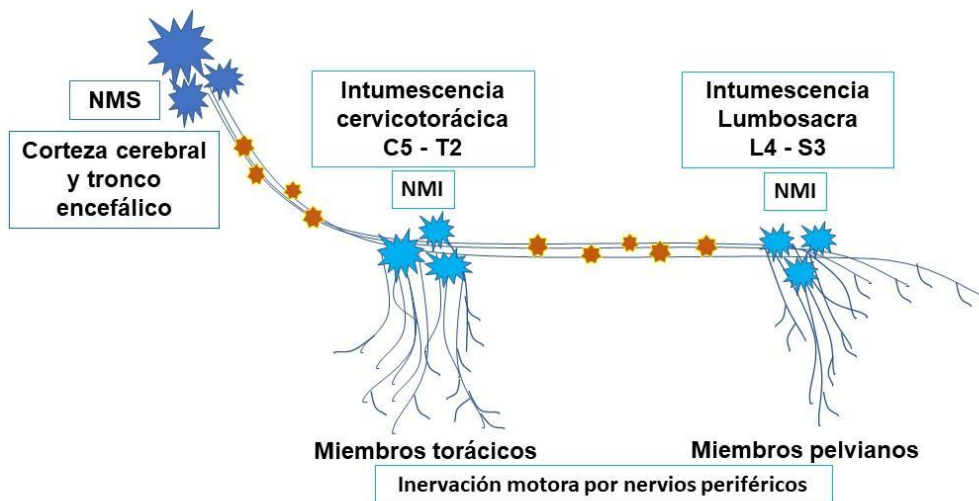


Figura 4. Localización de los componentes del circuito motor. Elaboración propia.

El SN recoge información sensitiva interna o externa mediante receptores del SNP, fibras nerviosas aferentes sensitivas la transmiten, ésta se integra en diferentes niveles hasta alcanzar el último escalón que es la corteza cerebral del SNC quien planifica y envía respuestas motoras (García, et al. 1995). Por otra parte, fibras nerviosas eferentes motoras transmiten la información hacia órganos efectores como glándulas y músculos y así el SNP ejecuta una respuesta final (Dyce, Song y Wensing, 2007; Pellegrino, 2010). La información sensorial se transmite a la ME, en primera instancia es donde es procesada y modulada antes de ser enviada al encéfalo, para recibir luego de éste órdenes motoras (Cunningham y Klein, 2009; García, et al. 1995).

3.3 Fisiopatología del trauma medular agudo (TMA)

El TMA abarca múltiples mecanismos que generalmente pueden solaparse, como: laceraciones, compresiones con isquemia o sin ésta, contusiones y conmociones (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016a). Puede ocurrir tanto por agentes exógenos (accidentes automovilísticos, heridas de armas de fuego o armas blancas, como por agentes endógenos (hernias discales) (Hayta y Elden 2018). El mecanismo más común es la compresión persistente, la cual suele ser causada por fragmentos óseos producto de fracturas con estallido del cuerpo vertebral, por hernias discales o luxaciones (Pellegrino, 2014; Hayta y Elden, 2017).

La injuria medular ocurre por dos mecanismos principales, el daño primario y el daño secundario. El primario consiste en el daño inmediato provocado por un trauma como compresión, contusión o laceración sobre la médula espinal. El tipo de daño mecánico principal tiene un efecto significativo sobre el desarrollo del daño secundario, difiriendo de acuerdo a la extensión y gravedad de lesión (Hilton, Moulson y Tetzlaft, 2016). La rotura de las membranas celulares altera la perfusión medular desarrollándose hemorragia, edema y consecuentemente isquemia. La reducción de la actividad metabólica produce una reducción del oxígeno que determina una lesión neuronal y glial generalizada. Debido a la mayor vascularización y requerimientos metabólicos de la SG y por lo tanto mayor sensibilidad a la isquemia con respecto a la SB, el daño primario afecta en mayor medida a la SG (Dumont, et al. 2001).

El daño secundario, por otra parte, es progresivo, y causado por diversos mecanismos que resultan en muerte o apoptosis neuronal, glial y degeneración axonal que puede durar meses e incluso años. Mientras el daño primario afecta únicamente el sitio de lesión, el secundario tiende a extenderse a segmentos adyacentes de la médula espinal (Hayta y Elden, 2017; Rust y Kaiser, 2017; Olby, 2010). Consiste en una cascada de eventos secundarios que pueden provocar una expansión de la destrucción tisular generando en ocasiones un daño mayor que el causado por la injuria primaria. La evolución del cuadro determina que la zona necrótica central se vuelva quística o forme una cicatriz glial (Ahuja, et al. 2017).

El daño secundario se desencadena inmediatamente posterior al daño primario y es casi imposible pensarlos de forma separada, podemos dividir la fisiopatología de la lesión medular en tres etapas: fase aguda (0 a 48 hs), fase subaguda (48 hs - 2 semanas) y la fase crónica. La fase aguda se caracteriza por alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares que determinan procesos específicos. Primero ocurren cambios vasculares, se caracterizan por una caída en la perfusión de la médula espinal dada por hemorragias petequiales en las primeras 24 horas de ocurrida la lesión que conlleva a una hipoxia celular. La sangre puede acumularse y formar hematomas que provocan compresión de la médula espinal generando una mayor disrupción del flujo arterial y venoso y por lo tanto del aporte de oxígeno. La bomba NA-K ATPasa dependiente de energía se ve afectada en su funcionamiento, ocasionando un acúmulo masivo de Na⁺ intracelular lo que deriva en edema

citotóxico. A su vez, las neuronas y oligodendrocitos dañados liberan glutamato en altas cantidades (principal neurotransmisor excitador del SNC) que se acumulan en el espacio extracelular ya que su recaptación también es dependiente de la bomba de Na-K ATPasa. El acumulo de glutamato determina un aumento de calcio intracelular que empeora el edema y activa a las enzimas caspasas encargadas de la necrosis y apoptosis. Dicho fenómeno se conoce como excitotoxicidad y tiene como resultado la muerte celular. Adicionalmente, ocurre una importante formación de radicales libres del oxígeno, la cual es máxima las primeras 12 horas de ocurrida la lesión y sus niveles se mantienen elevados por una semana. Éstos, dañan las membranas celulares gliales y neuronales por peroxidación lipídica, oxidan proteínas y ácidos nucleicos e inhiben la respiración mitocondrial ayudando en el proceso de la muerte celular (Olby, 2010).

Por último, existe una expresión de citoquinas proinflamatorias desregulada con falta o retraso en la aparición de citoquinas antiinflamatorias, que se cree que contribuyen al desarrollo del daño primario y progreso a la lesión secundaria. El daño secundario ocurre por la activación temprana de células microgliales que liberan citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-6, IL-8 y TNF, a su vez, producen óxido nítrico, el neurotransmisor encargado de la atracción y reclutamiento celular. Ocurre también, un aumento de las metaloproteasas (MMP) que ocasionan un aumento de la permeabilidad de la barrera hematomedular favoreciendo la infiltración celular. En conjunto, la LME en etapa aguda, está dominada por un microambiente proinflamatorio con expresión de moléculas que inhiben la regeneración del tejido nervioso dañado (Spitzbarth, et al. 2020).

A la media hora de ocurrido el trauma medular lo primero en observarse es la microglía activada e hipertrofiada, envolviendo axones dañados. Los neutrófilos son los primeros en llegar a las 5 horas de ocurrida la lesión, a las 12 horas el infiltrado está compuesto en un 90% por neutrófilos y su pico máximo se da a las 24 horas, pero permanecen hasta por una semana. Los macrófagos sanguíneos (monocitos) llegan más lentamente, primero concentrándose en las paredes de los vasos sanguíneos para posteriormente observarse en el parénquima medular, a los 4 días están en su pico máximo. A los 7 días del trauma no se pueden diferenciar los macrófagos periféricos de la microglía activa local y son estas células las que permanecen por semanas incluso meses, hasta los 8-12 meses aún están presentes macrófagos fagocitados en regiones periféricas de sustancia blanca, lo que podría estar indicando el abandono del SNC. A las semanas incluso meses aparecen linfocitos T y B en pequeñas cantidades, principalmente linfocitos T. El entorno comienza a estabilizarse, los restos necróticos se eliminan por macrófagos, los astrocitos restantes presentes en el borde de la lesión se hipertrofian formando una cavidad quística, la cicatriz glial. Si las meninges se dañan la cavidad quística se llena de fibroblastos y la cicatriz glial es de mayor densidad (David, López-Vales y Yong, 2012).

La inflamación es un proceso autolimitante que comienza a disminuir cuando hay un cambio en las citoquinas implicadas en el proceso, de proinflamatorias a antiinflamatorias, el objetivo de esto es permitir la regeneración del tejido dañado y por lo tanto la formación de una cicatriz, lo que ocurre en el SNC es que la capacidad de regeneración axonal y la reposición de neuronas dañadas es limitada, por lo que el proceso inflamatorio no termina de forma rápida y las citoquinas proinflamatorias continúan actuando y el daño extendiéndose. Se sabe que a medida que las células inflamatorias periféricas llegan a la médula espinal las citoquinas proinflamatorias comienzan a disminuir, pero vuelven a tener un segundo pico entre las 2 y 4 semanas y es cuando se las asocia con desencadenar la muerte neuronal y de oligodendrocitos dañados, como también a la desmielinización de axones intactos (David, et al. 2012). El daño axonal es la evidencia histopatológica más frecuente de LME caninas naturales y se lo relaciona directamente a déficits motores observados en la clínica. Los axones dañados se dilatan y desencadenan la desmielinización secundaria de axones sanos adyacentes ocasionando deficiencias en los mecanismos de transporte. Por lo tanto, el daño axonal es un fenómeno progresivo que no se limita al epicentro de la lesión, sino que se disemina hacia craneal y caudal de la misma (Spitzbarth, et al. 2020).

Es debatido si la inflamación es un fenómeno beneficioso o perjudicial durante el TMA. Su principal objetivo es evitar el desarrollo de infecciones, eliminar desechos celulares y limpiar el entorno para una posible regeneración axonal. En etapas tempranas repara la permeabilidad vascular impidiendo su propia propagación y por lo tanto de la lesión. El inconveniente es que permanece activa por largos períodos de tiempo, tendiendo a cronificar la enfermedad, limitando la regeneración axonal, causando pérdida neuronal, daño axonal, muerte de oligodendrocitos y desmielinización (Allen y Barres, 2009; Pellegrino, 2014). La respuesta inflamatoria culmina con la formación de una cicatriz glial la cual puede actuar como barrera para el pasaje de los axones, bloqueando la comunicación neuronal (Chen, et al. 2015).

David y Kroner (2011) plantean que en las lesiones medulares actúan dos tipos de macrófagos/microglía (se los denomina así ya que no se puede determinar de donde derivan). Los macrófagos/microglía M1, son los que se encuentran en mayor proporción en lesiones de médula espinal, inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias como interleuquina- 12 (IL-12), interleuquina 1-beta (IL-1 beta) y factor de necrosis tumoral- alfa (TNF-alfa) contribuyendo al desarrollo del daño secundario y retardando la regeneración axonal. Mientras que los M2 pueden actuar como neuroprotectores, con capacidad antiinflamatoria al inhibir citoquinas proinflamatorias, además promueven la angiogénesis favoreciendo las lesiones isquémicas. Es por esto que la modulación de citoquinas en el microambiente de la lesión medular podría regular la cantidad de uno u otro tipo de macrófagos/microglía, siendo un importante objetivo terapéutico a considerar. A su vez, Rust y Kaiser (2017) consideran que la cicatriz glial puede impedir la regeneración axonal, pero si el microambiente de la ME es el adecuado y existen moléculas guías, las neuronas

centrales en el sitio de lesión pueden regenerar sus axones. Por lo tanto, supone que podrían combinarse distintas estrategias para lograr la reparación (Bartlett, 2008).

3.4 Signos clínicos

Como ya se mencionó anteriormente, la ME conduce información sensitiva y motora desde y hacia estructuras intracraneanas, es capaz de integrar y controlar los impulsos nerviosos, además, tiene la capacidad de generar señales rítmicas y coordinadas en neuronas que inervan órganos efectores como músculos permitiendo la generación de movimiento. Por lo tanto, la interrupción de algunas de estas funciones, genera signos clínicos característicos, los cuales varían de acuerdo al segmento medular afectado. Datos del examen clínico pueden ayudar a localizar la lesión de acuerdo al número de miembros afectados y la respuesta del animal a la evaluación sensitiva, motora y de reflejos espinales (Pellegrino, 2014). En la figura 5 se muestra un resumen de los signos clínicos que se pueden encontrar de acuerdo al segmento medular afectado.

Los signos neurológicos asociados a la marcha en una injuria medular son la paresia, plejia o la ataxia propioceptiva consecuencia de la lesión. La paresia, es la alteración de los movimientos voluntarios, puede ser ambulatoria cuando el animal logra mantenerse en estación y caminar o no ambulatoria cuando no es capaz de desplazarse por sí solo pero aún es capaz de realizar algunos movimientos voluntarios. Por otra parte, la parálisis se caracteriza por una pérdida absoluta de la motilidad voluntaria. La ataxia se refiere a una incoordinación en la marcha debida a la afectación de vías sensitivas. Las alteraciones propioceptivas son características de lesiones medulares; la propiocepción se define como la capacidad del animal de reconocer la posición de sus miembros en el espacio, la misma puede estar normal, disminuida o ausente, según gravedad y profundidad de afectación medular. La presencia de dolor permite sospechar patologías compresivas y/o inflamatorias, como, por ejemplo, las enfermedades del disco intervertebral. Debemos evaluar si el animal presenta áreas de hiperestesia focal a nivel espinal asociadas frecuentemente con el o los sitios de lesión. Al comprimir la piel de la porción distal de los miembros evaluamos la sensibilidad superficial, en caso de estar ausente, se comprimen las falanges medial y lateral de los miembros para evaluar la sensibilidad profunda. La pérdida de la percepción de dolor es de suma importancia en el pronóstico de las lesiones medulares. En las afecciones toracolumbares la evaluación del reflejo cutáneo del tronco suele ayudar a localizar la lesión, normalmente comienza a aparecer en los segmentos vertebrales presentes a la altura de las alas del ilion y su evaluación se realiza desde caudal a craneal. Cuando dicho reflejo no está presente, se debe continuar desplazando hasta que reaparezca, generalmente ubica la lesión de dos a tres vértebras o segmentos medulares por encima de donde aparece (Pellegrino, 2014).

El nivel de la lesión determina las manifestaciones neurológicas, cuando se afecta la región torácica o toracolumbar puede causar paraplejia. En casos graves de afección

toracolumbar o lumbosacra puede aparecer retención o incontinencia urinaria. Cuando la lesión ocurre en región cervical, cursa con cuadriplejia. Además, aquellas por encima de C4 pueden presentar compromiso respiratorio por parálisis del diafragma. (Robbins, et al. 2010).

Se evalúan los reflejos espinales para determinar si la lesión afecta principalmente a las NMS o NMI. Los signos de NMS ocurren cuando existe una lesión en las neuronas motoras ubicadas en la corteza motora del encéfalo o en sus proyecciones que descienden por la médula espinal. Los signos de NMI, por otro lado, ocurren cuando existe una lesión en las neuronas motoras ubicadas en el asta ventral de la médula espinal, en sus proyecciones o en la unión neuromuscular. El daño tanto de NMS como de NMI afectará la capacidad del animal de producir movimientos voluntarios, sin embargo, la respuesta de los reflejos espinales y el tono y masa muscular puede ayudar a localizar cuál de estas está afectada. Las NMS normalmente tienen un efecto inhibitorio sobre las NMI (figura 5). Por lo tanto, una lesión que afecte las NMS impedirá ese efecto inhibitorio lo que puede llevar a una respuesta exagerada a los reflejos espinales (hiperreflexia), puede existir aumento del tono muscular en los miembros inervados por las NMI que han perdido la inhibición de la NMS y no se observará atrofia muscular en las etapas tempranas. Con el paso del tiempo, en animales con déficit motor, puede ocurrir una atrofia muscular debida al desuso. Si se lesionan las NMI sin importar cual es la causa patológica, se impide la transmisión del potencial de acción desde la ME hacia la unión neuromuscular inhibiendo la contracción muscular. Esto lleva a que ocurra atrofia muscular por denervación distal a la lesión de NMI la cual es de rápida instauración debido a una disminución en la síntesis de proteínas musculares y un aumento de la proteólisis. Los reflejos espinales se encuentran disminuidos o ausentes ya que son las NMI quienes participan en el arco reflejo (Cunningham y Klein, 2009). Los signos clínicos según lesión de NMS o NMI se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Signos clínicos asociados a lesión de neuronas motoras.

Signos clínicos	Lesión de NMS	Lesión de NMI
PARESIA/ PARÁLISIS	Espástica	Flácida
REFLEJOS ESPINALES	Aumentados/ normales	Disminuidos/ ausentes
ATROFIA MUSCULAR	Lenta (por desuso)	Rápida (neurogénica)
TONO MUSCULAR	Aumentados/ normales	Disminuidos/ ausentes

NMS: neurona motora superior. NMI: neurona motora inferior.

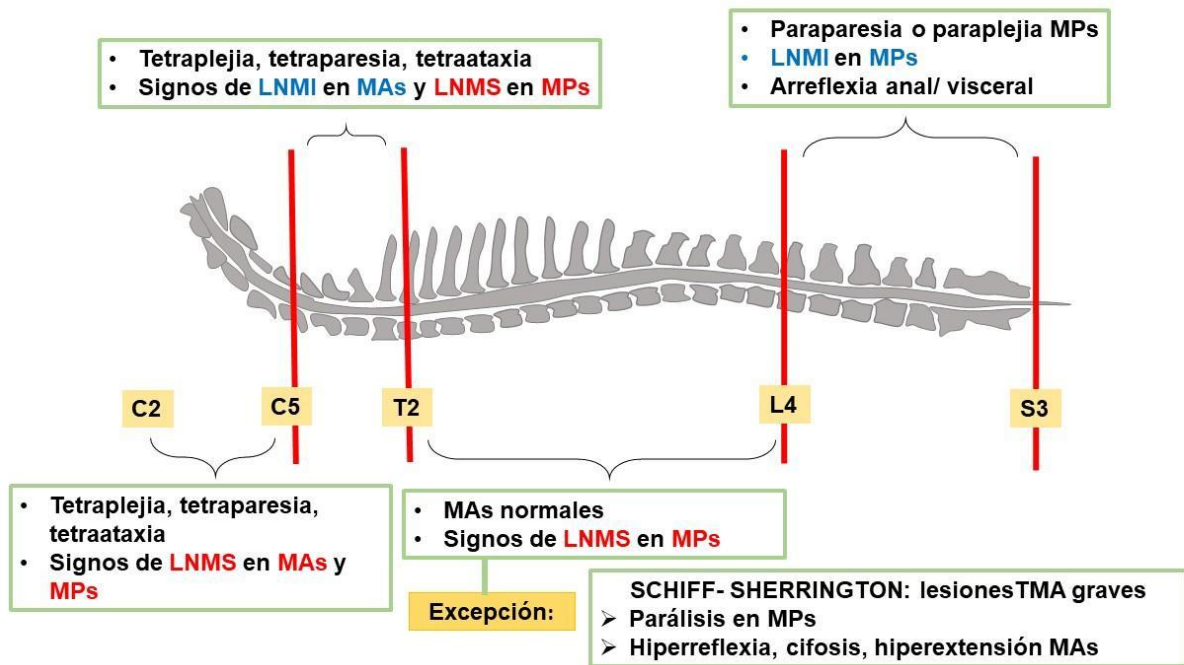


Figura 5. Signos clínicos observados según segmentos medulares comprometidos. Cuando las lesiones ocurren donde se ubican las NMS se observan lesiones de NMS, las NMI continúan ejerciendo sus acciones sobre músculos y reflejos medulares de forma normal, aunque éstos últimos pueden estar aumentados debido a que las NMS normalmente tienen efecto inhibitor sobre los mismos. Cuando se lesionan segmentos en los cuales están implicadas las NMI se observan signos de lesión de NMI, por lo que éstas no pueden ejercer sus acciones normales afectando músculos y reflejos espinales. LNMI: Lesión en Neurona Motora Inferior, LNMS: Lesión en Neurona Motora Superior, MAs: Miembros anteriores, MPs: Miembros posteriores. Basado en imágenes de Pellegrino, 2014.

3.5 Clasificación de las enfermedades medulares

3.5.1 Enfermedades traumáticas de médula espinal

a) Fracturas, luxaciones y luxofracturas de la columna vertebral

El trauma medular agudo causado por fracturas y luxofracturas vertebrales es la segunda causa de afección medular, luego de las hernias discales en caninos. Generalmente ocurren por traumatismos en accidentes automovilísticos o caídas de gran altura. Son consecuencia de una hiperextensión intensa, hiperflexión, compresión o rotación vertebral y se observan con mayor frecuencia en la unión de un segmento móvil y otro más rígido como en la región toracolumbar (Chipayo, Lozada, Olazabal y Díaz, 2019).

Una fractura es un proceso que genera una solución de continuidad dentro del hueso causado por una fuerza que supera la resistencia ósea (Morgan, 2010). Se clasifican según tipos que se basan en la gravedad de la lesión ósea, la comunicación con el exterior, la línea de fractura y la localización anatómica. En cuerpos vertebrales las fracturas son mayoritariamente por compresión, donde el hueso esponjoso se colapsa y comprime destruyendo el área de fractura (Hernández y Katrib, 2008).

En cuanto a la incidencia de este tipo de lesiones, en el período 2006-2011, se estudiaron 7918 radiografías en Servicio de Imagenología de Facultad de Veterinaria UdelaR de las cuales el 81,3% fueron de caninos. De las regiones del esqueleto axial estudiadas, la mayoría eran radiografías de la columna vertebral (28,9%). De las patologías óseas estudiadas, las de origen traumático representaron el 31% mayormente en animales menores al año de edad (Vilche, 2016).

b) Enfermedad de disco intervertebral

La enfermedad del disco intervertebral es una patología compleja y multifactorial común en perros, causada por la degeneración de los discos intervertebrales. Es la principal enfermedad que causa LME en caninos y en el 40 a 50% de los casos los afectados que sufren lesiones severas permanecen parapléjicos sin nocicepción y sin recuperar la capacidad de deambular (Spitzbarth, et al. 2020). La degeneración del disco intervertebral (DDIV) es un proceso de envejecimiento influenciado por la genética canina que resulta en la falla biomecánica del DIV (Fenn, et al. 2020). Se pierde la funcionalidad del NP, no puede soportar las cargas de compresión medular y si bien el AF busca suplir esta carencia, no es suficiente. Dado que el DIV es avascular y presenta poca celularidad, la respuesta fisiológica que busca reparar los daños no lo logra, determinando una falla estructural con la aparición de enfermedades y sintomatología clínica abrupta (Bergkunt, et al. 2013).

En los años 40s y 50s, Hansen y Olsson propusieron un sistema de clasificación discal basado en los cambios histopatológicos. Esto llevó a la clasificación de razas caninas de acuerdo al tipo de degeneración discal más prevalente en razas condrodistróficas (metaplasia condroide) y no condrodistróficas (metaplasia fibroide). Los tipos principales de degeneración discal son conocidos como Hansen tipo I y Hansen tipo II. El concepto de hernia de disco intervertebral (DIV) involucra cualquier desplazamiento localizado de alguna parte del DIV hacia el canal medular, el mismo puede ser tanto una extrusión (asociado a la extrusión aguda del NP- Hansen I) o una protrusión (por engrosamiento crónico del AF- Hansen II) (Fenn y Olby, 2020). Sin embargo, en la actualidad se desafía el paradigma de la clasificación de las hernias discales según razas condrodistróficas y no condrodistróficas, dado que en ambos tipos se ha observado metaplasia condroide, sin observarse fibrocitos en el núcleo pulposo en ninguno de los discos degenerados. (Spitzbarth, et al. 2020).

Hansen tipo I

También conocida como degeneración o metaplasia condroide, implica la sustitución de células de la notocorda que se ubican en el NP por condrocitos y la transformación del NP en fibrocartilago. Además, ocurre la calcificación del núcleo pulposo, la pérdida de GAGs, el aumento de colágeno tipo 1 y la disminución del agua por lo que se pierden las propiedades hidro elásticas del disco. Esto vuelve al disco propenso a la rotura completa del anillo fibroso debido a un debilitamiento en su parte dorsal (generalmente, ya que es de menor grosor). Tras un movimiento normal de la columna vertebral puede ocurrir una extrusión aguda del NP calcificado con compresión de la médula espinal ocasionando un TMA (Fenn, et al. 2020). El proceso degenerativo ocurre en primera instancia en el NP y luego se extiende al AF. Se da principalmente en razas condrodistróficas, con mayor predisposición: dachshund, basset hound, bulldog francés, bulldog inglés, pequines, beagle, schnauzer miniatura entre otros (Bergkunt, et al. 2013; Casallas Calderón, et al. 2018; Smolders, et al. 2013). Puede producirse en todos los discos intervertebrales, pero en el 75% de los casos se encuentran a nivel de T10 y T13, mientras que entre un 14 y 35% ocurren a nivel cervical (Spitzbarth, et al. 2020). Se ha demostrado que su principal etiología es genética, distintos factores genéticos se han encontrado en distintas razas que determinan la degeneración temprana. Comienza a los 3-4 meses y se completa al año de edad. Otro factor a considerar es la biomecánica de la columna, la cual se ve alterada al ser perros que presentan una columna vertebral extensa y patas muy cortas. Las calcificaciones de los discos afectados observados radiográficamente predisponen a un mayor riesgo de hernias discales, aunque también se observan extrusiones sin calcificaciones. Las hernias suelen aparecer a los 2-3 años de carácter repentino y explosivo, con ruptura del ligamento longitudinal dorsal y extracción del NP hacia el canal medular (Smolders, et al. 2013).

Hansen tipo II

Se conoce también como degeneración o metaplasia fibroide, es un proceso de envejecimiento que ocurre generalmente en perros de edad avanzada, entre los 6 y 7

años de edad, con mayor frecuencia en la región cervical caudal y lumbosacra. Descrito principalmente en razas no condrodistróficas como boxer, gran danés, border collie, doberman pincher, labrador, maltés, rottweiler y el san bernardo entre otros. Estos animales de patas largas presentan una mayor altura lo que permite mayor movilidad de la columna con mayor soporte de carga y fuerzas en región cervical y lumbosacra. En este caso, de acuerdo con la descripción de Hansen, el disco sufre un aumento del contenido de colágeno y las células notocordales se vuelven similares a fibrocitos. Al mismo tiempo ocurre una degeneración del anillo fibroso potenciada por el trauma repetido. Las fibras del AF se rompen parcialmente y se genera una protrusión dorsal del disco intervertebral, sin extrusión de componentes del DIV, por lo que tanto el anillo fibroso como el núcleo pulposo (que se encuentra contenido) pueden protruir y comprimir la médula espinal. (Sánchez- Masian, Beltrán y Luján-Feliu-Pascual, 2012; Smolders, et al. 2013). Si bien esta clasificación ha sido ampliamente utilizada, en los últimos años se ha demostrado que ambos, condrodistróficos y no condrodistróficos sufren metaplasia condroide y los investigadores han planteado que las descripciones de Hansen se refieren principalmente al grado de fibrosis del disco y no del NP específicamente (Fenn y Olby, 2020).

Extrusión aguda no compresiva del núcleo pulposo

Conocida como Hansen tipo III (aunque no fue descrita por Hansen), como extrusión de alta velocidad y bajo volumen y como ANNPE por sus siglas en inglés “acute non-compressive nucleus pulposus extrusión”. Se refiere a una extrusión hiperaguda de núcleo pulposo no degenerado que lleva a una contusión de la médula espinal con mínima compresión. Generalmente ocurre durante el ejercicio, lo que sugiere que una sobrecarga en discos sanos puede ser la causa de esta patología. En la mayoría de los casos los signos son lateralizados y si bien el momento de la extrusión puede ser doloroso, los animales no manifiestan dolor espinal posterior (De Risio, Adams, Dennis y McConnell, 2009; Mari, et al. 2017;).

Por último, se han descrito otros tipos de enfermedades del DIV, una de las más estudiadas en los últimos años es la extrusión del núcleo pulposo hidratado. En esta herniación del DIV no ocurre una degeneración previa de los DIVs. Es también conocida como quiste discal canino. Este tipo de herniación discal se caracteriza por afectar discos intervertebrales sanos no degradados en los que ocurre una protrusión del núcleo pulposo hacia la médula espinal con niveles variables de compresión a través de una comunicación con el anillo fibroso (Fenn y Olby. 2020). La mayor parte de los casos ocurren en la médula cervical y se caracterizan por la falta de dolor espinal (Hamilton, Glass, Drobotz y Agnello, 2014).

3.6 Métodos diagnósticos

Uno de los principales objetivos en el diagnóstico de una lesión medular es la localización de la misma. Para esto, es de gran importancia realizar un examen

neurológico completo y sistemático. En primer lugar, se deberá determinar cuáles son los miembros que presentan alteraciones motoras y/o propioceptivas. Una vez determinado esto, como fue explicado en detalle previamente, mediante la evaluación del tono muscular y de los reflejos espinales, se podrá determinar si existen lesiones en las NMS o NMI que inervan dichos miembros. Además, es de gran importancia en la neurolocalización determinar las regiones donde el paciente presenta dolor a la palpación de la columna y evaluar si es capaz de controlar esfínteres y, en caso de ser incontinentes, cuáles son las características de esa incontinencia (Cunningham y Klein, 2009). En el caso de pacientes con hernias discales tratados mediante cirugía un 58% logra caminar en menos de dos meses, pero el 33% desarrolla incontinencia urinaria y/o fecal (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016b). Por último, la evaluación de la presencia de sensibilidad dolorosa, tanto superficial como profunda es fundamental ya que es el factor pronóstico de mayor importancia en lesiones medulares (Cunningham y Klein, 2009).

Una vez localizada la lesión en una región específica de la médula, debemos determinar la naturaleza y severidad de la misma. Para ello, es necesario recurrir al uso de estudios colaterales, principalmente técnicas de imagen. En este sentido, la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC) son las herramientas más adecuadas para el diagnóstico de lesiones en la ME (Velayos y Diéguez, 2015). La RM es la herramienta con mayor sensibilidad en este sentido dado que permite definir con mayor resolución el parénquima medular, tejidos blandos, edema e inflamación y proporciona información sobre la integridad de la ME. A su vez, es menos propensa a los artefactos y no utiliza radiación ionizante. Su principal desventaja es su alto costo, el requerimiento de anestesia general por períodos prolongados y la necesidad de contar con personal capacitado para su interpretación. La TC es una técnica no invasiva, más rápida y de menor costo que la RM, es una técnica excelente para el diagnóstico de lesiones óseas en la columna vertebral, pero proporciona poca información sobre la integridad general de la ME y además es capaz de emitir elevada radiación ionizante. En ambas técnicas, muchas veces también es necesario utilizar medios de contraste para una mejor interpretación de resultados (Carrasco, Blanco, Marcin y Fernández Álvarez, 2014; Nykamp, 2017).

En caso de no contar con acceso a técnicas de imagen avanzada son útiles la radiografía simple (RX) y la mielografía. La radiografía es una herramienta importante para el diagnóstico de patologías traumáticas permitiendo la evaluación del tejido óseo y el compromiso del tejido blando adyacente por el contraste natural que ofrecen. Las fracturas se evidencian radiográficamente como una mala alineación de la columna, menor longitud vertebral y alteraciones sobre el borde cortical de los huesos implicados, en caso de hernias discales el estrechamiento del espacio intervertebral entre otros signos radiológicos puede ser sugestivo de la presencia de degeneración discal o herniación (López, et al. 2016). Sin embargo, una hernia de disco no puede ser confirmada únicamente mediante la Rx simple dado que no permite visualizar la médula espinal. Para eso, se puede inyectar líquido de contraste en el espacio

subaracnoideo (mielografía). La inyección de este medio de contraste se realiza mediante punción en la cisterna magna o en región lumbar entre vértebras L5-L6 o L6-L7, con la aguja perpendicular al canal vertebral, craneal a las apófisis espinosas, el procedimiento se realiza bajo anestesia general. Tiene como desventaja ser una técnica invasiva, en la que puede ocurrir un trauma medular iatrogénico y consecuente hemorragia/hematoma que pueden exacerbar los signos clínicos. Otro efecto adverso común de la inyección de líquido de contraste es el desarrollo de convulsiones (Lorenz, Coates y Kent, 2010). Sin embargo, la mielografía tiene como principal ventaja que no requiere de equipos costosos y que abarca extensas zonas de la ME (Nykamp, 2017). Proporciona información sobre la integridad de la ME al evidenciar con claridad sus bordes, permitiendo determinar desviaciones o interrupciones del líquido de contraste en casos de compresiones medulares (López, et al. 2016).

3.7 Tratamientos tradicionales de patologías medulares

La terapia tiene como objetivos reparar daños primarios y limitar los daños secundarios. Ante la sospecha de un TMA la primera medida a ser tomada es la inmovilización del paciente. Inmediatamente deben ser evaluados los sistemas principales siguiendo la regla nemotécnica ABC. En primer lugar, verificar que las vías aéreas sean permeables (A) y que el animal esté respirando adecuadamente (B), para luego evaluar el funcionamiento del aparato cardiovascular (C), determinando color de mucosas, frecuencia cardíaca y presión arterial (Patchinger, 2013). Una vez realizado esto y con un paciente estable, se procede al examen físico y neurológico, así como a posteriores métodos de diagnóstico por imagen (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016; Jeffery, et al. 2016a).

Actualmente las opciones disponibles son el tratamiento médico, también llamado conservador y el tratamiento quirúrgico (Moore, Tipold, Olby, Stein y Granger, 2020). De acuerdo a algunos estudios el porcentaje de animales que recuperan la funcionalidad luego de una lesión compresiva de la médula espinal mediante tratamiento médico es del 50%, mientras que con cirugía el porcentaje asciende al 90% (Jeffery, Levine, Olby y Stein, 2013). Sin embargo, la pérdida de dolor profundo debe considerarse un factor de mal pronóstico sin importar el tratamiento, en aquellos tratados quirúrgicamente la tasa de recuperación es del 61% en comparación al 10% que reciben tratamiento convencional. Debemos considerar que dichos valores pueden verse influenciados por la gran cantidad de estudios publicados de perros tratados quirúrgicamente en comparación con los tratados médicamente y probablemente esto se deba a que en los centros de especialización neurológica se suele recomendar la descompresión quirúrgica en pacientes con lesiones graves antes que optar por una terapia conservadora. En las lesiones más leves que cursan con hiperestesia paravertebral o paraparesia ambulatoria muchos médicos optan por el tratamiento conservador, posiblemente se deba a que estos perros concurren a centros de atención primaria y no centros especializados, ya que los neurólogos cirujanos recomiendan realizar la descompresión quirúrgica en el primer episodio de

enfermedad del DIV de forma rutinaria. Esta medida está orientada a la prevención de futuras lesiones medulares de mayor gravedad con menores tasas de recuperación (Moore, et al. 2020). Más allá del tratamiento elegido debe informarse a los propietarios que entre un 5-20% de los pacientes con TMA pueden desarrollar necrosis medular progresiva (mielomalacia) hasta 7 días después del trauma, debiendo considerarse la eutanasia para evitar la muerte por parálisis respiratoria (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016b).

3.7.1. Tratamiento conservador

El tratamiento conservador suele utilizarse en casos de hernias discales no compresivas y fracturas/luxaciones estables o en casos en los que la resolución quirúrgica no es posible debido a una descompensación metabólica o costos que propietarios no puedan solventarlos (Santoscoy, 2008). En algunas lesiones compresivas, puede utilizarse este tipo de tratamiento, ya que se ha demostrado que la médula espinal es capaz de funcionar de forma satisfactoria con algunos grados de compresión (Jeffery, et al. 2013). Se recomienda en animales que presentan mínimas anormalidades neurológicas, ambulatorias y que no han presentado traumas medulares agudos con lesiones parenquimatosas, los mismos deberán mantenerse en reposo e inmovilización estricta al menos durante 3 a 4 semanas, además, deben recibir analgésicos y relajantes musculares (Santoscoy, 2008).

En medicina veterinaria está ampliamente distribuido el uso de corticoides en lesiones agudas de médula espinal, principalmente la metilprednisolona por su potencial efecto inhibidor de la peroxidación lipídica que tanto daña las membranas celulares. A su vez, son eficaces en reducir la inflamación y el edema vasogénico (Bach, et al. 2019; Khan, et al. 2019). Sin embargo, estudios que utilizaron metilprednisolona en perros de experimentación no encontraron diferencias con respecto al uso de placebo (Coates, et al. 1995). Además, recientemente se demostró que no existen diferencias en la recuperación de animales tratados de forma prequirúrgica con AINES o metilprednisolona y que los efectos adversos de esta última son de mayor importancia (McCartney, Obey y Benito, 2021). La prednisolona oral puede utilizarse, mantenerse durante períodos prolongados y reutilizarse en recaídas de la sintomatología nerviosa (Santoscoy, 2008). No se justifica el uso de dexametasona en el tratamiento del TMA ya que no existen evidencias que comprueben los beneficios que podría tener (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016b).

3.7.2 Tratamiento quirúrgico

El objetivo quirúrgico es obtener acceso a la lesión minimizando la manipulación de la ME y por lo tanto la posibilidad de lesiones o traumas iatrogénicos que puedan causar hemorragias y degeneración axonal, motivo por el cual, se deben extremar las medidas de inmovilización del paciente, evitando todo tipo de movimiento, principalmente la rotación durante la cirugía (Fingerroth, 2017).

La cirugía de columna vertebral se basa en la descompresión de la ME mediante la extracción del material que la esté comprimiendo y en caso de fracturas o luxaciones la inmovilización de las mismas para evitar daños posteriores (Santoscoy E, 2008). Las técnicas quirúrgicas empleadas para la descompresión son la laminectomía y la hemilaminectomía, ambas tienen como finalidad exponer el canal medular para extraer el material extruido o protruido (Fingeroth, 2017). Actualmente el 95% de los neurólogos y cirujanos veterinarios eligen la hemilaminectomía, principalmente por presentar menor probabilidad de deterioro neurológico postoperatorio y mejor eficiencia en la recuperación del disco dañado (Moore, et al. 2020). Además, puede realizarse conjuntamente la fenestración de los discos, medida profiláctica que se recomienda ya que disminuye la probabilidad de recurrencias de extrusiones o protrusiones de discos degenerados, especialmente en discos calcificados. Si bien es cierto que la fenestración puede presentar complicaciones, ocurren únicamente en un 0,01% de los casos, considerándose un procedimiento seguro y su no realización no se justifica (Moore, et al. 2020). La ausencia de dolor profundo reduce la efectividad de la cirugía, independientemente de que tan rápido se decida realizar la intervención, aún realizada dentro de las 24 hs posteriores al daño es probable que exista un gran porcentaje de perros que debido a la gravedad de la lesión no mejoren (Jeffery, et al. 2016). No hay evidencias científicas que apoyen la creencia de que el momento de la descompresión medular interfiere en los resultados. Lo que sí se sabe, es que existe mayor riesgo de mielomalacia en perros con lesiones graves en los que se tarda más de 24 hs (Moore, et al. 2012).

Las complicaciones quirúrgicas pueden ocurrir por hemorragias ocasionadas por lesiones en plexos venosos o masas musculares; insuficiencia ventilatoria por disminución neurológica, determinando parálisis de músculos intercostales o insuficiencia respiratoria; arritmias por estimulación vagal y contracciones ventriculares prematuras como hipotensión secundaria y deterioro neurológico posterior a la cirugía por manipulación excesiva de la ME. El cuidado posquirúrgico requiere reposo estricto con caminatas limitadas y aumento gradual de la actividad hasta las 8 semanas postquirúrgicas, al inicio podría utilizarse la aplicación de hielo cada 4-6 hs por 24-48 hs para disminuir la inflamación y evitar la formación de seromas, controlar el dolor agudo y crónico, como un correcto protocolo de fisioterapia para la rehabilitación (Da Costa, 2017).

3.7.3 Rehabilitación

La fisioterapia es una alternativa terapéutica, paliativa que busca recuperar la actividad física normal de forma progresiva. Es una terapia complementaria, alternativa eficaz que logra movilidad y apoyo de miembros de forma gradual, observándose los primeros avances dos semanas posteriores al inicio de la misma en animales con TMA, siendo mejores los resultados en casos de fracturas vertebrales (López, et al. 2016). Está indicada únicamente en pacientes con lesiones de columna

estables y contraindicada en casos de fracturas y luxaciones inestables (Feliu-Pascual y Jiménez, 2016b).

Su uso en afecciones neurológicas tiene una efectividad del 80% y para lograr efectos significativos se deben realizar mínimo 12 sesiones, dos veces por semana; por lo tanto, los resultados dependen del compromiso del propietario en concurrir a las mismas como de hacerse cargo económicamente (Pilco, Hinostroza y Serrano-Martínez, 2017). Se emplean diferentes técnicas, considerándose básicas en cualquier tratamiento de rehabilitación: la termoterapia mediante aplicación de frío en enfermedades agudas con efecto antiinflamatorio y analgésico o calor, quien disminuye los espasmos musculares y dolores crónicos, también produce vasodilatación favoreciendo el aporte de oxígeno a los tejidos; la masoterapia, son masajes terapéuticos que reducen la tensión muscular y estimulan al sistema inmunitario al disminuir receptores de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La Ultrasonografía mejora el metabolismo local y favorece la cicatrización y la electroestimulación nerviosa transcutánea (TENS) estimula fibras nerviosas periféricas y libera endorfinas del asta ventral de la ME, generando analgesia (Arroyo, 2008; Pilco, et al. 2017). En caninos con lesiones medulares una de las terapias más exitosas en la recuperación del movimiento consiste en la utilización de las cintas de correr en el agua ya que mejora la masa muscular y por lo tanto la fuerza (Moore, et al. 2020).

3.8. Terapia celular para patologías medulares

La bibliografía existente sobre el tratamiento celular en el trauma medular canino presenta resultados variables, alentadores, pero también contradictorios y/o reducido número de animales estudiados. Por lo que, surge la necesidad de realizar una revisión actualizada de los últimos antecedentes sobre el uso de células madre/progenitores en el trauma medular canino.

3.8.1 Características de las células madre/progenitoras y sus propiedades terapéuticas

Las células madre (CM) derivan de una única célula-ovo, son autorrenovables, indiferenciadas y capaces de originar células especializadas (Dominici, et al. 2006). Podríamos clasificar a las CM según su potencialidad y según tejido de origen, dentro de las CM pluripotentes tenemos a las células madre embrionarias (CME) y las células madre pluripotentes inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells* (iPSC). Estas, se caracterizan por ser capaces de diferenciarse en células de los tres linajes embrionarios: ectodermo, endodermo y mesodermo (Takahaski, et al. 2007). Las multipotentes son las células madre adultas (CMA) capaces de diferenciarse en células especializadas del mismo linaje embrionario como por ejemplo derivado del mesodermo como tejido óseo, cartilaginoso y/o adiposo (Talavera, et al. 2017).

En primer lugar, tenemos a las CME, derivadas de embriones obtenidos por fecundación, de la masa celular interna del blastocisto. Su pluripotencia y auto renovación constante *in vitro* es posible por la regulación epigenética de un amplio número de genes de pluripotencia, los sitios reguladores de los factores de transcripción celular se encuentran en estado de latencia esperando ser activados. Existen genes esenciales que deben ser expresados para poseer la pluripotencialidad como las combinaciones de genes Oct4, Sox2 y Nanog. Las líneas celulares cultivadas a largo plazo logran diferenciarse en las tres capas germinales, principal característica de importancia en cuanto a su posible utilidad terapéutica, ya que poseen la capacidad de diferenciarse a un amplio número de células, incluidas las células neurales. Las principales características que hacen cuestionable el uso de CME en terapias celulares radican en los conflictos éticos que generan al utilizar embriones para su desarrollo y su inestabilidad epigenética con riesgo a expresar genes promotores de tumores (Aquino y Tume, 2015).

Se han aislado CME de diversos animales, siendo los ratones de laboratorio y los monos los más utilizados. También se han obtenido de porcinos, bovinos, equinos, gatos y perros, estos últimos son los animales domésticos de mayor interés para el uso de CME en medicina regenerativa por las similitudes que guardan en cuanto a enfermedades hereditarias degenerativas similares a los humanos. La obtención de CME estables en diversas especies presenta grandes dificultades en su utilización terapéutica, por lo que los investigadores prefieren y buscan continuamente la obtención de células con características de pluripotencia que puedan ser utilizadas en la práctica médica *in vivo* (Goncalves, Ambrosio y Piedrahita, 2014).

En segundo lugar, tenemos a las iPSC, son células madre adultas convertidas en células pluripotentes mediante un proceso de inducción genética y reprogramación celular, guardan características indistinguibles desde el punto de vista morfológico y funcional con las células pluripotenciales embrionarias. Fueron desarrolladas con la finalidad de evitar los problemas éticos que conlleva el uso de embriones para la extracción de las CME, es decir como fuente de células pluripotenciales (Aquino y Tume, 2015). Mediante reprogramación celular a partir de fibroblastos de ratones como de humanos se logra inducir células con características de pluripotencialidad asociada a la expresión de cuatro genes: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Sin embargo, una desventaja importante de las iPSC es la capacidad tumorigénica comprobada por la aparición de tumores en ratones asociada a la expresión del gen c-Myc (Takahashi, et al. 2007).

En tercer lugar, tenemos a las CMA, son células multipotentes y/o unipotentes provenientes de diversos tejidos de organismos adultos, se encuentran principalmente en la médula ósea (MO). Las más estudiadas son las células madre hematopoyéticas (CMH) y las células madre mesenquimales/células estromales mesenquimales (CMM). Las CMM logran diferenciarse a células principalmente del mismo linaje del cual se originan, también está descrito el fenómeno de transdiferenciación en líneas

celulares del ectodermo y endodermo (Figura 6). Se ha demostrado que cultivos *in vitro* de largos períodos de tiempo bajo determinadas condiciones logran cambiar su expresión génica y podrían dar origen a células diferentes a su línea genética, es decir, de otro linaje embrionario, como ser células cardíacas, endoteliales y neuronales (Dulak, et al. 2015). Son de gran interés en terapia y medicina regenerativa ya que se extraen fácilmente de una amplia variedad de tejidos mesodérmico, son autorrenovables, por lo que se obtienen grandes cantidades de células y por sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladores y angiogénicas (Talavera, et al. 2006).

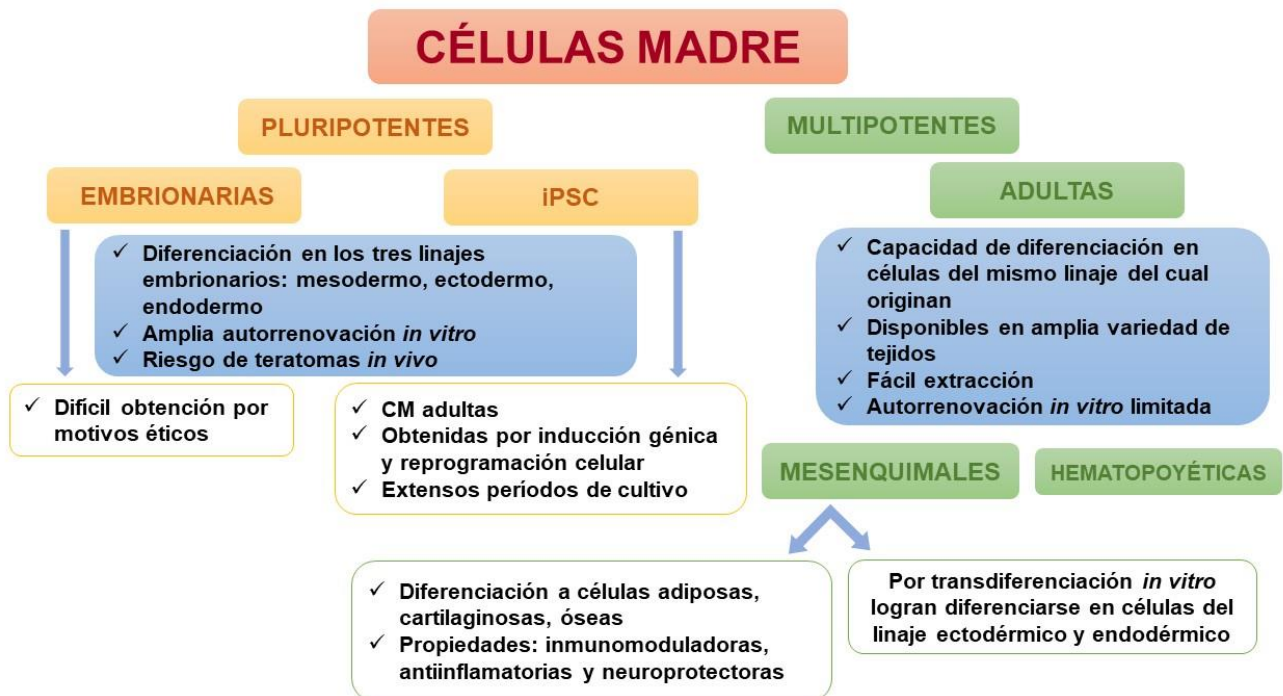


Figura 6. Clasificación de células madre según su potencialidad y origen. Se mencionan sus principales características, ventajas y desventajas, haciendo énfasis en aquellas de mayor potencialidad terapéutica para patologías del sistema nervioso. Se mencionan a las células hematopoyéticas ya que, si bien no son de importancia en esta revisión, su utilización en terapia celular está ampliamente distribuida. CM: células madre; iPSC: induced pluripotent stem cells. Adaptada y modificada de Yaneselli (2019).

3.8.2 Capacidad de neurodiferenciación de células madre adultas y células progenitoras.

Las células madre neurales (CMN) son de gran interés en terapia de reemplazo celular o terapia regenerativa de enfermedades nerviosas debido a su capacidad de diferenciación y autorrenovación. La neurogénesis adulta ocurre por CMN y células progenitoras ubicadas en nichos: poblaciones remanentes de la vida embrionaria en la zona subventricular del SNC y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

Se distinguen dos tipos de CMN: células madre neurales embrionarias (CMNE), pluripotentes y las células madre neurales adultas (CMNA), multipotentes por cual su capacidad de diferenciación es limitada. Entonces, fisiológicamente las CMN presentes en la zona subventricular originan progenitores neuronales que mediante sucesivas divisiones se convierten en neuroblastos que en bulbo olfatorio evolucionan a diferentes tipos de interneuronas; las que están en zona subgranular se diferencian a células progenitoras intermedias que proliferan hasta convertirse en neuroblastos que migran radialmente por el giro dentado del hipocampo a medida que se convierten en neuronas inmaduras. Son células que permanecen inactivadas, soportan el estrés metabólico, manteniendo su integridad hasta su activación. Durante varios meses sufren el proceso de maduración que les permite obtener propiedades similares a las neuronas maduras innatas del SNC y serán capaces de establecer nuevas conexiones neuronales y contribuir a la codificación de neuronas maduras (Grochowski, Radzikowska y Maciejewski, 2018).

Las iPSC ya mencionadas anteriormente, se utilizan para obtener células neurales a partir de CMA, su cultivo y caracterización es laborioso. Aparecen estudios que ganan popularidad al lograr la diferenciación neuronal a partir de la inducción de factores de transcripción. Diversos protocolos utilizan iPSC junto a la administración de factores de crecimiento para obtener progenitores neuronales o neuronas inmaduras con características muy diversas, ocasionando amplia variabilidad. Si bien se han logrado obtener monocultivos de células neuronales, al aplicarlas en el sistema nervioso dañado éstas deberán interactuar con oligodendrocitos, astrocitos, microglía, por lo tanto, la funcionalidad neuronal dependerá de las interacciones con la glía local (Engle, Blaha y Kleiman, 2018). Actualmente, es posible obtener iPSC a partir de células madre adultas neurales por expresión únicamente del gen Oct3/4, evitando la activación anómala del oncogen c-Myc implicado en el control del ciclo celular en el desarrollo de teratomas (Takahashi, et al. 2007; Kim, et al. 2009). Por primera vez, se logró generar células progenitoras neurales (CPN) y su diferenciación *in vitro* a subtipos neuronales y gliales a partir de iPSC provenientes de fibroblastos caninos. Del mismo modo, se comprobó su seguridad terapéutica ya que luego de administrarlas a caninos con LME crónicas, los pacientes no desarrollaron ningún tipo de neoplasia durante los 12 meses de seguimiento (Chow, et al. 2020).

Por otro lado, las CMM son células multipotentes que en determinadas condiciones de cultivo *in vitro* durante largo plazo logran modificar su expresión genética y adquieren características de pluripotencialidad, no son pluripotentes ya que no es un célula individual la que es capaz de diferenciarse en todos los linajes embrionarios, sino que poblaciones celulares multipotentes y otras unipotentes tienen la capacidad de lograr expresar marcadores que permiten la diferenciación en células de otros linajes distintos al suyo de origen, es decir, en células del ectodermo y endodermo, por lo que podrían diferenciarse en células renales, pancreáticas, endoteliales e incluso nerviosas, fenómeno que se conoce como transdiferenciación (Dulak, et al. 2015). La transdiferenciación es posible realizarla a partir de diferentes tejidos, las

CMM (CMM) son una fuente importante de células multipotentes adultas que, en cultivos *in vitro*, en presencia de determinados factores de expresión génica son capaces de transdiferenciarse en neuronas, oligodendrocitos y células de Schwann. Las principales características que hacen de la transdiferenciación un proceso de gran interés es que parte de células de organismos adultos, de fácil acceso y extracción. A su vez, el riesgo de teratogénesis y la probabilidad de rechazo es reducida en comparación a las terapias que utilizan CME o iPSC. La transdiferenciación de CMM-TA en células neurales puede ocurrir a partir de la estimulación *in vitro* con diversas sustancias que activan factores de transcripción y hacen posible la diferenciación. Es sabido que varios estudios demuestran que el proceso de transdiferenciación de CMM a células neurales es posible, que éstas logran expresar marcadores específicos, así como una morfología típica (figura 7). Sin embargo, pocos de estos trabajos han podido la formación de neuronas funcionales, con canales iónicos y capaces de establecer circuitos neuronales (Wu, Shi, Huang, Wei, Feng, et al. 2018). Además, se deberá indagar más sobre cómo obtener poblaciones de CMM-TA altamente purificadas, actualmente constituyen poblaciones heterogéneas que difieren según donantes, zona de origen y esto hace que no existan marcadores únicos con posibilidad de utilizarse en todas las células para alcanzar la transdiferenciación, por lo tanto, los experimentos tienen reproducibilidad limitada (Luo, Hu, Yin y Xu, 2018).

Las acciones terapéuticas de las CMM se encuentran aún en investigación y su potencialidad terapéutica podría deberse a su capacidad de aumentar la expresión de factores neurotróficos como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) y el factor derivado de células estromales (SDF-1) en lesiones medulares. El factor TGF- β tiene efectos inmunoreguladores en áreas dañadas y protege a las neuronas, el VEFG regula el crecimiento y el desarrollo vascular con propiedades neurotróficas y neuroprotectoras al desempeñar efectos fenotípicos en el desarrollo y reparación del SNC, por último, el SDF-1 promueve la supervivencia neuronal frente a una lesión o una inflamación. Por lo tanto, contribuyen a la supervivencia celular e inducen la diferenciación de las células progenitoras neuronales endógenas, siendo claves en la proliferación y diferenciación del tejido neural (Besalti, et al. 2016; Jung, et al. 2009).

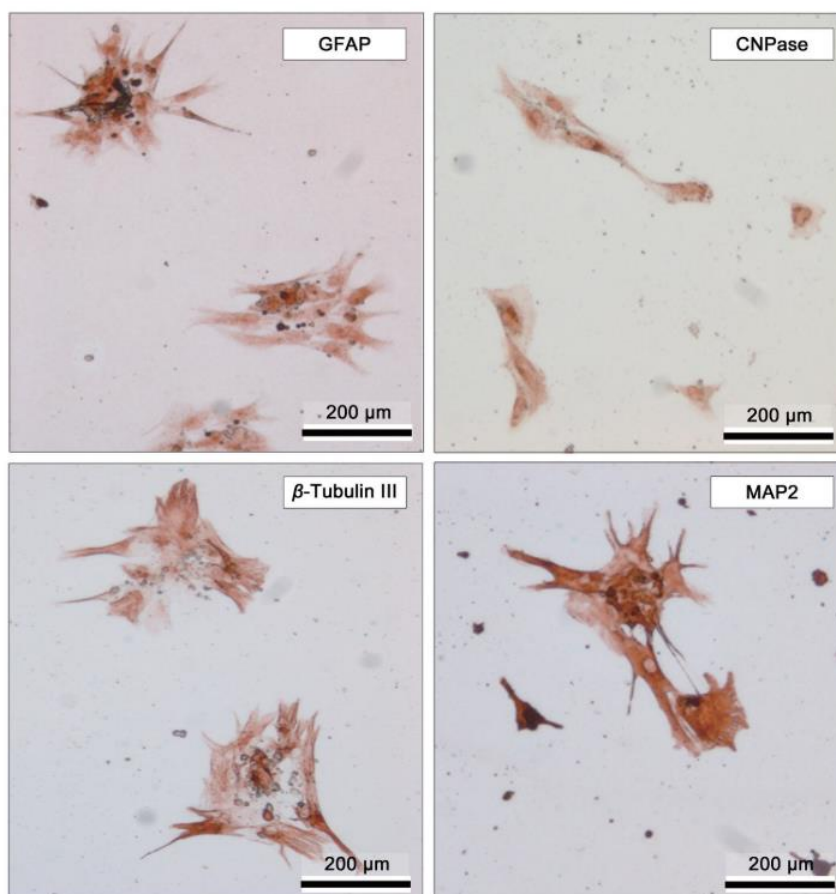


Figura 7. Evidencia de la capacidad neurogénica de las CMM-MO caninas. Empleando inmunohistoquímica se identifican marcadores específicos de células neurales: GFAP (proteína ácida fibrilar glial); CNPase (anti-2'3'-nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa), β -tubulin III, MAP2 (proteína-2 asociada a microtúbulos. Tomada de Besalti, et al. (2016).

3.8.3 Seguridad y eficacia de las terapias celulares en TMA

El canino es un importante modelo para el estudio de lesiones medulares y sus posibles terapias dada su similitud con la especie humana, ya que presentan lesiones similares de forma espontánea (como por ejemplo hernias discales) así como semejante fisiopatología del trauma y regeneración. Como fue expresado anteriormente, la fase proinflamatoria que ocurre en la etapa de lesión secundaria puede ser desfavorable para la regeneración y afectar negativamente la neurogénesis endógena, por lo cual, el trasplante celular puede ser beneficioso debido a su capacidad secretora de citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento inmunomoduladores. De esta manera, se podría mejorar la reparación medular y la formación de cicatriz glial (McMachill, Borjesson, Sieber-Blum, Nolta y Sturges, 2015). Si bien, es posible que el implante de células madre no provoque la regeneración tisular, se ha demostrado que la reparación completa de la lesión medular no siempre resulta necesaria ya que al restablecer un 10-15% de las conexiones medulares del

total del daño podría ser suficiente para obtener una mejora funcional (Besalti, et al. 2016).

Existen diversos estudios que utilizan perros para la investigación en el uso de células madre, mayormente de CMM. Las lesiones medulares caninas en algunos estudios son inducidas experimentalmente mientras que en otros, utilizan perros con lesiones naturales. Generalmente, los modelos experimentales inducen una lesión medular perfecta, el porcentaje de daño es previamente establecido y la terapia se aplica durante cortos períodos de tiempo, mientras que las lesiones espontáneas y naturales pueden involucrar múltiples segmentos medulares, una mayor cantidad de tejido adyacente y difícilmente la terapia celular se aplique inmediatamente posterior al daño (McMachill, et al. 2015).

Las CMM pueden ser administradas por diversas vías, teniendo diferencias en cuanto a practicidad, invasión y grado de especialización de operadores. Se destacan las vías intravenosa, intraparenquimatosa o intratecal. Las dos últimas tienen mayor ventaja ya que al inyectarse muy cerca del sitio lesionado la concentración obtenida es mayor (Figura 8) (Khan, et al. 2019).

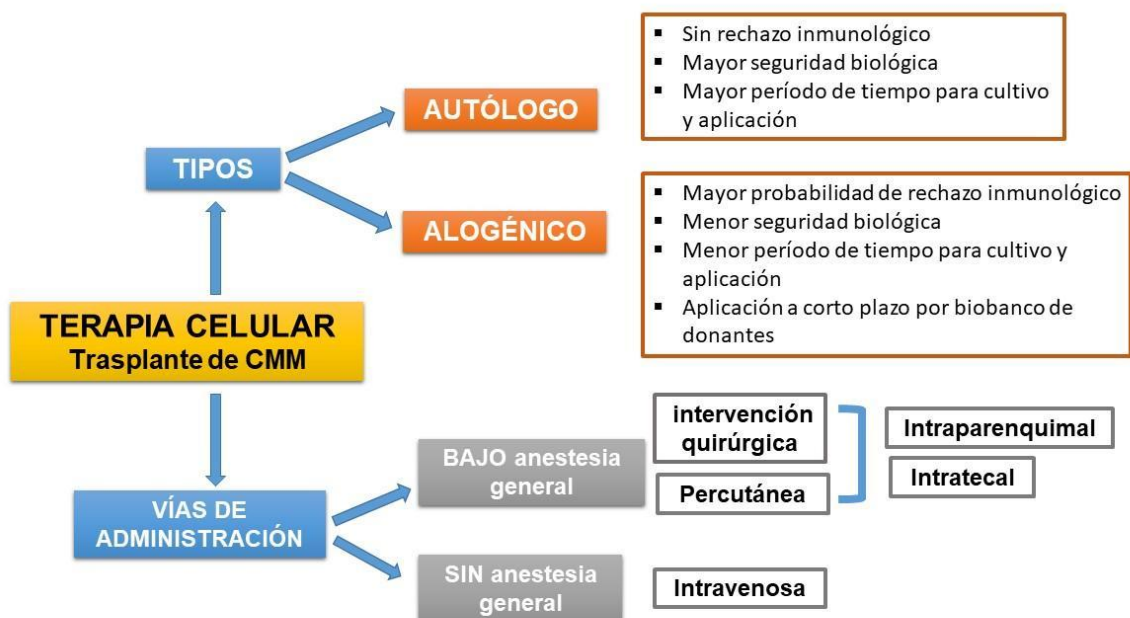


Figura 8. Tipos y vías de administración de CMM utilizadas en lesiones de médula espinal canina. Se mencionan principales diferencias entre las autólogas (derivadas del propio animal que las recibe) y alogénicas (animales donantes). A su vez, se nombran las principales vías de administración utilizadas en los trabajos estudiados para la realización de dicha revisión. Elaboración propia.

A continuación, serán mencionados ensayos clínicos que utilizan terapia celular en caninos con traumas medulares divididos según aplicación terapéutica en lesiones inducidas y lesiones naturales, además, se encuentran resumidas en la Tabla 2.

Modelos caninos con lesiones inducidas

Terapia celular

Con el objetivo de comparar los efectos terapéuticos de las CMM autólogas y alogénicas en caninos con lesiones de médula espinal (LME) inducidas, Jung et al. (2009) realizaron un estudio en el cual seleccionaron 30 caninos; los mismos se dividieron en tres grupos: 1) control, 2) trasplante autólogo y 3) trasplante alogénico. La LME se indujo experimentalmente mediante la inyección de catéter con balón de silicona en espacio intervertebral L2 y L3 en dirección craneal hacia T13 y L2, que permaneció durante 20 minutos, ocasionando una lesión por compresión; luego de la misma, todos los perros presentaron parálisis de MPs. A los 7 días de la LME los grupos 2 y 3 recibieron el trasplante de CMM derivadas de médula ósea (MO) en una única aplicación, vía intratecal entre L4 y L5. Los animales de los tres grupos fueron evaluados y puntuados funcionalmente previo a la cirugía y posterior a ésta, durante 5 semanas. Los grupos tratados, obtuvieron mayores puntuaciones en la función neurológica en comparación con los del grupo control. Asimismo, se logró constatar mediante RM, una reducción significativa del tamaño de la lesión en animales tratados en comparación al grupo control. La histopatología reveló daños a nivel de materia gris y blanca; hemorragia y necrosis parenquimatosa difusa, de mayor extensión y gravedad en el grupo control. A las 5 semanas del tratamiento, se evidenció una cavidad quística en todos los grupos, de menor tamaño en el grupo autólogo. Por inmunofluorescencia se determinó la capacidad migratoria de las CMM, evidenciándolas en el epicentro de la lesión; a las 4 semanas la mayoría de las CMM alogénicas habían desaparecido, a diferencia de las autólogas que permanecían allí. A su vez, encontraron aumentos en los niveles de expresión de factores como SDF-1, VEGF y TNF- β , siendo mayores en el grupo autólogo, mientras que en el grupo alogénico la expresión disminuyó drásticamente luego de las 4 semanas. De este trabajo se desprende que el uso de CMM en LME de caninos, tiene efectos terapéuticos benéficos, siendo mayores cuando se utilizan células autólogas. Además, sostiene que los mismos, están vinculados a la sobreexpresión de factores ya mencionados, implicados en la reparación y supervivencia del tejido nervioso.

En el trabajo de Lim, et al. (2017) evaluaron la eficacia de las CMM derivadas de la sangre del cordón umbilical (SCU) alogénicas y del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la recuperación de la función neurológica en caninos con LME inducida. Para llevarlo a cabo, 25 perros fueron sometidos a hemilaminectomía y se indujo la lesión de la ME por compresión en L1. Luego fueron asignados a cinco grupos según tratamiento y el trasplante se realizó una semana después de la LME; los grupos 1 y 2 fueron controles: 1) sin tratamiento (ST) y 2) solución fisiológica (SF); dentro de los grupos tratados se encontraban: 3) con G-CSF, 4) con CMM-SCU y el

5) tratado conjuntamente con CMM-UCB y G-CSF. El trasplante se realizó en el sitio de la lesión, de forma intraparenquimal. Los animales que recibieron G-CSF, lo hicieron vía subcutánea una vez al día por 7 días seguidos. Todos fueron evaluados por diferentes métodos durante 8 semanas. Según el sistema de puntuación funcional al momento de la lesión todos los caninos tenían una puntuación de 0, debido a que presentaban parálisis de extremidades posteriores. Los mismos fueron reevaluados a partir de las 2 semanas, obteniéndose puntuaciones más altas y significativas en los grupos tratados con CMM en comparación a los grupos control (ST y SF). Los caninos del grupo 3, no mostraron diferencias e incluso obtuvieron puntuaciones más bajas en comparación a los grupos 4 y 5. Mediante RM se determinó el área de lesión a las 8 semanas, la misma disminuyó en dos perros del grupo 3 y en dos del grupo 4 mientras que en un perro de este mismo grupo la lesión intramedular tenía aspecto casi normal. Los hallazgos histopatológicos evidenciaron infiltración generalizada de tejido fibroso, adherencias en la duramadre y formación de cavidades en todos los grupos, siendo mayor en grupos control. En el grupo 4 se encontraron estructuras similares a células neuronales en un área pequeña. Los resultados de este estudio mostraron mejoras funcionales y sensoriales en caninos tratados con CMM-SCU después de la lesión inducida de ME y que el uso de G-CSF no logró efectos beneficiosos. A su vez, no se observaron signos de regeneración de tejido medular según imágenes de RM e histopatología. Por lo tanto, el trasplante de CMM-SCU puede servir como opción en el tratamiento terapéutico para la recuperación de la funcionalidad medular luego de una lesión.

Kim, et al. (2015) se plantearon como objetivo determinar si la administración intravenosa (IV) de CMM-TA podía utilizarse como tratamiento temprano alternativo en LME aguda de caninos y reducir la dosis (y por ende los efectos adversos) de glucocorticoides esteroides como la metilprednisolona (MPSS) que suelen ser utilizados en lesiones medulares. Para llevarlo a cabo, sometieron 17 caninos a hemilaminectomía para inducirles la lesión de ME por compresión con balón de silicona en L1. Seis horas después, 16 caninos fueron divididos en 4 grupos, de 4 animales cada uno, para la aplicación del tratamiento correspondiente. El grupo 1) recibió únicamente CMM, el grupo 2) CMM y MPSS, al grupo 3) se le administró únicamente MPSS, mientras que, el grupo 4), no recibió tratamiento, siendo el grupo control. Recibieron una dosis de CMM vía intravenosa, una vez por día durante tres días y la MPSS se inyectó primero en bolo y luego por infusión continua en las siguientes 47 horas. El perro restante, fue utilizado para determinar la migración celular, la distribución de las CMM en diferentes tejidos luego de la administración intravenosa. Los resultados de la evaluación clínica mostraron mejoras significativas en los grupos tratados con CMM (grupo 1 y 2) en comparación al grupo control y no presentaron ningún tipo de complicaciones secundarias; aquellos animales que recibieron MPSS presentaron efectos adversos vinculados a su uso, como hemorragias gastrointestinales a los 4 días de comenzado el tratamiento. En cuanto a la distribución celular, las CMM migraron hacia sitios lesionados tanto de ME como pulmón y bazo, pero no se encontraron en tejidos sanos. A la histopatología (HP) el

grupo 1 mostró menor grado de hemorragia e infiltración microglial en el sitio de lesión en comparación a los demás grupos. Además, la infiltración inflamatoria fue menor en el grupo 1 y 2 en comparación al resto. La formación de metabolitos oxidantes fue menor en el grupo que utilizó CMM junto a MPSS, mientras que se encontró una disminución de biomoléculas proinflamatorias (COX-2, IL-6 y TNF-alfa) en los grupos que administraron CMM. Los grupos tratados aumentaron la expresión de marcadores neuronales en comparación con el grupo control, como también la expresión de GFAP, un marcador de astrocitos reactivos vinculados a la creación de un entorno neuroprotector para la neurogénesis endógena, y de oligodendrocitos maduros, pudiendo indicar regeneración de células neurales. Asimismo, se observó una disminución en la expresión de proteínas, implicadas en la proliferación celular y apoptosis, relacionándose a una astrogliosis disminuida. Las conclusiones de este trabajo fueron que los efectos terapéuticos de las CMM están dados por su acción neuroprotectora basada en la secreción de factores angiogénicos y neurotróficos y por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias mencionadas anteriormente; a su vez, las mismas tienen seguridad terapéutica ya que no se han mencionado efectos adversos. Por lo tanto, la inyección intravenosa de CMM – TA puede ser útil en el tratamiento alternativo en LME agudas.

Terapia celular combinada con matriz y/o modificación genética

Resulta de interés destacar que las CMM pueden ser modificadas con el fin de lograr mayores efectos terapéuticos, por ejemplo, Khan, et al. (2019) indujeron la expresión de la enzima hemoxigenasa-1 en CMM para evaluar su efecto en lesiones medulares. Esta enzima es normalmente expresada por neuronas de la médula espinal y posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Para este estudio se cultivaron CMM-TA alogénicas y por medio de un lentivirus se insertó el gen de la enzima hemooxigenasa-1 (HO-1), obteniéndose células madre mesenquimales derivadas de médula ósea con expresión de HO-1 (CMM-TA+HO-1). A su vez, se comparó el efecto de las mismas frente a CMM-TA no sometidas a la modificación genética. Doce perros fueron sometidos a una hemilaminectomía para la inducción de la LME por compresión, mediante la inserción de un catéter de silicona entre L3-L4 y su arrastre hasta L1. Inmediatamente después se inyectaron las CMM por infusión intravenosa y se armaron tres grupos de 4 perros cada uno según el tipo de cultivo que reciben: 1) CMM-TA frescas, 2) CMM-TA+HO-1 frescas y 3) CMM-TA+HO-1 congeladas y descongeladas (C/D). El procedimiento se repitió durante tres días seguidos. Todos los perros fueron evaluados al día 1 constatándose paraplejía completa, con pérdida total de reflejos sensoriales y motores y su seguimiento se realizó durante 4 semanas después del trasplante. En cuanto a resultados se observó una recuperación funcional y motora gradual siendo más rápida y de mayor puntuación en los perros que recibieron CMM-TA con expresión de HO-1 sin importar si son frescas o C/D en comparación con el grupo que no la expresa. Ningún perro logró recuperar la sensibilidad profunda. Además, por histopatología lograron demostrar las propiedades angiogénicas ya que se observó menor fibrosis en el epicentro de la lesión y mayor

mielinización. Las mejoras funcionales fueron atribuidas a la expresión de factores neuroprotectores, menor expresión de citoquinas proinflamatorias y mayor expresión de citoquinas antiinflamatorias. Los autores concluyeron que la terapia celular basada en CMM-TA con expresión de HO-1 es beneficiosa en LME por sus propiedades terapéuticas, antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras.

Se han evaluado también el uso de matrices biológicas asociadas a las CMM con la finalidad de brindar una estructura de soporte para la formación de nuevo tejido. Si bien es posible que la utilización de una matriz por sí sola no tenga efectos neurotróficos y neuroprotectores, en ella se encuentran factores de crecimiento que promueven la diferenciación y proliferación de células progenitoras neurales, favoreciendo los beneficios de la terapia celular cuando se utilizan conjuntamente con CMM (Park, et al. 2012).

En el estudio de Park y su equipo (2012) investigaron qué mecanismos estaban involucrados en el uso de CMM inducidas neurológicamente (CMMN) combinadas con una matriz/andamio, y que efectos tenían éstos sobre la función de MPs paralizados luego de la LME inducida. Para esto se seleccionaron 12 perros que fueron sometidos a una LME por compresión con balón de silicona en L1, los mismos se clasificaron aleatoriamente en 4 grupos. A la semana, el grupo 1 recibió de forma intraparenquimal CMM-MO alogénicas inducidas neurológicamente junto a la matriz, al grupo 2 se les administró únicamente la matriz y al tercer grupo, suero fisiológico, siendo este el grupo control. Los animales fueron evaluados semanalmente y puntuados según funcionalidad neurológica durante 9 semanas. Las CMM a las 24 hs de la inducción lograron exhibir aspecto neuronal con aumento en la expresión de proteínas neuronales y gliales. Todos los perros presentaban parálisis completa de MPs y a las 6 semanas del trasplante se observó una mejora gradual en locomoción, siendo más significativas en el grupo 1, ya que tres perros de este grupo lograron soportar su peso corporal de forma ocasional. Los cambios atróficos y fibróticos estaban presentes en la zona de lesión, en el epicentro de la misma, se observó proliferación fibroblástica severa en todos los grupos, pero en el grupo 1 hubo reducción de ésta y al igual que en el grupo 2, la lesión se limitó a la zona de compresión. Por inmunofluorescencia se reveló mayor expresión de factores neurotróficos y neuroprotectores, proteínas asociadas con la regeneración neuronal y menor presencia de citoquinas proinflamatorias en el grupo 1 en comparación con los demás grupos. Dicho estudio concluyó que las mejoras en la recuperación funcional de caninos con LME inducidas, pueden deberse a la combinación de matriz y CMMN debido a que reducen la gravedad de la patogénesis de la lesión. Los efectos terapéuticos pudieron deberse al aumento de sustancias neurotróficas que reducen la inflamación y la astrogliosis, limitando la extensión de la lesión y mejorando la regeneración neurona.

Asimismo, en el trabajo de Wu, et al. (2018), los autores construyeron un tejido de red neuronal en andamio de gelatina con CMM alogénicas inducidas a células madre/progenitoras neurales con el objetivo de evaluar la eficacia en el tratamiento de

sección medular completa en caninos. Para el estudio se cultivaron CMM-MO alogénicas con transfección por adenovirus del gen TrkC y células de Schwann (CS) con sobreexpresión de neurotrofina- 3 (NT-3). Se mezclaron partes iguales de CMM con TrkC y CS con sobreexpresión de NT-3, luego se sembraron en matriz/andamio de gelatina 3D para cultivarse durante 14 días. La lesión de ME se indujo en 15 perros sanos por laminectomía dorsal exponiendo los segmentos medulares T9-T10, se realizó sección completa de 1 cm de ME junto a las raíces nerviosas, en el mismo momento, se injertó el tejido de red neuronal junto al andamio de gelatina o únicamente el andamio de gelatina. Los animales fueron clasificados en cuatro grupos: 1) 6 perros recibieron andamio junto a red neuronal derivada de CMM y sobrevivieron 6,5 meses, 2) 3 perros recibieron únicamente andamio de gelatina y sobrevivieron 6,5 meses, 3) 3 perros únicamente con sección completa de médula espinal y sobrevivieron 6,5 meses, 4) 3 perros recibieron el tejido de red neuronal en andamio de gelatina y sobrevivieron 2 meses. Como resultados se obtuvieron CMM y CS modificadas genéticamente, sembradas de forma conjunta en un andamio y después de 14 días de cultivo se observó expresión por inmunofluorescencia de células madre neurales, marcadores de neuronas inmaduras y en menor medida maduras, también lograron identificar conexiones entre células similares a sinapsis. La densidad de fibras nerviosas regeneradas fue mayor en los grupos 1 y 4 en comparación con el grupo que recibió solo el andamio (figura 9) A su vez, se evidenció la sección medular completa por RM, la misma disminuyó su tamaño y mostró regeneración de tejido nervioso en el sitio del injerto (figura 10), relacionándose con una mejora gradual en la locomoción según sistema de puntuación utilizado. Además, demostraron que células similares a neuronas derivadas de CMM sobrevivieron hasta los 6,5 meses después del injerto. Los autores concluyeron que este tipo de terapia se integra muy bien al circuito neural de caninos con LME y sirven para la recuperación gradual de la función motora de las extremidades pélvicas.

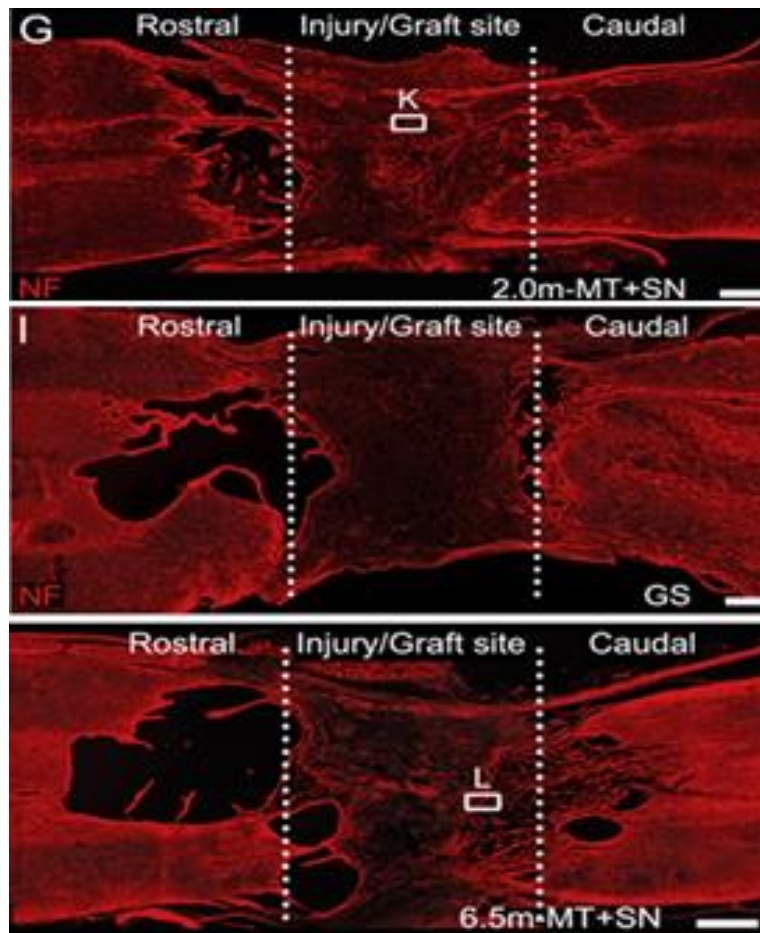


Figura 9. Patrón de distribución de fibras nerviosas regeneradas en sitio de lesión medular inducida. La tinción de inmunofluorescencia muestra que la densidad de las fibras nerviosas es mayor a los 2 (K) y 6,5 meses (L) en la zona de injuria/injerto en el paciente que recibió el tejido de red neuronal derivado de CMM en comparación con el grupo que recibió únicamente el andamio de gelatina. No se conservan diferencias en cuanto a densidad en área rostral y caudal entre los 2 y 6,5 meses de ocurrida la injuria/lesión. Imagen tomada y adaptada de Wu, et al. (2018).

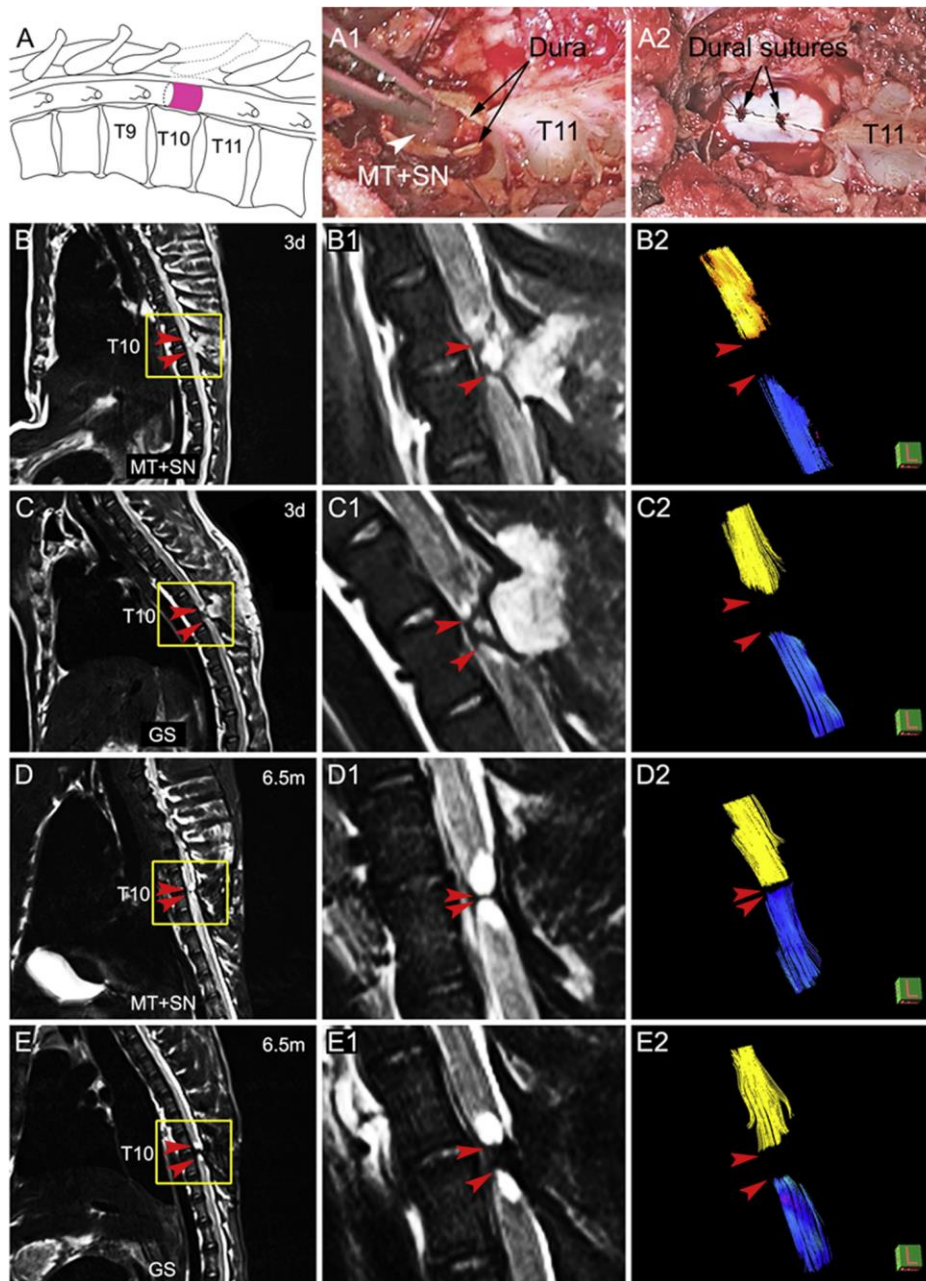


Figura 10. Efectos del trasplante de CMM en modelo de lesión medular inducida. Trasplante de tejido neuronal en andamio de gelatina derivado de CMM promueve la regeneración nerviosa después de una sección medular completa (A1-A2). Se extrajo 4 mm de ME en T10 para crear un modelo de lesión experimental (A). A los tres días la RM revela pérdida de integridad medular (imágenes B-B y C-C1) de tractos nerviosos en área de lesión por tensor de difusión (ITD) (B2 y C2), imágenes de B a B2 son de un canino del grupo uno y de C a C2 un canino del grupo dos. A los 6,5 meses se vuelven a evaluar por RM y ITD los mismos caninos observándose en el grupo uno menor espacio entre los extremos medulares seccionados (D-D1) y mayor regeneración nerviosa (D2) en comparación con el grupo dos, E-E1 y E2 respectivamente. Figura tomada y modificada de Wu, et al. 2018.

Consideraciones generales sobre las terapias de LME inducida

En cuanto a la eficacia terapéutica se puede decir que todos los estudios lograron mejoras significativas en el examen neurológico y de locomoción. Sin embargo, en ninguno de los trabajos se logró recuperar la sensibilidad al dolor profundo, asimismo, algunos de los caninos lograron mantener su peso corporal de forma ocasional (Park, et al. 2012 y Khan, et al. 2019). Como era de esperarse, aquellos perros con paraplejia que no recibieron tratamiento, no recuperaron la función motora (Lim, et al. 2007). El grado de fibrosis y desmielinización neural pudo evidenciarse mediante inmunohistoquímica e histopatología. Se identificó la migración celular de las CMM marcadas con GFP en el sitio de lesión, encontrándose principalmente en el epicentro de la misma, hacia craneal/ rostral, con mayor concentración en sustancia gris, mientras que, la sustancia blanca puede estar afectada (Lim, et al. 2007) como no (Khan, et al. 2019). Dicha evidencia se relacionó con el examen histopatológico en el cual se identificó la reducción de la fibrosis limitada al área lesionada y a la reducción de cavidades quísticas de la ME en grupos tratados con CMM; pero no se recuperó la remielinización del tejido dañado para alcanzar la reparación neuronal (Jung, et al. 2009; Khan, et al. 2019; Lim, et al. 2007). Resultados similares se observaron en caninos tratados con matrices junto a células neurales, lograron reducir la proliferación de células similares a fibroblastos en el epicentro de la lesión. Sin embargo, en aquellos tratados únicamente con matriz, no se evidenciaron reducciones en cuanto al grado de fibrosis, pero sí se limita el daño secundario a la zona de compresión. Se podría decir que la matriz se utiliza como reemplazo del tejido perdido, evitando la progresión del daño (Park, et al. 2012). En base a los trabajos mencionados anteriormente, se puede decir que la matriz por sí sola no estimula la regeneración axonal, la utilización combinada con CMM puede mejorar el microambiente de la ME lesionada y favorecer la síntesis de factores neurotróficos, antiinflamatorios que disminuyen la astrogliosis, favoreciendo la recuperación motora de caninos con LME.

Se plantearon diferentes hipótesis para los efectos beneficios en el uso CMM. Entre estas, el aumento de factores neuroprotectores en el sitio de lesión como el factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Khan, et al. 2019). La potencialidad neurotrófica se vinculó a mayor crecimiento y ramificaciones de axones, como a la prevención de la apoptosis, mitosis y diferenciación de poblaciones progenitoras endógenas, demostrado por la sobreexpresión de NGF y NT-3 en animales tratados con CMM, además se evidenció un aumento de biomoléculas que promovieron el crecimiento de neuritas (Park, et al. 2012). Asimismo, existió mayor expresión en CMM autólogas en comparación con las alogénicas, posiblemente debido a la destrucción por parte del propio sistema inmunitario dado que no se utilizó terapia inmunosupresora en estas últimas (Jung, et al. 2009). Del mismo modo, los beneficios pudieron deberse a una astrogliosis reducida, la misma fue observada en CMM inducidas a la expresión de HO-1, enzima encargada de inhibir la producción de radicales libres, deteniendo la

apoptosis neuronal (Khan, et al. 2019), mientras que, en otro trabajo, la astrogliosis reducida se asoció secundariamente al aumento de factores neurotróficos (Park, et al. 2012). También, los efectos terapéuticos pudieron estar dados por la disminución en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF-alfa, IL-beta y el aumento de la expresión de marcadores antiinflamatorios como IL-10 (Kim, et al 2015; Khan, et al. 2019; Park, et al. 2012). Por lo anteriormente mencionado, los efectos terapéuticos beneficiosos de las CMM posiblemente se deban a distintas propiedades ya sea, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, neurotróficas como neuroprotectoras, que pueden ocurrir en forma asociada. En la actualidad los mecanismos de acción de las CMM son variados y consecuentemente, aún no está totalmente elucidado su mecanismo de acción.

Con el fin de demostrar la capacidad neuro-regenerativa de las CMM se logró la diferenciación *in vitro* en células de tipo neuronal y glial constatado por sobreexpresión de proteínas asociadas a la regeneración neuronal y glial como MAP2, beta-tubulina, NeuN, nestina y GFAP mediante inmunofluorescencia, de igual forma, por inmunohistoquímica, se las identificó en sitio de lesión (Park, et al. 2012). Además, se demostró la sobreexpresión de marcadores de neuronas maduras; también se visualizaron fenotípicamente estructuras similares a neuronas caracterizadas por soma redondo o fusiforme con prolongaciones largas y finas. Las células lograron expresar marcadores presinápticos y postsinápticos sugiriendo que tienen la capacidad de recibir y enviar señales eléctricas a través de sinapsis, asimismo, se constató la presencia de canales iónicos dependientes de voltaje demostrando que las CMM son capaces de generar potenciales de acción. Se sugirió que las CMM tienen potencialidad de sintetizar neurotransmisores dado que se ha constatado la expresión de GAD67, enzima mediadora del GABA, glutamato y colinacetyltransferasa (ChAT). Además, se demostró que, al utilizar matrices, éstos se integran al organismo del huésped y posibilitan la regeneración nerviosa en el sitio de la injuria, restableciendo conexiones nerviosas con posibles interacciones químicas y eléctricas entre células. (Wu, et al. 2019). Existe el conocimiento de que con restaurar entre un 10-15% de las conexiones medulares ante un daño es posible lograr recuperar funcionalidad motora (Besalti, et al. 2016). Por lo tanto, se abre una ventana de nuevas investigaciones en cuanto al uso en conjunto de terapia celular inducida genéticamente y matrices, ya que cada una de ellas proporciona beneficios complementarios que se ven reflejados en mejoras importantes en la locomoción de animales que sufrieron LME inducida. Por lo tanto, estos antecedentes son auspiciosos debido a que se consigue a través de la biotecnología generar células neuronales y gliales funcionales, lo que parece un avance importante hacia la potencial regeneración *in vivo*.

En cuanto a seguridad terapéutica en el uso de terapia celular sola o combinada con matrices, ninguno de los perros tratados desarrolló efectos adversos. Sin embargo, en dos caninos que además recibieron tratamiento con metilprednisolona, se observaron hemorragias gastrointestinales severas (Kim, et al. 2015) no relacionadas al uso de

CMM en sí, sino que, asociadas a úlceras peptídicas causadas por el uso de glucocorticoides. En consecuencia, se podría decir que el uso de CMM en caninos con LME inducidas es seguro ya que no se describieron alteraciones secundarias importantes.

A modo de analizar la evidencia científica descrita anteriormente es posible observar que en la mayoría de los estudios se utilizó un modelo de lesión que ocluye entre un 80-85% del canal medular (Kim, et al. 2015 y Khan, et al. 2018). Para esto, los caninos fueron sometidos a hemilaminectomía junto a embolectomía, ocasionando una lesión de ME entre T13 y L1 por compresión, variando en tiempo y sitio anatómico, sin existir diferencias respecto al daño primario como secundario (Kim, et al. 2015 y Khan, et al. 2018; Jung, et al. 2009; Lim, et al. 2007; Park, et al. 2012). Otro estudio prefirió seccionar completamente la ME en T9-T10 (Wu, et al. 2018). Este tipo de lesión condujo a la inmediata paraplejía sin reflejos sensoriales y motores, con pérdida de la PDP e incontinencia urinaria. Respecto al origen de las CMM, en los estudios se utilizaron tanto CMM del propio paciente (autólogas) o de un donante de la misma especie (allogénicas) y a su vez derivadas de diferentes tejidos como sangre del cordón umbilical (Lim, et al. 2007), MO (Jung, et al. 2009) y TA (Kim, et al. 2015; Khan, et al. 2019). En cuanto a la conservación de las CMM, se ha demostrado que no existen grandes diferencias entre la utilización de células frescas y las congeladas/descongeladas, lo que permite contar con una inmediata disponibilidad de CMM criopreservadas evitando los tiempos de espera desde su cultivo hasta su disponibilidad de uso (Khan, et al. 2019). A su vez, algunos autores intentaron mejorar la eficacia terapéutica de las CMM mediante dos técnicas principales, la administración conjunta de CMM y matrices de colágeno (Park, et al. 2012; Wu, et al. 2019) y modificación genética de las CMM (Khan, et al. 2019). Con respecto a las vías de administración, la más utilizada fue la vía intraparenquimatosa, la misma puede realizarse a través de la exposición de la zona de lesión mediante cirugía, como principales ventajas presenta mayor visualización de la ME y del sitio en cuestión, posibilita la concentración celular en el sitio específico de lesión, lo que puede asociarse a mayores efectos terapéuticos, además, admite la administración combinada con matrices/andamios. Dicho procedimiento requiere de anestesia general y debe ser realizado por un médico veterinario especializado (Khan, et al. 2019; Lim, et al. 2007; Park, et al. 2012;). Sin embargo, también se vieron efectos benéficos tras la administración IV, esta vía presenta gran practicidad, es poco invasiva y permite múltiples aplicaciones sin necesidad de intervenciones quirúrgicas o anestésicas, además, puede realizarse en la clínica diaria (Kim, et al. 2015). En resumen, se puede decir que los modelos experimentales utilizados ocasionan lesiones medulares muy similares entre ellas, lo que facilita la interpretación y comparación de los resultados clínicos. No obstante, al igual que en los modelos de lesiones naturales, los trabajos presentan cierta heterogeneidad en cuanto a la elección del tipo de terapia celular y las vías de administración debido a que aún no están estandarizados.

La principal ventaja de los estudios de LME inducida es la potencialidad de obtener mayor evidencia científica que los estudios de casos clínicos espontáneos. Es posible, obtener información *post-mortem* mediante exámenes histopatológicos, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia evidenciando características de las lesiones, extensión del daño, supervivencia celular y viabilidad de las mismas; lo que permite plantear hipótesis y asociaciones en cuanto a la sobreexpresión de factores y marcadores específicos de regeneración y actividad neural que se relacionan directamente con los efectos terapéuticos y mejoras en la funcionalidad nerviosa. Cabe destacar que todas las investigaciones planteadas son de origen asiático, donde se permite la experimentación animal con modelos invasivos en caninos; su uso se justifica a que el modelo de lesión de la ME guarda grandes semejanzas fisiopatológicas con los humanos, por lo tanto, los resultados obtenidos podrían ser extrapolables a la aplicación clínica en esta especie. En el mundo occidental, la experimentación con animales domésticos conlleva mayores conflictos éticos y morales lo que dificulta la realización de este tipo de estudios.

El análisis de las investigaciones deja en evidencia la heterogeneidad en cuanto a cómo se utilizan las CMM, y quizás a futuro se encuentre la forma de estandarizar la aplicación de las mismas. Asimismo, permiten entender los diferentes mecanismos de acción y reflejan su potencial eficacia y seguridad terapéutica. Se destaca que todos los estudios tienen como único fin lograr la recuperación funcional de la médula espinal lesionada o al menos permitir que los caninos implicados logren valerse por sí mismo; considerando importante alcanzar una mejor calidad de vida tanto para ellos como para su entorno; ya que permanecer parapléjicos implica por parte de sus propietarios mayor demanda de tiempo y requiere especial cuidado, sumado los gastos económicos que conlleva y sin lugar a dudas, el desgaste psicológico que ocasiona.

Casos de estudio con lesiones naturales en caninos

Algunos autores utilizaron CMM en lesiones naturales de ME para investigar sus efectos en la recuperación del daño, la importancia de este tipo de lesiones se debe a que los resultados pueden aproximarse y compararse a lo que ocurre en la realidad. Uno de los trabajos fue el de Penha, et al. (2014), el mismo tuvo como objetivo evidenciar los efectos terapéuticos del trasplante autólogo de CMM-MO en 4 caninos con LME debido a la compresión por hernias discales toracolumbares, ubicadas entre T12- L5. Los caninos presentaban paraplejía y fueron sometidos a hemilaminectomía para la descompresión medular; si bien recibieron fisioterapia no mostraron mejoras clínicas funcionales en un plazo de 6 meses; por lo cual, se decide aplicar CMM-MO en una segunda intervención quirúrgica en la que por hemilaminectomía se expuso la médula espinal, las células fueron inyectadas y sobre ellas se colocó una red de colágeno como andamio, con el fin de evitar la propagación de las mismas. Todos recibieron diferentes modalidades de fisioterapia en el período de estudio. Recién a partir del día 10 se observó una recuperación progresiva del reflejo panículo cutáneo,

menor respuesta frente a la percepción del dolor superficial y profundo y mejora moderada de la propiocepción. Además, dos de los perros presentaron, mejoras en la función intestinal y urinaria. Después de los 6 meses los avances no fueron significativos. El período de evaluación finalizó a los 18 meses, obteniéndose mejoras clínicas en 3 de los 4 perros, pero las imágenes de RM no mostraron cambios en las lesiones relacionadas a las mismas. Ningún animal presentó lesiones secundarias como compresiones extradurales. Los autores concluyeron que la administración de CMM-MO es segura y simple, a su vez, produce algunos beneficios clínicos evidentes en animales.

En otro trabajo, Besalti, et al. 2016, seleccionaron 13 caninos con lesiones de médula espinal agudas y crónicas entre las vértebras T3-L7 secundarias a un trauma externo. Los mismos habían recibido previamente tratamiento conservador y/o quirúrgico, pero continuaban sin mejoras, parapléjicos y con pérdida de dolor profundo. Se les realizó radiografía de columna vertebral y resonancia magnética previo al tratamiento celular. Los animales fueron evaluados neurológicamente mediante una escala de puntuación según marcha, nocicepción, propiocepción y exámenes electrofisiológicos, como, potenciales evocados somatosensoriales (PES) y potenciales evocados motores (PEM) durante 12 meses. Se cultivaron CMM-MO autólogas diferenciadas neurológicamente *in vitro*, las mismas se inyectaron de forma percutánea intraespinal al día 42 y 63. Como resultados los autores observaron mejoras en la puntuación de la marcha en 6 de los casos; mejoras en la marcha, propiocepción y nocicepción en solo 2 y en 5 animales no se evidenció ninguna mejora. Los autores concluyeron que los resultados de la terapia celular con CMM autólogas diferenciadas neurológicamente *in vitro* son beneficiosos, pero pueden variar según gravedad de lesión, dosis, momento y vías de administración.

Con el fin de comparar los efectos terapéuticos entre la cirugía descompresiva por sí sola o combinada con CMM, Kim, y su equipo de trabajo (2016) seleccionaron 34 caninos parapléjicos sin percepción de dolor profundo (PDP) a causa de hernias discales toracolumbares agudas con menos de 24 horas de evolución. Todos los perros fueron sometidos a cirugía descompresiva por hemilaminectomía con extracción del disco extruido, 25 caninos recibieron únicamente el tratamiento quirúrgico mientras que 9 perros además recibieron en la misma intervención el trasplante de CMM-TA alogénico vía intraparenquimal. También realizaron fisioterapia por electroacupuntura y terapia con láser. Los caninos fueron evaluados al final del estudio a un plazo mayor de 6 meses. Como resultados obtuvieron un éxito del 77,8% en el grupo de CMM en comparación al 52% del grupo de cirugía. De los 9 perros que recibieron la terapia celular, 7 lograron la recuperación completa, es decir, recuperaron la percepción del PDP y la capacidad de deambulación, un perro logró mejoras únicamente en su locomoción y el otro no logró recuperarse. Asimismo, el grupo tratado con CMM logró menores tiempos de recuperación en comparación al grupo de cirugía (60 y 63 días respectivamente). Los autores concluyeron que las CMM-TA utilizadas conjuntamente con cirugía descompresiva en perros con hernias discales

agudas sin PDP logra mayores beneficios terapéuticos en cuanto a la función neurológica en comparación al tratamiento quirúrgico por sí solo, y que los mismos se deben a las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras de las CMM (Kim, et al. 2016).

Con el mismo objetivo que el anterior, es decir, comparar los efectos de la descompresión quirúrgica por sí sola o combinada con CMM-TA alogénicas, pero en esta oportunidad, sobre pacientes con LME por hernias discales toracolumbares. Bach y su equipo (2019) seleccionaron 22 perros adultos con parálisis aguda y evaluaron su funcionalidad neurológica, clasificándolos en grado IV (paraplejía de extremidades posteriores, presencia o ausencia de nocicepción y dolor profundo presente) y grado V (paraplejía con pérdida de DP), todos los animales tenían afectada la micción. Se sometieron a técnicas de imagen (TC) para localizar sitio de lesión, siendo el más común T13-L1. Fueron divididos en grupos, grupo 1 sometidos únicamente a cirugía y grupo 2, cirugía y trasplante de CMM-TA. En el transcurso de 7 días posteriores a la LME aguda los animales fueron sometidos a cirugía descompresiva por hemilaminectomía y el grupo 2 recibió en espacio epidural una única dosis de CMM-TA. Los perros fueron evaluados hasta 90 días después del alta hospitalaria. Como resultados se encuentra que, sin importar el grupo, todos los animales recuperaron la micción voluntaria después de la cirugía. En cuanto a la recuperación de la locomoción, el 100% de los perros clasificados como grado IV (14/14) lograron recuperarla al igual que únicamente un perro de los ocho pertenecientes al grado V (12,5%), los demás no presentaron mejoras en los 90 días posteriores a la cirugía. Los animales del grupo 2 lograron una media en la recuperación de la locomoción de 7 días mientras que aquellos pertenecientes al grupo 1 lo alcanzaron a los 21 días, lo mismo sucedió con los tiempos de hospitalización, 3 días vs. 4 días respectivamente. Concluyen Las consideraciones finales fueron que el trasplante epidural de CMM-TA junto a la cirugía descompresiva contribuye positivamente a la mejora motora en perros con hernias discales agudas que se encuentran parapléjicos. Además, logran menores períodos de recuperación y tiempos hospitalarios en comparación a los perros que reciben únicamente el tratamiento quirúrgico (Bach, et al. 2019).

Otra investigación, planteó comparar la eficacia del tratamiento con CMM y de la terapia convencional, fue así que Bhat, et al. (2019) seleccionaron 44 casos clínicos con fracturas vertebrales causadas por accidentes automovilísticos o caídas con PDP intacto. A los mismos se les extrajo CMM de la cresta ilíaca, luego de su aislamiento, cultivo y diferenciación se obtuvieron CMM-MO, estas se inyectaron vía percutánea en sitio de lesión medular en dos dosis, al día 0 y al día 15. Mediante examen neurológico se puntuó la recuperación de todos los animales, como resultados se observó una mejora significativa en la propiocepción, marcha y en el dolor superficial. No se mostraron diferencias entre los grupos en cuanto al reflejo perineal, control de la defecación y tono de la vejiga urinaria, la atrofia muscular mostró mejoras graduales en el grupo tratado con CMM. Dicho estudio concluyó que el 50% de los caninos

tratados con CMM muestra mejoras funcionales significativas en comparación con el 20% que reciben tratamiento convencional.

En el trabajo de Prado et al. (2019) surge la idea de utilizar CMM derivadas de pulpa dentaria de dientes deciduos exfoliados caninos (DDEC) en LME para determinar si el tratamiento en conjunto con acupuntura ayuda a la conservación de las células en el sitio de lesión aumentando los efectos beneficiosos. Para esto, eligieron 16 perros parapléjicos con diagnóstico de hernia de disco intervertebral toracolumbar distribuidas entre T10-L4 con un mínimo de tres meses de evolución, pero con pérdida de dolor profundo y aparición aguda de parálisis dentro de las 24 hs de ocurrido el trauma medular. Por laminectomía dorsal se expuso la ME y se inyectaron las CMM de forma intraparenquimal en el sitio de lesión, hacia craneal y caudal de la misma. A la semana se volvió a inyectar de forma percutánea en tres sitios diferentes. Los animales fueron clasificados en cuatro grupos: 1) trasplante de DDEC, 2) únicamente AC, 3) trasplante de DDEC + AC y 4) grupo control. Los del grupo control y AC recibieron inyecciones de solución fisiológica. Además, todos los caninos recibieron al menos 31 sesiones de acupuntura e hidroterapia en cinta de correr durante tres meses. A su vez, todos los perros fueron evaluados al comienzo y al final del estudio mediante examen neurológico, evaluación funcional por puntuaciones según gravedad de signos clínicos y evaluación por imágenes mediante RM. Dicho estudio concluyó que el trasplante de DDEC es seguro ya que ningún perro falleció dentro de los 7 meses de seguimiento y que a pesar de que presentan leves mejoras neurológicas y funcionales éstas no son significativas, por lo cual, no se puede asociar los efectos beneficiosos al uso de DDEC solas o combinadas con acupuntura.

Una de las últimas investigaciones encontradas fue la de Vikartovska, et al. (2020), la misma desarrolló un protocolo de administración, determinando dosis, número de aplicaciones e intervalos de tiempo de CMM-MO alogénicas en medio acondicionado para luego, demostrar su seguridad y eficacia al aplicarlas en caninos con LME crónica. En primera instancia se cultivaron CMM-MO durante 14 días, luego se mezclaron en un medio acondicionado y se congelaron en alícuotas a un volumen de 1×10^6 células. Se incluyeron al estudio 4 caninos con LME a nivel toracolumbar con 6 meses de evolución, los mismos habían sido sometidos a cirugía descompresiva sin éxito y presentaban paraparesia o paraplejía de miembros posteriores, sin dolor profundo y en dos de los casos la función de la micción estaba alterada. Dichos caninos recibieron 4 aplicaciones de forma intravenosa en infusión lenta 1-1,5 ml/kg junto a 15-30 ml de suero fisiológico, una vez por semana. Asimismo, todos los perros realizaron fisioterapia desde el primer día posterior a la aplicación de las células durante tres meses. Como resultados obtuvieron mejoras de entre 4 y 9 puntos en la función locomotora en todos los perros, logrando marcha atáxica y mantener su peso corporal, mayores rangos de movimiento articular y la micción volvió a la normalidad en los caninos afectados. Ninguno de los animales manifestó efectos adversos. Por lo tanto, el protocolo de inyección intravenosa de CMM-MO en medio acondicionado fue seguro y bien tolerado, del mismo modo en el que proporciona mejoras terapéuticas,

pero establecen que la seguridad y eficacia debe evaluarse a largo plazo con más animales y con grupos control.

Para evaluar el potencial terapéutico de las CMM-MO alogénicas en LME Sharun y su equipo (2020) seleccionaron 6 caninos con fracturas vertebrales compresivas no desplazables con al menos dos semanas de evolución. Las fracturas en su mayoría (4/6) fueron de vértebras lumbares mientras que las demás fueron en vértebras torácicas. Los caninos presentaban signos clínicos de diversa gravedad, pero todos tenían la percepción de dolor intacta, cuatro de ellos presentaban paraplejia y tres de los mismos incontinencia urinaria, en cambio los dos restantes contaban con ataxia y paraparesia, por lo que el déficit neurológico fue más leve. La terapia celular se realizó en 4 aplicaciones a intervalos de 15 días, a un volumen de 1×10^6 células/ml, vía percutánea en parénquima medular, además recibieron terapia de apoyo mediante gabapentina y metilcobalamina. Los perros se evaluaron mediante examen neurológico previo al inicio del tratamiento y posterior a este cada 15 día. Como resultados obtuvieron que, de los perros paralíticos, tres lograron soportar su peso corporal en cuatro apoyos y adquirir una marcha ambulatoria (figura 11) mientras que uno de ellos no logró soportar su peso, pero sí alcanzó mejoras en la locomoción; todos recuperaron la micción voluntaria y los dos perros con leves déficits volvieron a ser normales en cuanto a su función locomotora y nerviosa. Ninguno desarrolló efectos adversos como infecciones, dolor neuropático o deterioros neurológicos posteriores. Los investigadores concluyeron que la administración percutánea e intraparenquimal de CMM-MO tiene potencial terapéutico para mejorar déficits neurológicos asociados a fracturas vertebrales en caninos, por otra parte, se considera una estrategia segura (Sharun, et al. 2020).

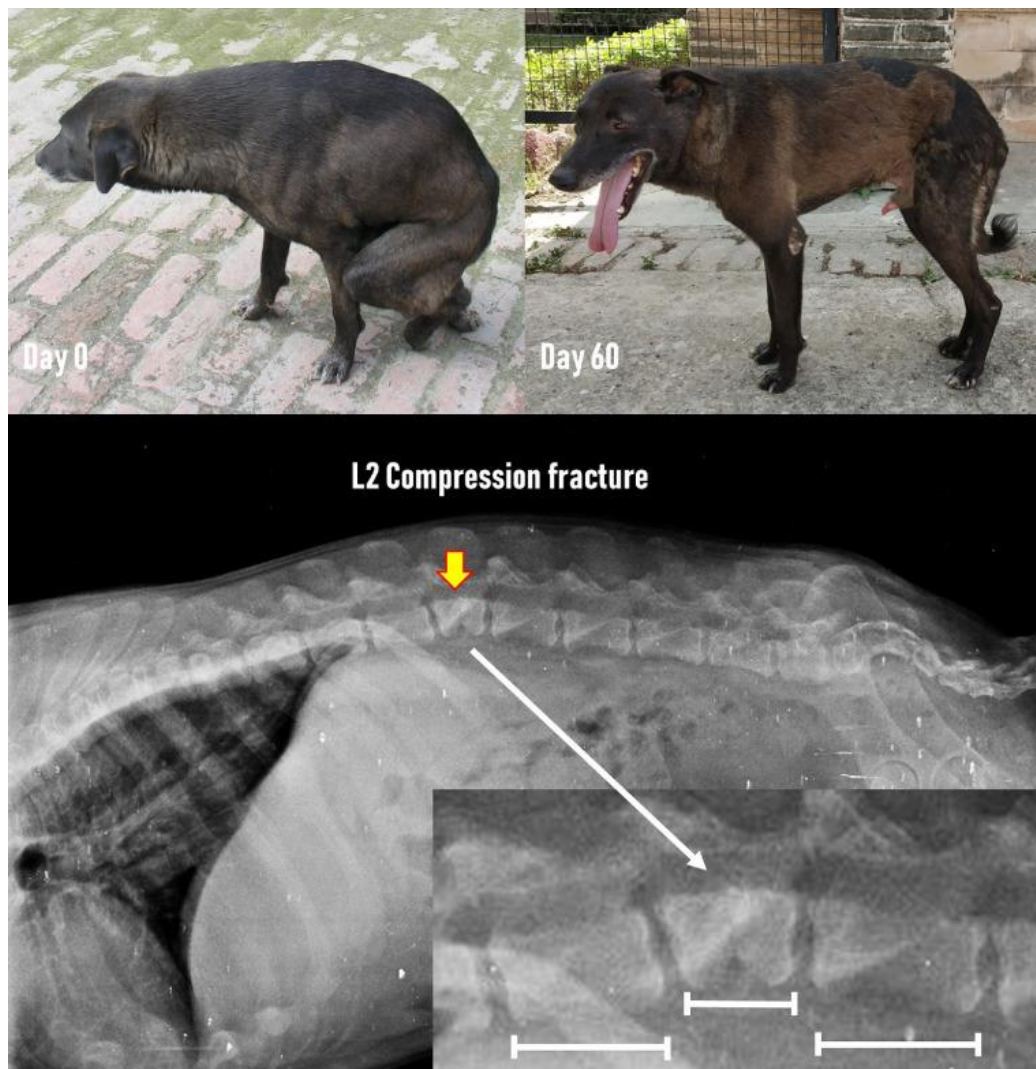


Figura 11. Evolución de un canino con lesión natural de médula espinal por fractura vertebral tratado con CMM-MO. La imagen radiográfica muestra: fractura no desviada compresiva en canal medular en L2 (flecha amarilla). En el margen superior izquierdo se observa al canino al día 0, con paraplejía de miembros posteriores, además presentaba incontinencia urinaria y presencia de PDP. A la derecha, el mismo canino al día 60 luego de la aplicación de la terapia celular con recuperación completa y soporte de su peso corporal. Tomada y adaptado de Sharun, et al. 2020.

En el estudio clínico piloto de Escalhao, et al. (2017) el objetivo principal fue evaluar la viabilidad y seguridad de la inyección percutánea (figura 12) de CMM-TA alogénicas en perros con LME crónica y en segunda instancia verificar posibles efectos terapéuticos. Para llevarse a cabo seleccionaron 6 caninos con fracturas, luxaciones o enfermedad de disco intervertebral que presentaban como signos clínicos paraplejía sin PDP e incontinencia urinaria de más de 6 meses de evolución. Todos recibieron una inyección de CMM-TA vía percutánea guiada por RX en los segmentos lesionados. Fueron evaluados previo al trasplante y durante el seguimiento del estudio el cual fue de 16 semanas. Como resultados, mediante gammagrafía obtuvieron que

las células administradas bajo esta vía permanecían en el sitio de lesión medular hasta al menos 24 horas después de la inyección, no evidenciaron su difusión a otros órganos o tejidos, incluso al LCR. Además, ninguno de los animales presentó efectos adversos. En cuanto a la eficacia terapéutica, ninguno de los animales recuperó la PDP como tampoco la micción voluntaria; de los 6 caninos, uno de ellos logró la deambulación normal al final del estudio, mientras que dos no recuperaron la locomoción, pero uno de ellos dejó de automutilarse. Asimismo, los tres restantes lograron mejoras en la puntuación de entre 3 a 7 puntos (en una escala donde 0 indica paraplejía completa y 14 indica marcha normal). Los autores concluyeron que la aplicación de CMM-TA vía percutánea guiadas por rayos en LME crónica era factible y que las mismas permanecían en el sitio de lesión. Además, su aplicación fue segura ya que no generó efectos adversos. Con relación a la eficacia terapéutica, si bien se observaron mejoras en la locomoción, plantearon volver a evaluar en un nuevo estudio con mayor número de animales.



Figura 12. Aplicación de CMM por vía percutánea. En (a) se observa la zona ya preparada para la inyección y la identificación del espacio vertebral por el cual se realizará la misma. En (b) la imagen radiográfica comprueba la presencia de la aguja en canal medular previo a la aplicación de las CMM. Extraída de Escalhão, et al. 2017.

Con respecto a la asociación de CMM con matrices de colágeno, Steffen y su equipo (2018) investigaron el tratamiento de la enfermedad de disco intervertebral (DIV) lumbosacra mediante inyección intradiscal de CMM autólogas junto a microportadores de colágeno utilizando caninos como modelo animal. Se incluyeron al trabajo 20 perros diagnosticados por RM con enfermedad de DIV lumbosacra por degeneración y protrusión discal con compresión de la cauda equina entre L7-S1. Las CMM-MO se cultivaron en presencia del factor de crecimiento transformante beta- 1 (TGF-b1) para inducir la condrogénesis. La diferenciación condrogénica *in vitro* de las CMM no mostró diferencias significativas entre los andamios sembrados con TGF-b1 y los que no. Los andamios sembrados con TGF-b1 y CMM lograron acumular casi un 50% más

de GAGs en comparación con el andamio sin dicho factor. A su vez, se realizaron pruebas biomecánicas en segmentos lumbosacros *ex vivo*, no observándose fugas de CMM durante la carga mecánica después de la inyección intradiscal. Los animales fueron sometidos a descompresión quirúrgica por laminectomía dorsal a medida que eran diagnosticados y en la misma intervención quirúrgica las CMM se inyectaron en profundidad del núcleo pulposo. Se formaron tres grupos: 1) 11 animales tratados con CMM-MO junto a microportadores de colágeno; 2) 6 caninos con microportadores de colágeno, CMM-MO y el TGF- β 1 y en el grupo 3) 3 caninos microportadores de colágeno junto a solución fisiológica, siendo el grupo control (control). Los animales fueron reevaluados por examen físico y RM meses después del trasplante celular. En cuanto a resultados clínicos, todos los perros tratados con andamios mejoraron el dolor y la puntuación de funcionalidad neurológica. Las inyecciones intradiscales fueron bien toleradas en 18 de los caninos, pero 2 de ellos manifestaron aumento de dolor en zona lumbosacra a las 3 semanas de las mismas. En la RM se evidenció anomalías morfológicas ausentes en la RM preoperatoria, se observaron lesiones hiperintensas focales y redondeadas en médula subcondral y defectos en placa terminal con protrusión del núcleo pulposo hacia cuerpo vertebral, cumpliendo con criterios para el diagnóstico de nódulos de Schmorl (NS). Dichas lesiones se encontraron en un total de 6 perros (30%), 5 pertenecían al grupo 1 y 1 perro al grupo 2. Por lo tanto, únicamente dos caninos manifestaron dolor asociado a NS, mientras que 4 de los 6 perros afectados fueron asintomáticos. Los investigadores concluyeron que, las CMM se mantuvieron en el sitio de inyección, pero no regeneraron la morfología de los DIV. A su vez, la formación de NS se describió por primera vez como un efecto secundario no deseado asociado a la aplicación intradiscal de microportadores de colágeno en conjunto a la terapia celular. Además, asociaron las mejoras clínicas en todos los grupos a la descompresión quirúrgica y no a la utilización de CMM (Steffen, et al. 2018).

Consideraciones generales sobre las terapias de LME naturales

Como conclusiones generales de los trabajos mencionados que utilizan CMM en LME naturales, se puede decir que diversos estudios lograron efectos beneficiosos atribuidos a diferentes hipótesis. Algunos autores establecieron que los efectos de las CMM sobre el SNC están dados por su capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora y que sus mecanismos de acción se relacionan al aumento en la expresión de citoquinas inmunomoduladoras como la interleucina- 10 (IL-10) (Bach, et al.2019; Bhat, et al. 2018) y reducción en la expresión de factores proinflamatorios (IL-1, IL-6, COX-2 y TNF- α), ocasionando de forma secundaria, un efecto neuroprotector al disminuir la apoptosis y aumentar la supervivencia de células nerviosas endógenas (Kim, et al. 2016). Sin embargo, de forma contraria, en otra hipótesis se sostuvo que la eficacia terapéutica está dada de forma primaria por el aumento de compuestos neuroprotectores en el sitio de lesión y son ellos los que causan la disminución de la inflamación y astrogliosis, aumentando la extensión y regeneración neuronal (Besalti, et al. 2016). También se evidenció que las CMM tienen

actividad paracrina y su interacción con factores endógenos de la ME pueden estimular la liberación de mediadores pro-regenerativos y la expresión de factores pro angiogénicos responsables de la eficacia terapéutica (Penha, et al. 2014; Vikatrovska, et al. 2020). En suma, a pesar de las diferentes hipótesis en dichos trabajos no se considera que el mecanismo de acción de las CMM sea el reemplazo del tejido funcional dañado, siendo su capacidad de inducir regeneración cuestionable. Sin embargo, su capacidad inmunomoduladora podría ser la clave de sus efectos terapéuticos al mejorar el microambiente de la lesión, evitando la progresión del daño y promoviendo procesos neuroprotectores.

En los resultados de las investigaciones descritas anteriormente se determinó que los animales lograron mejoras en su locomoción y deficiencias neurológicas luego de la administración de CMM. Como es de amplio conocimiento en la neurología veterinaria, la pérdida de la PDP es un mal factor pronóstico en las LME, ya que sugiere la existencia de un daño severo y profundo de la ME (Kim, et al. 2016). Sin embargo, en los trabajos que aplicaron CMM en pacientes donde la PDP no estaba presente, se obtuvieron resultados variados; algunos caninos mostraron mejoras por completo cuando la pérdida de la PDP se constató dentro de las 24 horas posteriores al daño y la terapia celular se realizó dentro de la primera semana del mismo (Kim, et al. 2016); mientras que, en otros trabajos los resultados no fueron del todo prometedores y las mejoras fueron parciales y limitadas a algunos animales (Cardoso, et al. 2017; Besalti, et al. 2016; Penha, et al. 2014; Sharun, et al. 2020, Vikartovska, et al. 2020). Este pronóstico se mantiene tras el uso de CMM dado que se ha evidenciado que los efectos terapéuticos son mayores cuando los animales mantienen la PDP intacta (Sharun, et al. 2020).

Conviene destacar que en enfermedades del disco intervertebral agudas los resultados fueron mayores en cuanto a mejoras clínicas cuando se utilizó la terapia celular conjuntamente con el tratamiento quirúrgico (Kim, et al. 2016). Su uso también se asoció a menores tiempos de recuperación y de hospitalización (Bach, et al. 2019). Asimismo, en LME crónica se evidenciaron mejoras clínicas progresivas (Besalti, et al. 2016; Penha, et al. 2014), incluso en animales que habían recibido tratamiento quirúrgico como primera medida (Vikartovska, et al. 2020). A pesar de las leves mejoras neurológicas en este tipo de lesiones, no es posible asegurar que los mismos se debieron al uso de la terapia celular sola o combinada con tratamiento quirúrgico o fisioterapia (Prado, et al. 2019). En contraste, algunos autores postularon que las mejoras clínicas se debieron a la descompresión quirúrgica y no al uso de CMM (Steffen, et al. 2018). Por otro lado, el uso de CMM en fracturas y luxaciones vertebrales logró mayores mejoras en comparación con las observadas en caninos sometidos exclusivamente al tratamiento convencional (Bhat, et al. 2018). Es preciso señalar que algunos animales recuperaron la micción voluntaria y en aquellos donde la PDP estuvo presente, se evidenció que soportan su peso y vuelven a caminar de forma ambulatoria (Sharun, et al. 2020). En pocas palabras, podríamos decir que las CMM son una potencial terapia para las LME al lograr grandes beneficios asociados

a mejoras neurológicas y funcionales que varían según origen y gravedad del daño en caninos parapléjicos, por lo que tienen una eficacia terapéutica variada. Se hace de vital importancia la actualización de los profesionales veterinarios para el uso adecuado de estas nuevas alternativas terapéuticas que aún están en fase de experimentación.

Al igual que en los trabajos de LME inducidas, en los de lesiones de ME naturales existió heterogeneidad en las vías de administración de CMM utilizadas. Si bien se utilizó la vía intravenosa (Vikartovska, et al. 2020) y la intraparenquimatosa con abordaje quirúrgico (Kim et al. 2016; Penha, et al. 2014; Prado, et al. 2019; Steffen, et al. 2018), otros estudios describieron la administración percutánea. Respecto a esta vía, si bien es de fácil aplicación, el médico veterinario encargado de administrarla deberá contar con cierta experiencia, ya que la misma se realiza de forma intratecal o intraparenquimatosa; también ya que admite la administración intraparenquimatosa o intratecal, cuenta con la ventaja de permitir el depósito celular en el sitio de lesión como a su proximidad, garantizando el volumen celular depositado en distintas capas de la médula, por lo tanto, en un área más amplia. Sin embargo, presenta como desventaja, la necesidad de anestesiarse al paciente para llevarlo a cabo (Besalti, et al. 2016; Bhat, et al. 2018; Escalhão, et al. 2017; Sharun, et al. 2020). Aún resulta muy complejo poder determinar que vía de administración sería más eficaz, por lo tanto, hacen falta más estudios al respecto.

En cuanto a seguridad terapéutica, no se observaron efectos adversos relacionados a la administración de CMM vía intravenosa, intralesional e intraparenquimal (Penha, et al. 2014; Kim, et al. 2016). Dicho punto fue evaluado mediante hemograma, función renal y hepática como también por examen neurológico, no encontrándose signos de infección, inflamación o alteraciones funcionales, como tampoco deterioro neurológico o aparición de dolor neuropático (Cardoso, et al. 2017). Sin embargo, se describe por primera vez la formación de nódulos de NS como efecto adverso asociado a la utilización de terapia celular combinada con matriz cartilaginosa vía intradiscal en caninos con lesiones de disco intervertebral, su aparición puede manifestarse mediante dolor vertebral debido a que son herniaciones del NP que comprimen la ME (Steffen, 2018). Por la evidencia revelada podría decirse que la terapia celular con CMM en lesiones de médula espinal no genera grandes contraindicaciones, como tampoco riesgo oncogénico, al menos durante el período de seguimiento de los casos estudiados. De todas maneras, en estudios a futuro se deberá realizar seguimientos por un mayor período de tiempo, como también, profundizar el estudio debido a los escasos reportes de efectos adversos como el anteriormente mencionado para garantizar la seguridad terapéutica de las CMM.

Este tipo de trabajos basados en lesiones naturales y en pacientes reales, tiene como principal limitante la falta de generar datos que demuestran con evidencia histológica e inmunohistoquímica los beneficios que puede tener la terapia celular; por lo tanto, no se puede determinar con exactitud el/los mecanismos de acción de las CMM para

ejercer sus efectos terapéuticos. Sin embargo, tienen la ventaja de ser una copia fiel de lo que puede ocurrir en la realidad si se decide llevar su uso a la práctica cotidiana. Si bien la aplicación de terapia celular es heterogénea en los diversos estudios y aún no está estandarizada cual sería la forma de aplicación ideal, si es necesario una única dosis o múltiples como los intervalos de tiempos entre aplicaciones, lo que podemos mencionar de los artículos es que en aquellos en los cuales la aplicación es sobre la médula espinal directamente, el volumen de células es el mismo o muy similar; esto se debe a la capacidad limitada que tiene la misma de recibir un volumen sin alterar su estructura y por lo tanto empeorar el daño en lugar de solucionarlo. En suma, hasta el momento no existe un acuerdo en cuanto al uso de CMM en la práctica clínica de afecciones medulares en caninos paralíticos, debido a esto, es fundamental el continuar los estudios clínicos en caninos con un riguroso protocolo experimental tanto en el tipo de paciente como también las células y vía de administración.

Por último, en Uruguay hasta el momento no existen descripciones de terapia celular para afecciones neurológicas en caninos. Sin embargo, como antecedente podemos mencionar que Yaneselli et al. 2018 aislaron y caracterizaron CMM provenientes de tejido adiposo canino, además, se generó un biobanco de CMM criopreservadas caninas para su potencial uso en estudios clínicos *in vitro* en medicina veterinaria (Yaneselli et al. 2018).

Tabla 2. Trabajos de lesiones de médula espinal inducidas y naturales donde se utilizan células madre como medida terapéutica.

Origen de la lesión	Cantidad de animales y características	Zona de lesión	Momento y vía de aplicación	Tipo, cantidad de células (x millón) y frecuencia de aplicación	Resultados	Referencias
Inducidas	25 caninos paralíticos en MPs por compresión medular inducida con catéter insuflado	Entre T13-L1	7 días después de la LME de forma intraparenquimal directa, por laminectomía	CMM- UCB alogénicas 1x10 ⁶ células en 150 ul de SF	Los grupos tratados mejoran puntuaciones de función motora dos semanas posteriores a la administración al igual que en la velocidad de conducción nerviosa evaluada por potenciales evocados somatosensoriales. No hubo evidencia de RM ni histológica de regeneración del tejido dañado.	Lim, et al. (2007).
	30 caninos paralíticos en MPs por compresión medular inducida con balón de silicona insuflado	Entre L2-L3	7 días posteriores a la LME Inyección percutánea intratecal guiada por fluoroscopia en L4-L5	CMM derivadas de MO autólogas y alogénicas 1x10 ⁷ única dosis suspendidas en 3ml de SF	En comparación con grupo control se observan mejoras terapéuticas funcionales, de imagen por RM, histopatológicos e inmunohistoquímicos. Asociados a la sobre expresión de factores neurotróficos y neuroprotectores	Jung, et al. (2009).
	12 caninos paralíticos en MPs por compresión medular inducida con catéter insuflado	Entre T13-L1	7 días después de la LME, vía Intraparenquimal en L1 con la duramadre intacta	CMM-TA inducidas neurogénicamente y sembradas en matriz 1x10 ⁷ células suspendidas en 200 µl de matriz	Los tratados muestran recuperación funcional mejor 8 semanas después en comparación a los que reciben solo la matriz o el grupo control. La HP e IHQ revelan reducción de la fibrosis y mejora la regeneración neuronal. Mayor expresión de marcadores de extensión neuronal y neurotróficos.	Park, et al. (2012).
	16 caninos paralíticos en MPs por compresión medular inducida con catéter insuflado	Entre T13-L1	Vía IV c/ 24 hs durante 3 días consecutivos comenzando inmediatamente después de la LME	CMM- TA alogénicas 1x10 ⁷ células en 10 ml de solución ringer lactato	Grupos tratados (con MPSS y sin ésta) a los 7 días posteriores mejoraron el movimiento de MPs, además, muestran menor expresión de citoquinas y factores proinflamatorios. La HP del grupo que recibe solo CMM-TA revela menor hemorragia y menor infiltración microglial. Las CMM-TA se detectaron en pulmón, bazo, hígado y ME lesionada.	Kim, et al. (2015).
	15 caninos paralíticos en MPs sin PDP, por sección medular completa	T10	En misma intervención quirúrgica, en zona de sección medular	CMM- MO cultivadas con CS y sembradas en andamio de gelatina	Restauración gradual de la función motora en comparación al grupo control el cual no mostró cambios. La RM e ITD exhiben robusta regeneración del tacto nervioso en sitio de injerto.	Wu, et al. (2018).
	12 caninos paralíticos en MPs, con pérdida de dolor profundo, por compresión medular inducida con catéter insuflado	Entre L1-L2	Primera aplicación inmediatamente post a la cirugía de LME, dos aplicaciones más cada 24hs Inyección intravenosa por infusión continua, lenta.	CMM- TA alogénicas frescas y CMM-TA con expresión del gen HO-1 alogénicas frescas y Congeladas/Descongeladas (C/D) Frescas: 1x10 ⁷ C/D: 1,5x10 ⁷ Diluidas en 20 ml de	El uso de CMM-TA con expresión de HO-1 obtiene mejoras significativas funcionales en miembros posteriores, mayor expresión de citoquinas antiinflamatorias y menor expresión de proinflamatorias, propiedades antioxidantes, menor fibrosis y mayor mielinización, se las considera neuro protectoras.	Khan, et al. (2019).

				solución de Hartmann Cada dosis		
Naturales	4 caninos con LME crónica, de 6 meses de evolución, sin mejoras posterior al tratamiento quirúrgico por hernias discales agudas. Distintos grados de gravedad.	Entre T12 - L5	Vía intraparenquimal directa, única aplicación	CMM-MO autólogas 1x10 ⁶ células cada cm ³ de lesión	A los 10 días se observa recuperación progresiva del reflejo del pániculo cutáneo y menor respuesta frente al dolor superficial y profundo, dos de los perros recuperan la propiocepción y micción voluntaria. Tres perros mejoran lenta y progresivamente durante 18 meses. Las mejoras no se correlacionan a imágenes de RM.	Penha, et al. (2014)
	34 caninos con paraplejía de inicio aguda, menor a 24 hs, sin PDP por hernias discales	Toracolumbar	Intraparenquimal directa a través de la duramadre en misma intervención quirúrgica descompresiva dentro de los primeros 7 días de ocurrida la LME	CMM-TA alogénicas 1X10 ⁷ células suspendidas en 150 µl de SF	El grupo tratado mediante cirugía descompresiva y CMM-TA tiene una tasa de éxito (mejores signos clínicos y menores tiempos de recuperación) del 77,8% en comparación al 52% del grupo tratado con cirugía evaluados 6 meses después del tratamiento.	Kim, et al. (2016)
	6 caninos con paraplejía crónica mayor a 6 meses de evolución	Toracolumbar	Inyección intraespinal percutáneo guiada por RX	CMM-TA alogénicas	Tres caninos mejoran la locomoción según escala de puntuación, un único perro recuperó la capacidad de caminar sosteniendo todo su peso. Ninguno recuperó la PDP.	Escalhão, et al. (2017).
	13 caninos parapléjicos con pérdida de dolor profundo ya tratados (conservador y/o quirúrgico) sin mejoras, secundario a traumas	Entre T3-L7	42 días después de la LME Inyección percutánea	CMM – MO autólogas, inducidas neurogénicamente <i>in vitro</i> Dos dosis de 5x10 ⁶ c/u suspendidas en 1 ml de SF al día 42 y 63.	Se observan mejorías en marcha, propiocepción, nocicepción. Ninguna mejora en 5 de los casos. Terapia prometedora. Sin grupos control para comparar.	Besalti, et al. (2016)
	44 caninos parapléjicos con lesiones medulares por fracturas vertebrales, con presencia de PDP.	Toracolumbar	Al identificar sitio de lesión por imagen Inyección percutánea	CMM- MO alógenas canina 1x10 ⁶ células, dos dosis a intervalo de 15 días.	El 70% del grupo tratado con CMM muestra mejorías significativas en la recuperación funcional en comparación al grupo que recibe terapia convencional.	Bhat, et al. (2018)
	16 caninos parapléjicos con pérdida del dolor profundo de inicio agudo por hernias discales crónicas	Entre T10-L4	Entre los 3 y 18 meses de ocurrida la lesión Inyección intraparenquimal directa previa laminectomía dorsal	CMM alógenas derivadas de pulpa dentaria canina Dos dosis de 2x10 ⁶ c/u al día 0 y a día 7.	Los cuatro grupos tratados o no con CMM, presentan leve mejoría neurológica y funcional pero no significativas. No se logró establecer mayores efectos con la terapia combinada.	Prado, et al. (2019)
	22 caninos parapléjicos con TMA por hernias discales (Hansen I)	Entre T13-L1	Dentro de los 7 días de ocurrida la lesión Inyección epidural junto a hemilaminectomía para descompresión	CMM alogénicas derivadas de TA Única dosis de 1x10 ⁷	En comparación con realizar únicamente la descompresión quirúrgica, el tratamiento combinado contribuye a una recuperación locomotora más rápida y un menor tiempo de hospitalización	Bach, et al. (2019).

20 caninos con enfermedad de DIV protruido	Entre L7-S1	Cirugía descompresiva e inyección intradiscal	e CMM- MO autólogas unidas a micro portadores de colágeno	Se observa una mejora clínica en todos los grupos, 6 caninos desarrollan nódulos de Schmorl como efecto adverso secundario, únicamente dos muestran dolor lumbar en aumento como signo clínico, 3-4 meses después del tratamiento. El riesgo puede disminuirse al administrar menos volumen. No se logra regenerar la estructura del DIV degenerado.	Steffen, et al. (2019).
4 caninos con LME crónica de más de 6 meses de duración, que ya habían sido sometidos a tratamiento quirúrgico, con paraparesia y paraplejía.	Entre T11 y L2	Intravenosa lenta	Medio acondicionado con CMM-MO alogénicas, 1x10 ⁶ de células en 1 ml de medio acondicionado 4 infusiones en un plazo de un mes a una dosis de 1-2 ml/kg en SF	Según escala de puntuación todos los perros muestran mejoras clínicas hasta 6 meses posteriores al tratamiento. La micción voluntaria se recuperó en dos de los perros.	Vikartovska, et al. (2020).
6 caninos con fracturas no desviadas y compresión vertebral, presente la PDP en todos ellos. Distintos grados de déficits neurológicos, desde ataxia a paraplejía e incontinencia urinaria.	Vértebras lumbares (4/6) y vértebras torácicas T9 y T11 (2/6)	Percutánea intraparenquimal	e CMM-MO alogénicas 1X10 ⁶ células en 1 ml de solución. Se repitió cada 15 días, hasta un máximo de 4 dosis según el caso.	Tres de los 4 animales que presentaban paraplejía lograron soportar su peso corporal y volverse ambulatorios, uno de ellos mejora significativa pero no soporta el peso. Los otros dos caninos tenían lesiones menos graves y volvieron a caminar normalmente. El dolor superficial se recuperó al igual que la incontinencia urinaria.	Sharun, et al. (2020).

Abreviaturas: Congeladas/Descongeladas (C/D), células madre (CMM), CMM derivadas de médula ósea (CMM-MO), CMM derivadas de tejido adiposo (TA), torácica (T), lumbar (L), percepción del dolor profundo (PDP), suero fisiológico (SF), lesión de médula espinal (LME), trauma medular agudo (TMA), disco intervertebral (DIV), miembros posteriores (MPs).

CONSIDERACIONES FINALES

Las LME son frecuentes en animales de compañía y su principal importancia radica en que pueden llevar a una pérdida permanente de las funciones motoras y viscerales que conlleva a la dependencia por parte de sus propietarios el resto de sus vidas determinando un gran desgaste psicológico de los mismos y sin lugar a dudas, una deteriorada calidad de vida de los animales afectados. A su vez, las terapias actuales utilizadas en el TMA tienen grandes limitaciones ya que si bien pueden disminuir la sintomatología no pueden utilizarse de por vida dado los riesgos que implica; lo que ocasiona en los médicos veterinarios una frustración inmensa por no poder revertir la situación de sus pacientes y con el tiempo en muchos de los casos, se termina optando por la eutanasia.

Algunos animales que sufren un TMA recuperan parte de la locomoción adoptando una marcha medular; lo que sólo podría ser posible cuando reciben una pronta atención veterinaria, en la que se aplican antiinflamatorios, analgésicos e inmovilización para posteriormente con la ayuda de fisioterapia por largos períodos lograr ciertos avances. Pero, únicamente son algunos los que tienen éxito y éste se observa en los animales donde el daño medular es leve. Se sabe que en aquellos animales donde la percepción del dolor profundo no está presente, la ME ha sufrido un daño grave, prácticamente irreversible. Por lo tanto, se puede considerar a la pérdida de la PDP, como el factor pronóstico más importante cuando se desea dejar en claro las expectativas de recuperación de las funciones perdidas.

Si bien se realiza un análisis de las terapias celulares, comparar los resultados es difícil debido a que hay muchas variables en juego, como los diferentes criterios de inclusión de selección de casos, las enfermedades causales de la LME, los signos clínicos como periodo de tiempo en el cual se pierde la PDP y la modalidad de tratamiento de elección, como tipo celular, vía de administración, número de aplicaciones, entre otras. Entonces, se podría decir que en la actualidad la información sobre el uso de terapia celular en traumas medulares caninos es inconclusa y aún deja dudas sobre cómo y cuándo aplicarla. A su vez, se han llevado a cabo investigaciones en LME inducidas que evidencian el potencial efecto regenerador del tejido neural dañado que podría alcanzar la terapia con CMM inducidas genéticamente a células progenitoras neurales, lo que aún deberá probarse *in vivo*. Si bien existen múltiples hipótesis sobre el mecanismo de acción que tienen las CMM, hasta el momento no se ha logrado un consenso entre los trabajos evaluados; pero los estudios tanto de lesiones inducidas como naturales demuestran que la eficacia terapéutica es prometedora y los reportes de efectos adversos escasos.

Para finalizar, el potencial terapéutico de las CMM continúa siendo el mayor punto de interés entre los investigadores y médicos veterinarios. Por lo mencionado en este trabajo queda claro que tanto por su multipotencialidad, capacidad de promover la

regeneración tisular y su efecto inmunomodulador muestran un futuro auspicioso para ser usadas de rutina como tratamiento seguro y eficaz para LME en caninos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., y Fehlings, M.G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 27(3), 17018.
- Allen, J.N., y Barres, B.A. (2009). Neuroscience: glia- more than just brain glue. *Nature*, 457, 675- 677.
- Amrein, I., y Lipp, H.P. (2009). Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history. *Biology Letters*, 5(1), 141–144.
- Aquino, R., y Tume, L. (2015). Factores de transcripción de las células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas. *The Biologist*, 13(1), 143-152.
- Arroyo, T.E. (2008). Principios básicos de la fisioterapia y rehabilitación en perros. En E.C. Santoscóy Mejía (Ed.), *Ortopedia, neurología y rehabilitación en pequeñas especies: perros y gatos* (pp. 469- 493). México: Manual moderno.
- Bach, F.S., Rebelatto, C.L.K., Fracaro, L., Senegaglia, A.C., Fragoso, F.Y.I., Daga, D.R., ... Villanova, J.A. Jr. (2019). Comparison of the efficacy of surgical decompression alone and combined with canine adipose tissue-derived stem cell transplantation in dogs with acute thoracolumbar disk disease and spinal cord injury. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 383.
- Bartlett, M.B. (2008). Novel Combination Strategies to Repair the Injured Mammalian Spinal Cord. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 31(3), 262-269.
- Bayona, F. (2012). Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos: revisión. *Universitas Odontológica*, 31(66), 125-132.
- Bergknut, N., Smolders, L.A., Grinwis, C.M., Hagman, R., Lagerstedt, A.S., Hazewinkel, H., Tryfonidou, M.A., y Meij, B. (2013). Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 1: Anatomy and physiology of the intervertebral disc and characteristics of intervertebral disc degeneration. *The Veterinary Journal*, 195, 282–291.
- Besalti, O., Zeynep, A., Pinar, C., Eylul, A., Ayse, E., Yasar., y Murat, E. (2016). The use of autologous neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of paraplegic dogs without nociception due to spinal trauma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78, 1465–1473.
- Bhat, I.A., Somal, A., Pandey, S., Bharti, M.K., Panda, B.S.K., Verma, M., ... Sharma, G.T. (2019). An allogenic therapeutic strategy for canine spinal cord injury using mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2705-2718.

- Carrasco, M.S., Calles, B.C., Marcin, J., Fernández, Á.C., y Martínez, L.J. (2014). *Contrastes basados en gadolinio utilizados en resonancia magnética. Radiología*, 56, 21–28.
- Casallas, C.L.H., Duran, V.K.J., Pacheco, Á.D., y Rueda, H.J.C. (2018). Trauma medular agudo: hernia discal toracolumbar en Canino. *Redvet*, 19(1), 15, 1.
- Chen, D., Zeng, W., Fu, Y., Gao, M., y Lv, G. (2015). Bone marrow mesenchymal stem cells combined with minocycline improve spinal cord injury in a rat model. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 11957-69.
- Chipayo, Y.G., Lozada, P.P., Olazabal J.L., y Díaz, D. (2019). Estabilización quirúrgica utilizando la fijación segmentaria con clavo de Steinmann y alambre quirúrgico en un canino con luxofractura vertebral toracolumbar. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 974-982.
- Chow, L., McGrath, S., de Arruda Saldanha, C., Whalen, L.R., Packer, R., y Dow, S. (2020). Generation of neural progenitor cells from canine induced pluripotent stem cells and preliminary safety test in dogs with spontaneous spinal cord injuries. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 575938.
- Coates, J.R., Sorjonen, D.C., Simpson, S.T., Cox, N.R., Wright, J.C., Hudson, J.A., ... Brown, S.A. (1995). Clinicopathologic effects of a 21-aminosteroid compound (U74389G) and high-dose methylprednisolone on spinal cord function after simulated spinal cord trauma. *Veterinary Surgery*, 24(2):128-39.
- Cunningham, J.G., y Klein, B.G. (2009). *Fisiología veterinaria* (4ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Da Costa, C.R. (2017). Ventral Cervical Decompression. En A. Shores y B.A. Brisson (Eds.), *Current Techniques in Canine and Feline Neurosurgery* (pp, 157 - 161). Hoboken: John Wiley & Sons.
- David, S., Lopez-Vales, R., y Yong, W. (2012). Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications. *Handbook of Clinical Neurology*, 109 (3), 485-502.
- De Lahunta, A., Glass, E., y Kent, M. (2015). *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* (4ª ed., pp. 587). St Louis: Elsevier.
- De Rasio, L., Adams, V., Dennis, R., y McConnell, F.J. (2009). Association of clinical and magnetic resonance imaging findings with outcome in dogs with presumptive acute noncompressive nucleus pulposus extrusion: 42 cases (2000-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(4), 495-504.

- Decimo, I., Fumagali, G., Berton, V., Krampera, M., y Bifari, F. (2012). Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *American Journal of Stem Cell*, 1(2), 92-105.
- Devid, S., y Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, (12), 388- 399.
- Dewey, C.W., y Da Costa, R.C. (2016). *Practical Guide to canine and feline neurology* (3ª ed.). Hoboken: John Wiley.
- Dominici, M., Blanc, K.L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., ... Horwitz E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement*, 8 (4), 315-317.
- Duan, H., Song, W., Zhao, W., Gao, Y., Yang, Zhaoyang., y Li, X. (2016). Endogenous neurogenesis in adult mammals after spinal cord injury. *Science China Life Sciences*, 59(12), 1313-1318.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., y Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329–337.
- Dumont, J.R., Okonkwo, O.D., Verma, S., Hurlbert, J.R., Boulos, T.P., Ellegala, B.D., y Dumont., S.A. (2001). Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 254-264.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., y Wensing, C.J.G. (2007). *Anatomía veterinaria* (3ª ed.). México: El Manual moderno.
- Engle, S.J., Blaha, L., y Kleiman, R.J. (2018). Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron*, 100(4), 783-797.
- Escalhão, C., Ramos, I. P., Hochman-Mendez, C., Brunswick, T., Souza, S., Gutfilen, B., ... Coelho-Sampaio, T. (2017). Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cells International*, 2017, 3053759.
- Feliu-Pascual, A.L., y Jiménez, M. (2016a). Nociones básicas pero imprescindibles para afrontar un caso de trauma medular (I): fisiopatología y evaluación. *Argos*, 182, 68.
- Feliu-Pascual, A.L., y Jiménez, M. (2016b). Nociones básicas pero imprescindibles para afrontar un caso de trauma medular (II): tratamiento y pronóstico. *Argos*, 183, 56-56.

- Fenn, J., Olby, N., y The Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI). (2020). Classification of Intervertebral Disc Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 7579025. doi: 10.3389/fvets.2020.579025
- Fingerroth, J.M. (2017). Dorsal Cervical Decompression (Laminectomy/ Hemilaminectomy and Laminotomy). En A. Shores y B.A. Brisson, *Current Techniques in Canine and Feline Neurosurgery* (pp. 149 -156). Hoboken: John Wiley.
- Fleming, J.M., Creevy, K.E., y Promislow D.E.L. (2011). Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related causes of Death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25,187–198.
- Garcia Sacristan, A., Castejón Montijano, F., de la Cruz Palomino, L. F., González Gallego, J., Murillo López de Silanes, M.D., y Salido, Ruiz, G. (1995). *Fisiología veterinaria* (5ª ed.). México: McGraw- Hill. Interamericana.
- Gonçalves, N., Ambrósio, C., y Piedrahita, J. (2014). Stem Cells and Regenerative Medicine in Domestic and Companion Animals: A Multispecies Perspective. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 2–10.
- Griffiths, I.R. (1988). Spinal cord injuries: a pathological study of naturally occurring lesion in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 303-315.
- Grochowski, C., Radzikowska, E., y Maciejewski, R. (2018). Neural stem cell therapy - brief review. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 173, 8-14.
- Habib, N., Li, Y., Heidenreich, M., Swiech, L., Avraham-Davidi, I., Trombetta, J.J., ... Regev, A. (2016). Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science*, 353 (6302), 925-928.
- Hachem, D.L., Mothe, J.A., y Tator, H.C. (2019). Unlocking the Paradoxical Endogenous Stem Cell Response after Spinal Cord Injury. *Stem Cells*, 38(2),187-194.
- Haines, D., y Mihailoff, A.G. (2019). *Principios de neurociencia* (5ªed.) Barcelona: Elsevier.
- Hamilton, T., Glass, E., Drobotz, K., y Agnello, K.A. (2014). Severity of spinal cord dysfunction and pain associated with hydrated nucleus pulposus extrusion in dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 27(4), 313-8.
- Hayta, E., y Elden, H. (2017). Acute spinal cord injury: a review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 87, 25-31.

- Hernández, M., y Katrib, R. (2008). Clasificación de fracturas. En E.C. Santoscoy Mejía (ed.), *Ortopedia, neurología y rehabilitación en pequeñas especies: perros y gatos* (pp. 19-21). México: Manual moderno.
- Hilton, J.B., Moulson, A.J., y Tetzlaff, W. (2016). Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods. *Neuroscience Letters*, 652, 3-10.
- Jeffery, N.D., Barker, A.K., Hu, H.Z., Alcott, C.K., Kraus, K.H., Scanlin, E.M., ...Levine, J.M. (2016). Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248 (4), 386- 394.
- Jeffery, N.D., Levine, J.M., Olby, N.J., y Stein, V.M. (2013). Intervertebral Disk Degeneration in Dogs: Consequences Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27,1318–133.
- Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., ... Park, H.M. (2009). A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 285(1-2), 67-77
- Kempermann, G. (2016). Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(2), a018986.
- Khan, I.U., Yoon, Y., Cho, i K..U, Jo, K.R., Kim, N., Lee, E., ... Kweon, O.K. Therapeutic Effects of Intravenous Injection of Fresh and Frozen Thawed HO-1-Overexpressed Ad-MSCs in Dogs with Acute Spinal Cord Injury. *Stem Cells International*, 2019:8537541. doi: 10.1155/2019/8537541.
- Khan, S., Mafi, P., y Mafi, R.W.S. (2017). A systematic review of mesenchymal stem cells in spinal cord injury, intervertebral disc repair and spinal fusión. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(4), 316-323.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., ... Schöler, H.R. (2009). Oct4- induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136, 411-419.
- Kim, Y., Jo, S. H., Kim, W. H., y Kweon, O. K. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 6, 229.
- Kim, Y., Lee, S. H., Kim, W. H., y Kweon, O. K. (2016). Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 17(1), 123–126.

- Konig, H.E., y Liebich, H.G. (2008). *Anatomía de los animales domésticos* (2ª ed.) Madrid: Panamericana.
- Lim, J.H., Byeon, Y.E., Ryu, H.H., Jeong, Y.H., Lee, Y.W., Kim, W.H., ... Kweon, O.K. (2007). Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *Journal of Veterinary Science*, (3), 275-82.
- López, T., Motta, Y., Obando, E., Solarte, C., y Valencia, A. (2016). Reporte de caso: efecto de la fisioterapia en un paciente canino mestizo con paraparesia por fractura de vértebra torácica 11 en Florencia, Caquetá. *REDVET*, 17(1), 1-11.
- Lorenz, D.M., Coates, J., y Kent, M. (2010). *Handbook of Veterinary Neurology* (5ª ed.). St. Louis: Elsevier.
- Luo, L., Hu, D.H., Yin, J.Q., y Xu, R.X. (2018). Molecular Mechanisms of Transdifferentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Neural Cells: Current Status and Perspectives. *Stem Cells International*, 2018, 5630802.
- Mancini, J., Milh, M., y Chabrol, B. (2015). Desarrollo neurológico. *EMC Pediatría*, 50(2), 1-11.
- Mari, L., Behr, S., Shea, A., Dominguez, E., Johnson, P.J., Ekiri, A., y De Risio, L. (2017). Outcome comparison in dogs with a presumptive diagnosis of thoracolumbar fibrocartilaginous embolic myelopathy and acute non-compressive nucleus pulposus extrusion. *Veterinary Record*, 181(11), 293.
- McCartney, W., Ober, C.A., y Beniro, M. (2011). Comparative analysis of outcomes and side effects in chondrodystrophic dogs treated with preoperative methylprednisolone versus non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Research Square*. Publicación anticipada en línea. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-265648/v1>.
- McMahil, B.C., Borjesson, D.L., Sieber-Blum, M., Nolta, J., y Sturges, B.K. (2015). Stem Cells in Canine Spinal Cord Injury – Promise for Regenerative Therapy in a Large Animal Model of Human Disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(1), 180-93.
- Mondino, A., Piaggio, J., Loureiro, C., Vasconcellos, R., y Delucchi, L. (2015). Efecto de la raza, sexo y edad en la presentación de enfermedades del sistema nervioso central en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 51(199), 4.

- Moore, S. A., Tipold, A., Olby, N. J., Stein, V., Granger, N., y Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT SCI). (2020). Current Approaches to the Management of Acute Thoracolumbar Disc Extrusion in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 610.
- Morgan, J.P. (2010). Radiología de los traumatismos musculoesqueléticos y casos de urgencia. En: J.P. Morgan, *Atlas de radiología Traumatismos en el perro y en el gato* (pp. 274-282). Zaragoza: Servet.
- Nykamp, S. (2017). Advanced imaging: Spinal surgery. En A. Shores y B.A. Brisson (Ed.), *Current Techniques in Canine and Feline Neurosurgery* (pp. 71-77). Hoboken: John Wiley.
- O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., y Brodbelt, D.C. (2013). Longevity and mortality of owned dogs in England. *Veterinary Journal*, 198, 638–643.
- Olby, N., Levine, J., Harris, T., Muñana, K., Skeen, T., y Sharp, N. (2003). Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(6), 762-9.
- Olby, N. (2010). The Pathogenesis and Treatment of Acute Spinal Cord Injuries in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(5), 791–807.
- Orechio, D., Andrade, B., Diniz, G., Bittencourt, J., Haemmerle, C.A., Watanabe, I.S., Miglino, M.A., y Castelucci, P. (2018). Morphological and cellular characterization of the fetal canine (*Canis lupus familiaris*) subventricular zone, rostral migratory stream and olfactory bulb. *Anatomical Record*, 301(9), 1570-1584.
- Pachtinger, G. (2013). Monitoring of the Emergent Small Animal Patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(4), 705-20.
- Park, S.S., Lee, Y. J., Lee, S. H., Lee, D., Choi, K., Kim, W.H., y Han, H. J. (2012). Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy*, 14(5), 584–597.
- Pellegrino, F.C. (2014). *Las claves del diagnóstico neurológico para el veterinario clínico*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Pellegrino, F.C. (2011). Caracterización de los trastornos neurológicos en los perros: 1652 casos (marzo 2008-junio 2010). Parte I. *Revista de la Asociación Argentina de Neurología Veterinaria*, 1(2), 78-96.

- Penha, E. M., Meira, C. S., Guimarães, E. T., Mendonça, M. V., Gravelly, F. A., Pinheiro, C. M., ... Soares, M. B. (2014). Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells International*, 2014, 437521.
- Pilco, M.P., Hinostroza, E.M., y Serrano-Martínez, E. (2017). Physiotherapeutic Treatment in Domestic Dogs with Lameness of the Hind Limbs. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 784-793.
- Prado, C., Fratini, P., de Sá Schiavo, M.G., Bocabello, R.Z., Monteiro, J., Dos Santos, C.J., ... Miglino, M.A. (2019). Combination of stem cells from deciduous teeth and electroacupuncture for therapy in dogs with chronic spinal cord injury: A pilot study. *Research in Veterinary Science*, 123, 247-251.
- Purves, D., Cabeza, R., Huettel, A.S., LaBar, S.K., Platt, L.M., y Woldorff, G.M. (2008). *Principles of Cognitive neuroscience* (2ª ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
- Redondo-Castro, E. y Navarro, X. (2014). Chronic ibuprofen administration reduces neuropathic pain but does not exert neuroprotection after spinal cord injury in adult rats. *Experimental Neurology*, 254, 95- 103.
- Robbins., Cotran., Kumar, V., Abbas, A.K, Fausto, N., y Aster, J.C. (2010). *Patología estructural y funcional* (8ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Rubio, M.R., y Boggio, J.C. (2005). *Farmacología Veterinaria*. Córdoba: Universidad Católica de Córdoba.
- Rust, R., y Kaiser, J. (2017). Insights into the Dual Role of Inflammation after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 37(18), 4658–4660.
- Sánchez-Masian, D., Beltrán, E., Mascort, J., y Luján-Feliu-Pascual, A. (2012). Enfermedad discal intervertebral (I): anatomía, fisiopatología y signos clínicos. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 32, 7-12.
- Sanes, D., Reh, T., y Harris, W. (2012). *Development of the nervous system* (3ª ed.). Londres: Elsevier.
- Santoscoy, C.E. (2008). *Ortopedia, neurología y rehabilitación en pequeñas especies: perros y gatos*. México: Manual moderno.
- Sharun, K., Rawat, T., Kumar, R., Chandra, V., Saxena, A. C., Pawde, A. M., ... Sharma, G. T. (2020). Clinical evaluation following the percutaneous transplantation of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells (aBM-MS) in dogs affected by vertebral compression fracture. *Veterinary and Animal Science*, 10, 100152.

- Shores, A. (2017). Thoracolumbar Hemilaminectomy. En A. Shores y B.A. Brisson (Ed.), *Current Techniques in Canine and Feline Neurosurgery* (pp. 179 -182). Hoboken: John Wiley.
- Smolders, L., Bergknut, N., Grinwis, G., Hagman, R., Lagerstedt, A.F., Hazewinkel, H., y Tryfonidou, M. (2013). Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: Chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. *Veterinary Journal*, 195(3), 292-9.
- Spitzbarth, I., Moore, S. A., Stein, V. M., Levine, J. M., Kühl, B., Gerhauser, I., ... Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI) (2020). Current Insights Into the Pathology of Canine Intervertebral Disc Extrusion-Induced Spinal Cord Injury. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 595796
- Steffen, F., Bertolo, A., Affentranger, R., Ferguson, S.J. y Stoyanov, J. (2019). Treatment of Naturally Degenerated Canine Lumbosacral Intervertebral Discs with Autologous Mesenchymal Stromal Cells and Collagen Microcarriers: A Prospective Clinical Study. *Cell transplantation*, 28(2), 201-211.
- Šulla. I., Balik. V., Horňák. S., y Ledecký, V. (2018). Spinal cord injuries in dogs part I: a review of basic knowledge. *Folia Veterinaria*, 62, 35-44.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 1-12.
- Talavera, J., Gil-Chinchilla, J.I., Gracia, D., Castellanos, G., López- Lucas, M.D., Atucha, N.M., y Moraleda, J.M. (2017). Terapia con células madre en medicina veterinaria: conceptos generales y evidencias clínicas. *Revista AVEPA*, 37 (2), 87- 101.
- Tator, C.H., Fehlings, M., Thorpe, K., Math, M., y Taylor, W. (1999). Current use and timing of spinal surgery for management of acute spinal cord injury in North America: results of a retrospective multicenter study. *Journal of Neurosurgery*, 91,12-18.
- Thomson, C., y Hahn, C. (2012). *Veterinary neuroanatomy*. Edinburgo: Sanders Elsevier.
- Uemura, E.E. (2015). *Fundamentals of canine neuroanatomy and neurophysiology*. Ames: John Wiley.
- Velayos, J.L., y Diéguez, G. (2015). *Anatomía y fisiología del sistema nervioso central*. Madrid: CEU.

- Vikartovska, Z., Kuricova, M., Farbakova, J., Liptak, T., Mudronova, D., Humenik, F., ... Cizkova, D. (2020). Stem Cell Conditioned Medium Treatment for Canine Spinal Cord Injury: Pilot Feasibility Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5129
- Vilche, M.A. (2016). *Relevamiento radiográfico y revisión bibliográfica de patologías óseas en caninos* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
- Wang, X., Budel, S., Baughman, K., Gould, G., Song, K.H., y Strittmatter S.M. (2009). Ibuprofen Enhances Recovery from Spinal Cord Injury by Limiting Tissue Loss and Stimulating Axonal Growth. *Journal of Neurotrauma*, (26), 81–95.
- Wang-Leandro, A., Hobert, M.K., Alisauskaite, N., Dziallas, P., Rohn, K., Stein, V.M., y Tipold, A. (2017). Spontaneous acute and chronic spinal cord injuries in paraplegic dogs: a comparative study of in vivo difusión tensor imaging. *International Spinal Cord Society*, 55, 1108–1116.
- Webb, A., Ngan, S., y Fowler, D. (2010). *Spinal cord injury II: Prognostic indicators, standards of care, and clinical trials*. *Canadian Veterinary Journal*, 51, 598–604.
- Wu, G.H., Shi, H.J., Che, M.T., Huang, M.Y., Wei, Q.S., Feng, B., ... Zeng, Y.S. (2018). Recovery of paralyzed limb motor function in canine with complete spinal cord injury following implantation of MSC-derived neural network tissue. *Biomaterials*, 181, 15-34.
- Wu, H.G., Shi, H.J., Che, T.M., Huang, Y.M., Wei, Q.S., Feng, B., ... Zeng, Y.S. (2018). Recovery of paralyzed limb motor function in canine with complete spinal cord injury following implantation of MSC-derived neural network tissue. *Biomaterials*, 181, 15-34.
- Yaneselli, K. (2015). *Caracterización de las células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes* (Tesis de maestría). Fvet- Udelar, Montevideo.
- Yaneselli, K., Campbell, V., Algorta, A., Bonfiglio, C., Mirazo, J., Fernández, S., ... Maisonnave, J. (2018). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 54(209), 14-19.
- Zafra, F., y Giménez, C. (2008). Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life*, 60(12), 810-7.