



---

**Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

SERVICIO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA DEL HOSPITAL  
CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE  
LA FACULTAD DE MEDICINA



TESIS CON MENCIÓN DE “DOCTOR INTERNACIONAL”

REGENERACIÓN DE LAS LESIONES  
CRÍTICAS DEL NERVIJO PERIFÉRICO CON  
FACTORES DE CRECIMIENTO. ESTUDIO  
EXPERIMENTAL

BELÉN GARCÍA MEDRANO

VALLADOLID. 2013





**Universidad de Valladolid** .....

Impreso 2T

### **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

D. Miguel Ángel Martín Ferrero, con D.N.I. nº 12216496-T, profesor del departamento de Cirugía , en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, como Director de la Tesis Doctoral titulada REGENERACIÓN DE LAS LESIONES CRÍTICAS DEL NERVIJO PERIFÉRICO CON FACTORES DE CRECIMIENTO. ESTUDIO EXPERIMENTAL, presentada por D<sup>a</sup>. Belén García Medrano, vinculada al programa de Investigación básica y clínica en pediatría, inmunología, obstetricia-ginecología y nutrición-bromatología, impartido por el departamento de Biología celular, Histología y Farmacología, autoriza la presentación de la misma, considerando que reúne las condiciones necesarias para su lectura y defensa, y para optar al título de doctor internacional.

Valladolid, 09 de Septiembre de 2013.

El Director de la Tesis,

Fdo.: Miguel Ángel Martín Ferrero

. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO





**Universidad de Valladolid**

Impreso 2T

### **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

D. Manuel José Gayoso Rodríguez, con D.N.I. nº 51437450-C, profesor del departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, como Director de la Tesis Doctoral titulada **REGENERACIÓN DE LAS LESIONES CRÍTICAS DEL NERVIIO PERIFÉRICO CON FACTORES DE CRECIMIENTO. ESTUDIO EXPERIMENTAL**, presentada por D<sup>a</sup>. Belén García Medrano, vinculada al programa de Investigación básica y clínica en pediatría, inmunología, obstetricia-ginecología y nutrición-bromatología, impartido por el departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, autoriza la presentación de la misma, considerando que reúne las condiciones necesarias para su lectura y defensa, y para optar al título de doctor internacional.

Valladolid, 09 de Septiembre de 2013.

El Director de la Tesis,

Fdo.: Manuel José Gayoso Rodríguez.

. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



**PARA DANIEL,**



**“IN SPITE OF AN ENORMOUS AMOUNT OF NEW EXPERIMENTAL  
LABORATORY DATA BASED ON EVOLVING NEUROSCIENTIFIC CONCEPTS  
DURING THE LAST 25 YEARS, PERIPHERAL NERVE INJURIES STILL BELONG  
TO THE MOST CHALLENGING AND DIFFICULT SURGICAL RECONSTRUCTIVE  
PROBLEMS.”**

(LUNDBORG G, 2000)



TO SEE THE WORLD IN A GRAIN OF SAND  
AND A HEAVEN IN A WILDFLOWER  
HOLD INFINITY IN THE PALM OF YOUR HAND  
AND ETERNITY IN AN HOUR

(JOHN DONNE)



## ***AGRADECIMIENTOS***

---



La realización de este trabajo de investigación surgió al poco de iniciar mi residencia en Cirugía Ortopédica y Traumatología; una propuesta lanzada por el Dr. Martín Ferrero, quien se ha convertido no sólo en uno de mis dos directores de tesis, sino también en un impulsor diario de mi trabajo. Es a él a quien dedico mi primer agradecimiento, por el apoyo que recibo para lanzarme a nuevos retos formativos y sobre todo, quirúrgicos.

A la cabeza de este texto, también se encuentra mi segundo director de tesis, el Prof. Gayoso, que no sólo guió mis inicios en la histología durante mi paso por la Facultad de Medicina, sino que ahora ha participado activamente en el análisis de los resultados de este trabajo, en nuestras tardes al microscopio.

En tercer lugar, debo agradecer al Dr. Imaz, como jefe del servicio al que pertenezco y donde quisiera continuar mi trayectoria como especialista, el apoyo recibido para el desarrollo de mi actividad investigadora.

A mi lado, especialmente al inicio de estos años en el laboratorio, ha estado la Dra. Barrio, mi R4 para siempre, a la que debo lo más difícil de todo este proceso, que es dar los primeros pasos para iniciar la experimentación, el proyecto y su desarrollo. Mi deseo es que pronto ella también pueda depositar su texto y me permita ayudarle, si es que algo de lo aprendido últimamente, le sirve para avanzar.

Aunque el desarrollo de la investigación ha transcurrido en horario extra-laboral, su influencia en determinados momentos ha sido evidente para todos mis compañeros del servicio, a quienes, uno a uno, dedico también mi trabajo; especial mención debo hacer a mis residentes, pequeños y mayores, por su comprensión y apoyo. Quiero destacar de entre todos los traumas a mi “coR”, María, con quien comparto todas mis necesidades y deseos, más que nada, porque suelen ser los mismos.

Quiero nombrar a todos aquellos que han participado en este proyecto: debo dar las gracias a los técnicos del departamento de Biología Celular, especialmente a Luis, que me acompañó cada día con los animales; a Ángel José Álvarez Barcía, veterinario de la Facultad de Medicina y secretario del Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid; a los cuidadores del animalario, por atenderme a pesar de ir siempre fuera de horario.

Especial mención quisiera reflejar sobre el soporte económico que ha permitido la realización de este trabajo, por parte de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología, que dotó a nuestro proyecto de una beca de investigación de la Fundación SECOT; y la Consejería del Sacyl, que nos proporcionó la segunda ayuda. En relación a estas becas, quiero también nombrar a la Dra. Simón y al Dr. León, así como al Prof. Garrosa, que participan en este proyecto.

En la recta final de mi investigación, he conectado con una figura que, por encima del gran curriculum que le avala, es una persona generosa, que ha compartido conmigo su experiencia y su conocimiento, aceptando a la vez formar parte de mi tribunal. Lars Dahlin y el departamento de Cirugía de la Mano del Skåne Hospital de Malmö, Suecia, representan un ejemplo a seguir en metodología y práctica clínica, y han impreso su sello en mi trayectoria profesional. Tack för välkomna mig in i din lägenhet och ta hand om under min vistelse i Malmö.

Por encima de todo lo anterior, y como motor fundamental de cada una de las actividades de mi vida diaria, se encuentra mi familia. Ellos son los que han marcado los valores por los que intento regir mi presente y mi futuro, a los que debo la posibilidad de haber llegado hasta aquí y por los que procuro exigirme más cada día, para poder devolverles algo de todo lo que me dan: mis padres, Male y Jose, mis hermanos, Paola y Marco, Elena, José Luis y Jaime, los abuelos, tíos y primos. Sin olvidar a Sara, Fátima y Ana.

Y por soportar mi ausencia, acompañarme en ella... porque estoy convencida de que sí merece la pena devolverte todo el tiempo que te resto...este trabajo está dedicado a Daniel Almudí.

## *ÍNDICE*

---



<b><u>RESUMEN</u></b>	<b>27</b>
- RESUMEN DEL TRABAJO	27
- ABSTRACT (English)	35
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>43</b>
<b>1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>47</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA</b>	<b>51</b>
<b>3.- ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO</b>	<b>53</b>
- ANATOMÍA DEL NERVI CIÁTICO EN EL HOMBRE	54
- ANATOMÍA DEL NERVI CIÁTICO DE LA RATA	55
<b>4.- HISTOLOGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO</b>	<b>58</b>
- TEJIDO NERVIOSO	58
- MORFOLOGÍA DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS	59
1. Fascículos	60
2. Cubiertas de los nervios periféricos	61
3. Epineuro	62
4. Perineuro	64
5. Endoneuro	66
6. Vascularización	67
7. Nervi-nervorum	69
- MIELINIZACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO	70
- POTENCIAL DE ACCIÓN	72

- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE FIBRAS NERVIOSAS	74
- ESTUDIO POR ANÁLISIS DE IMAGEN DE FIBRAS NERVIOSAS	76
<b>5.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN NERVIOSA</b>	<b>78</b>
- CAMBIOS PROXIMALES A LA LESIÓN	78
- CAMBIOS EN EL FOCO DE LA LESIÓN	78
- CAMBIOS DISTALES A LA LESIÓN	79
- HISTOLOGÍA DE LA DEGENERACIÓN WALLERINA	80
- HISTOLOGÍA DEL PROCESO DE REGENERACIÓN DEL NERVIOPERIFÉRICO	82
1. La importancia del muñón distal	85
2. El papel de la lámina basal	87
<b>6.- ALTERACIONES NEUROBIOLÓGICAS INDUCIDAS POR LA LESIÓN.</b>	<b>89</b>
<b>7.- ETIOPATOGENIA DE LA LESIÓN NERVIOSA</b>	<b>94</b>
- MECANISMOS DE LESIÓN	95
1. Sección	95
2. Lesiones (neuromas) en continuidad	96
3. Estiramiento, tracción y contusión	100
4. Heridas de bala	103
5. Isquemia	104
6. Compresión	105
7. Síndrome compartimental	107
8. Lesión eléctrica	109
9. Lesión térmica	109
10. Inyección	111
a. Patogenia	111
b. Características clínicas	112
c. Puntos de inyección	113
d. Manejo	114
11. Irradiación	115
12. Lesión iatrogénica	115
a. Diagnóstico	116
b. Manejo	116

<b>8.- CLASIFICACIÓN</b>	<b>118</b>
<b>9.- TRATAMIENTO INICIAL DE LAS LESIONES NERVIOSAS</b>	<b>122</b>
- CIRUGÍA DE LAS LESIONES NERVIOSAS	123
1. Cronología	124
2. Instrumental y equipo	125
3. Anestesia	125
4. Preparación del campo	126
- TÉCNICAS DE REPARACIÓN NERVIOSA	127
1. Sutura término-terminal	128
a. Sutura epineural	129
b. Sutura perineural	130
2. Injertos nerviosos autólogos	131
3. Aloinjertos	134
4. Conductos biológicos	134
5. Reparaciones en tubo de silicona	135
6. Transferencias nerviosas	136
7. Neuroma en continuidad (neurolisis)	136
8. Transferencias tendinosas	137
<b>10.- REHABILITACIÓN POSTOPERATORIA</b>	<b>139</b>
<b>11.- EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO: LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>141</b>
<b>12.- IGF-1</b>	<b>159</b>
- SÍNTESIS Y CIRCULACIÓN	159
- MECANISMO DE ACCIÓN	160
- RECEPTORES	161
- CONTRIBUCIÓN AL ENVEJECIMIENTO	161
- FACTORES QUE INFLUYEN LOS NIVELES EN CIRCULACIÓN	162
1. Modelo 3D del IGF-1	162
2. Enfermedades de deficiencia y resistencia	162

- UTILIDADES CLÍNICAS COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA	163
- COMO AGENTE TERAPÉUTICO	164
- MECASERMIN	166
1. Farmacocinética	166
2. Efectos adversos	166
3. Farmacodinamia	167
- IGF-1 EN LA REGENERACIÓN NERVIOSA	168
<b><u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u></b>	<b>171</b>
- HIPÓTESIS NULA	173
- HIPÓTESIS ALTERNATIVA	173
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>175</b>
- OBJETIVO PRINCIPAL y OBJETIVOS SECUNDARIOS	175
- MAIN OBJECTIVE and SECONDARY OBJECTIVES (English)	179
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>183</b>
<b>1.- TIPO DE ENSAYO</b>	<b>187</b>
<b>2.- ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>193</b>
<b>3.- ESTABULARIO Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO</b>	<b>195</b>
<b>4.- INSTALACIONES</b>	<b>196</b>
- QUIRÓFANO EXPERIMENTAL	196

- LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA	196
- MATERIAL QUIRÚRGICO	197
1. Instrumental macroquirúrgico	197
2. Material de microcirugía	198
3. IGF-1	200
4. Material complementario	200
<b>5.- PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b>	<b>204</b>
<b>6.- DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>214</b>
<b>7.- DISEÑO DEL DEFECTO NERVIOSO</b>	<b>215</b>
<b>8.- OBTENCIÓN DE INJERTOS MUSCULARES</b>	<b>216</b>
<b>9.- MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DESCELULARIZACIÓN</b>	<b>217</b>
<b>10.- CUIDADOS PERIOPERATORIOS</b>	<b>218</b>
- ANESTESIA DE LOS ANIMALES	218
- COLOCACIÓN DEL ANIMAL	219
- ASEPSIA	219
<b>11.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO</b>	<b>220</b>
<b>12.- CUIDADOS POSTOPERATORIOS</b>	<b>223</b>
<b>13.- MÉTODO DE ESTUDIO FUNCIONAL</b>	<b>225</b>
<b>14.- CRONOLOGÍA</b>	<b>229</b>
<b>15.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES</b>	<b>230</b>
<b>16.- EXTRACCIÓN Y TALLAJE DE LAS PIEZAS</b>	<b>232</b>

<b>17.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE NERVIOS CIÁTICOS. ESTUDIO HISTOLÓGICO A MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL Y ELECTRÓNICO</b>	<b>235,239</b>
- PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN	235,239
- PROCEDIMIENTO DE INCLUSIÓN	236,240
- PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN	238,241
1. Hematoxilina eosina	238
2. Tricrómico de Masson	238
3. Azul de toluidina	239
<b>18.- CONTAJE DE AXONES</b>	<b>242</b>
<b>19.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</b>	<b>245</b>
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>247</b>
<b>1.- EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS ANIMALES</b>	<b>250</b>
- Pérdida de animales	250
- Peso	254
- Lateralidad	256
- Atrofia muscular	257
- Úlceras de decúbito	260
- Pérdidas digitales	263
<b>2.- ESTUDIO DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL</b>	<b>267</b>
- Deambulación	267
- Grasping test	273
- Índice Funcional Ciático	277

<b>3.- ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS PIEZAS</b>	<b>286</b>
- Disección	286
- Dimensiones	287
- Color	288
<b>4.- ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS CORTES</b>	<b>290</b>
- Descripción por cortes	290
- Descripción por tinciones	303
<b>5.- DATOS CUANTITATIVOS HISTOLÓGICOS</b>	<b>314</b>
- Número de axones	314
- Diámetro de los axones	324
- Espesor de la mielina	324
<b>6.- APORTACIÓN DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b>	<b>330</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>335</b>
<b>1.- JUSTIFICACIÓN DEL PLAN DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>339</b>
<b>2.- EVALUACIÓN POSTOPERATORIA DE LA REGENERACIÓN DESPUÉS DE LA LESIÓN DEL NERVIJO PERIFÉRICO</b>	<b>342</b>
<b>3.- RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOCOMOCIÓN</b>	<b>345</b>
<b>4.- HISTOMORFOMETRÍA: HALLAZGOS MICROSCÓPICOS</b>	<b>349</b>
<b>5.- FACTORES PRONÓSTICO EN LA REGENERACIÓN DEL NERVIJO PERIFÉRICO</b>	<b>356</b>
<b>6.- EL PAPEL DE LA LÁMINA BASAL</b>	<b>359</b>
<b>7.- LA VIDA MEDIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO IGF-1</b>	<b>360</b>
<b>8.- UTILIDAD PRÁCTICA DE NUESTROS RESULTADOS</b>	<b>366</b>
<b>9.- PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA</b>	<b>370</b>

<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>377</b>
- CONCLUSIONES	377
- CONCLUSIONS (English)	383
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>389</b>
- BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN ALFABÉTICO	389
❖ ÍNDICE DE FIGURAS	427
❖ ÍNDICE DE TABLAS	433
❖ ABREVIATURAS Y SIGLAS	437

## *RESUMEN*

---



## INTRODUCCIÓN

El propósito de un injerto de nervio es sustituir un defecto para que el máximo número de fibras nerviosas regeneradas alcance sus órganos diana. *Millesi et al., 1972*, obtuvieron resultados exitosos utilizando autoinjertos de nervio safeno, técnica que se convirtió en el *gold standard*, pero la disponibilidad limitada de tejido nervioso, la recuperación funcional incompleta obtenida y los problemas con el nervio donante, han motivado la búsqueda de otras alternativas.

*Keynes et al., 1984*, descubrieron que la membrana basal de las células musculares era útil como un camino para el paso de la regeneración de los axones a través de la lámina basal. *Glasby et al., 1986*, obtuvieron una medida útil de los axones a través de canales de endomisio, por su similitud con los del endoneuro. *Pereira et al., 1990*, comenzaron sus estudios en la desnaturalización muscular como injerto de lesiones granulomatosas micobacterias de nervios periféricos por la lepra. *Brunelli, Battiston et al., 1993*, desarrollaron un estudio experimental en ratas con injerto de vena rellena de músculo esquelético fresco, con los mismos resultados que los injertos de nervio tradicionales. *DeFranzo et al., 1994*, examinaron el uso de músculo congelado y descongelado como injerto de nervio en ratas, con el análisis histológico de la densidad de axones y la mielinización. *Whitworth et al., 1995*, incorporan un depósito de células de Schwann y otros componentes esenciales en un conducto del nervio, con un marcado efecto sobre la regeneración axonal. *Martín Ferrero et al., 1996*, utilizaron la liofilización del músculo esquelético desnaturalizado, para el paso de los axones al segmento distal superior al 60 % en nervios oligofasciculares, y más del 45 % en los polifasciculares. *Battiston et al., 2000 y 2005*, describieron cómo las fibras musculares representan un buen apoyo para el avance de los brotes a través de las moléculas de adhesión presentes en la lámina basal de las fibras musculares, y aumentan la extensión de las neuritas. *Lundborg, Dahlin et al., 2001*, demostraron que los axones y las células de Schwann crecían más rápidamente en los injertos musculares químicamente descelerizados que en tras el proceso de congelación - descongelación utilizado para la desnaturalización.

Otras sustancias que podrían promover la regeneración del tejido nervioso, serían los factores de crecimiento neurogénico (NGF), epidérmico (EGF) o derivado de las plaquetas (PDGF). *Yu et al., 2009*, examinaron el efecto histológico de NGF,

revelando un diámetro axonal, número total y grosor de la mielina mejor con NGF que en los nervios reparados con injerto acelular solo y con sellador de fibrina.

El objetivo de nuestro estudio es descubrir el mejor método de lograr injertos acelulares de músculo, tratando de descubrir si el uso de factores de crecimiento (IGF-1) mejora la regeneración axonal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio es un ensayo clínico controlado, nivel I de evidencia científica. Fueron seleccionadas 20 ratas Wistar machos, con un peso medio de 278 g. Se creó un defecto severo de 15 mm en los nervios ciáticos, tratando de puentearlo con un injerto de músculo, en los 10 primeros controles. Los otros 10 animales completaron el protocolo, incluyendo factores de crecimiento dentro de sus injertos. Los injertos se obtuvieron a partir del músculo glúteo medio de dos ratas donantes.

El protocolo de extracción químicamente celular consistió en 7h en agua destilada cambiada tres veces cada 2 - 3h, una noche en detergente Tritón, y 24h en desoxicolato (*Baptista et al., 2009*).

Después de la anestesia preoperatoria intraperitoneal, y por abordaje posterolateral, se expuso el nervio ciático. Localizado su tronco, se secciona para generar un defecto de 15 mm, cubriendo el defecto con el bloque acelular de músculo, suturándolo epimisio - epinerio con polipropileno 7 / 0 en cada extremo. Dentro del injerto, se inyectaron 2 ml de Increlex<sup>®</sup> (10 mg / ml mecasemina), aportando factores IGF-1. Las suturas se cierran con fibrina (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter, Valencia, España).

La recuperación de la función motora se analizó mediante el patrón de la marcha y el Índice Funcional Ciático (SFI). El valor 0 representa la función normal o la ausencia de la disfunción, y el valor de -100 representa la pérdida total de la función. El *Grasping Test* consiste en la elevación de la rata por la cola, lo que le obliga a agarrarse con las patas a la rejilla; podrán hacerlo si controlan la movilidad de las extremidades. Permite visualizar si falta algún dedo y si es capaz de extender las articulaciones.

Las ratas se sacrificaron a los 90-100 días postquirúrgicos, con pesos de 450-500g, disecando el segmento del nervio ciático que incluía el injerto muscular. Se

obtuvieron muestras para las preparaciones macro y microscópicas. Para completar este estudio, las piezas explantadas se tallaron y cortaron en 7 segmentos, todos diferentes entre sí en la sección transversal y tamaño, pero iguales en todos los animales; los pares para inclusión en resina (tinción con azul de toluidina) y los impares para inclusión en parafina y tinción con hematoxilina- eosina y tricrómico de Masson.

Para el estudio histomorfométrico, se contaron los axones mielinizados, evaluando su resultado en función de la localización del corte y el tratamiento elegido para cada animal. Los resultados fueron analizados estadísticamente. Se consideraron significativas las diferencias con un p-valor  $< 0,05$ .

## RESULTADOS

Los animales del grupo control presentaron 2 úlceras por presión y 3 ratas perdiendo parte de sus dedos, a diferencia de los animales con IGF-1, donde no se detectaron estos hallazgos. Existía contractura en flexión de los dedos del miembro afectado en el 80 % de los controles, y en el 45 % de los casos durante la realización del *Grasping Test*.

El SFI mostró el mismo patrón entre los diferentes grupos funcionales estudiados a lo largo del tiempo. Los valores de 0 a -20 en el período preoperatorio, reflejan una función normal en ambos grupos; los próximos a -100 de los días 7 -30 postquirúrgicos, mostraron una pérdida completa de la función, lo que indica una ausencia de inervación en este período. Aunque los valores fueron más satisfactorios a los 30 días en los casos, a los 60-90 días después de la cirugía, estos valores fueron mejorando, lo que refleja un retorno gradual de la función. En el día 90, los resultados se asemejan a los niveles normales, característico de la recuperación funcional posiblemente relacionadas con el pico de poliinervación en todos los animales, pero existe una diferencia estadísticamente significativa, a favor de los tratados con IGF-1.

Macroscópicamente, se observa una estructura de color amarillento o cordón tubular que cubre la brecha entre los dos puntos de sutura del injerto.

Microscópicamente, los cabos proximales aparecen como un nervio normal, con una distribución fascicular adecuada, regular y ordenada, perfectamente definida por sus tres envolturas, con poco tejido conectivo. En el injerto, el nervio regenerado utiliza el

músculo como puente, que es soportado para moverse distalmente, con numerosos fascículos nerviosos, pequeños, separados por tejido conectivo y abundantes vasos sanguíneos. Los axones siguen su lámina basal, definiendo pequeños fascículos con grandes vasos y tejido conectivo abundante.

En el cabo distal, no existe una clara división en fascículos. Hubo poco tejido conectivo entre las fibras pero el epineuro está bastante desarrollado. Las alteraciones pueden estar justificadas porque las fibras siguen un camino anárquico aún como corresponde a un nervio regenerado, cuyas fibras todavía están buscando su camino. Hay un mayor número de fibras mielinizadas con un diámetro más pequeño y morfología más irregular en el grupo sin tratamiento (media de los axones en el muñón distal de los animales con el IGF-1 es 62 % respecto del proximal, 56 % en los controles). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el espesor de la mielina a nivel del injerto y en el cabo distal, a favor de los casos tratados con IGF-1.

## DISCUSIÓN

Las lesiones de los nervios periféricos representan una causa importante de morbilidad y discapacidad en los pacientes afectados y generan altos costes económicos. Su reparación es un reto para la investigación actual, por la necesidad de descubrir técnicas económicas y biológicamente factibles, tras los conflictos generados por la clásica reparación con nervio autólogo.

Con este estudio, hemos tratado de avanzar en la búsqueda de formas diferentes de presentar el injerto muscular como un puente en defectos críticos de nervio, y las opciones de las que disponemos para enriquecerlo biológicamente, apoyando nuestro proyecto en los experimentos actuales con factores de crecimiento.

Según *Varejão et al., 2004*, el SFI representa el método más fiable de análisis de la recuperación funcional, que permite la integración entre los sistemas sensitivos y motores. Los resultados de las pruebas funcionales fueron positivos en ambos grupos de trabajo, aunque las diferencias más importantes aparecen a los 30 días de la cirugía en el tratamiento con IGF-1. Esa recuperación fue estadísticamente significativa hasta los 90 días, aunque los valores resultaron comparables al final del seguimiento.

En el análisis microscópico, los resultados informaron positivamente del IGF-1 como un promotor de la regeneración axonal, con la objetivación de mayor número de axones mielinizados por campo, una mayor densidad axonal y un diámetro más grande en el cabo distal. Estas diferencias no fueron significativas, pero sí lo fue el aumento del grosor de mielina a nivel del injerto y en el muñón distal, de los animales tratados con IGF-1.

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el músculo acelular que se empleó como injerto proporciona una herramienta útil para el avance de los axones en regeneración, tal vez debido a la proximidad estructural de la laminina de las vainas nerviosas. Los factores de crecimiento nos permiten demostrar que se han alcanzado resultados clínicos y funcionales más satisfactorios.

No sabemos cuál es la vida media del IGF-1 depositado localmente en el injerto muscular, en nuestro intento de sellarlo dentro del injerto con fibrina, colocada en los puntos de sutura. Tal vez impulse la regeneración en las primeras etapas, pero no sea suficiente para mantenerla a ese nivel durante más tiempo. Varios autores (*Rind et al., 2002; Rabinovsky et al., 2003; Apel et al., 2010*) han descrito la liberación pulsada o continua local de IGF-1 a través de bombas, con la potenciación de los resultados funcionales e histológicos analizados tras el sacrificio de los animales.

## CONCLUSIONES

El método biológico seleccionado para tratar químicamente el músculo esquelético, logra desarrollar injertos acelulares. Se alcanza con éxito la reparación de las lesiones críticas del nervio ciático en ratas, utilizando ese injerto de músculo descelularizado.

Existen diferencias significativas en la reparación de un defecto severo del nervio ciático de rata a través de un injerto de músculo estriado alogénico acelular, enriquecido con factores de crecimiento IGF-1. La evolución de las lesiones del nervio ciático tratadas con y sin la adición de un concentrado de IGF-1, apoya el papel del factor de crecimiento como promotor de la regeneración nerviosa. El estudio funcional e histológica de los nervios tratados confirma el éxito de la técnica evaluada.



## *ABSTRACT*

---



## INTRODUCTION

The purpose of a nerve graft procedure is to substitute a defect in a severed nerve trunk to allow regeneration of a maximal number of regenerated nerve fibers to their target organs. *Millesi et al., 1972*, obtained successful results by using autografts of the sural nerve, a technique that became the *gold standard*, but the limited availability of nerve tissue, the incomplete obtained functional recovery and problems with the donor, have motivated the search of other alternatives.

A large number of studies have been undertaken to develop alternatives and to improve results. *Keynes et al., 1984*, discovered that the basement membrane of the muscle cells was useful as a way for the growth of regenerating axons, through the basal lamina. *Glasby et al., 1986*, obtained a useful step of axons through endomysium channels, as they are similar to those of endoneurium. *Pereira et al., 1990*, began their studies on denatured muscle graft substitute for mycobacterial granulomatous lesions in peripheral nerves of leprosy. *Brunelli, Battiston et al., 1993*, developed an experimental model in rats with a vein graft filled with fresh skeletal muscle, leading to similar results as the traditional nerve grafts. *DeFranzo et al., 1994*, examined the use of freeze-thawed muscle and nerve graft in rats, analyzing histologically the density of axons and myelination. *Whitworth et al., 1995*, incorporated a deposit of Schwann cells and other essential components in a nerve conduit, with a marked positive effect on axonal regeneration. *Martín Ferrero et al., 1996*, used freeze dried denatured skeletal muscle, with passage of axons to the distal segment in more than 60% of oligofascicular and more than 45% in the polyfascicular nerve. *Battiston et al., 2000* and *2005*, described how the muscle fibers represents a good support for advancing axons through adhesion molecules present in the basal lamina of muscle fibers increasing neurite extension. *Lundborg, Dahlin et al., 2001*, demonstrated that axons and Schwann cells grew more rapidly in the chemically acellular muscle grafts than in freezing-thawing used for denaturation.

Other substances could promote regeneration of nerve tissue, such as nerve growth factor (NGF), epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factors (PDGF). *Yu et al., 2009*, looked at the histological effect of NGF treated acellular grafts, revealing an axonal diameter, total number and thickness of myelin better after

NGF treatment than in nerves repaired with acellular grafts alone and acellular grafts with fibrin sealant.

The aim of our study is to discover the best method of muscle grafts denaturation, trying to understand whether the use of an added growth factor (IGF-1) improves axonal regeneration.

## MATERIAL AND METHODS

This study is a controlled experimental study, level I evidence. In twenty male Wistar rats (average weight 278 g), a critical defect of 15 mm was created in the sciatic nerve, which was bridged by an acellular muscle graft. In 10 of the animals the entire protocol was used but also, adding growth factors to their grafts. All muscle grafts were obtained from the gluteus medius muscle of two donor rats.

The chemically cellular extraction protocol consisted of 7h in distilled water changed three times every 2-3h, one night in Triton detergent, and 24h in deoxycholate (*Baptista et al., 2009*).

After intraperitoneal preoperative anesthesia, and by posterolateral approach, the sciatic nerve was exposed. After location of the trunk, the nerve was transected generating a 15 mm defect. An acellular muscle block was added, where the epimysium-epineurium were sutured with polypropylene 7/0 at each end. Within half of the grafts, we injected 2 ml of Increlex<sup>®</sup> (10 mg/ml mecasermin), thereby providing the IGF-1 factors. Sutures were sealed with fibrin (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter, Valencia, Spain).

Recovery of motor function was analyzed using the *gait pattern* and the *Sciatic Functional Index (SFI)*. The value 0 represents normal function or absence of dysfunction, and value -100, the total loss of function. The *Grasping Test* consists of raising the rat from the tail, allowing it to grip with its legs to the grid, in order to control the motility of the limbs. It allows visualize if missing any finger and if it is able to stretch its joints.

Rats were sacrificed at 90-100 days post-surgery (body-weight of 450-500g), and the segment of the sciatic nerve including the muscle graft was dissected. Samples were obtained for macro and microscopic preparations. The explanted pieces of sciatic

nerve with grafts were carved and cut into seven pieces equally in all animals; pieces were processed in resin (toluidine blue staining) and also for paraffin embedding: hematoxylin-eosin and Masson trichrome.

For the histomorphometric study, myelinated axons were counted in crosssections. Results were analyzed statistically. The differences with p-value <0.05 were considered significant.

## RESULTS

Animals of the control group developed two ulcers by pressure and lost fingers were seen in three rats, unlike the animals with IGF-1, in which there were no signs of these findings. Digital flexion contracture in the affected limb was detected in 80% of controls, and in 45% of cases during the realization of *Grasping Test*.

SFI index showed the same pattern between different experimental groups studied over time. Values 0 to -20 in the preoperative period reflected a normal function in both groups; close to -100 at 7-30 days after surgery; thus, a complete loss of function, which indicated an absence of innervation in this period. From the 30th day these values were improving, reflecting a gradual recovery of function. On day 90 after surgery, results were close to normal levels, with a characteristic functional recovery possibly related to polyinnervation peak in all the animals. However. There was a statistically significant difference with a favorable development in IGF-1 cases.

Macroscopically, a bead yellowish or tubular structure filled the gap between the two sutures of the graft. Microscopically, proximal ends appeared as a normal nerve, with proper, regular and orderly fascicular distribution, perfectly defined by its three wraps, with little connective tissue. At the graft, regenerated axons used the muscle as a bridge, with many small nerve fascicles separated by host tissue and plenty of blood vessels. Axons followed their basal lamina, defining small fascicles with large vessels and abundant connective tissue.

At the distal end, there was no a clear division in fascicles. There was little connective tissue between the fibers and the epineurium was quite developed. The untidiness may be justified because the fibers are still looking for its way. There were a

short number of myelinated fibers with a smaller diameter and more irregular arrangements in the untreated group (mean of axons in the distal stump of the animals with IGF-1 is 62% of proximal number, 56% in controls). We found a statistically significant difference in myelin thickness at the graft and the distal stump between both groups.

## DISCUSSION

Peripheral nerve injuries represent one major cause of morbidity and disability in affected patients and generate high economic costs. Their repair is a challenge for current research, and by the need to discover economic and biologically feasible techniques. The results have to match the classical autologous nerve.

With this study, we have tried to advance in search of different ways to present the muscle graft as a bridge in the critically injured nerve, and the options available for us to enrich it biologically, supporting our project in the current experiments with growth factors.

According *Varejão et al., 2004*, SFI index represents the most reliable method of analysis of functional recovery, which allows integration between sensory and motor systems. The functional test results were positive in both experimental groups, although major differences appeared within 30 days of surgery in the group that was treated with IGF-1. That recovery was statistically significant until the 90<sup>th</sup> day, although values were not different at the end of the follow-up.

In the microscopic analysis, results tended to be positive for IGF-1 as a promoter of axonal regeneration, with higher number of myelinated axons by field, higher density of axons and larger diameter of the nerve at the distal end. The myelin thickness in the graft and in the distal stump in the IGF-1 animals were significantly increased.

From the analysis of the obtained results, we can say that the acellular muscle that we employed as a graft provides a bridge tool for the advancement of the regenerating axons, perhaps due to the structural proximity of laminin to nerve sheaths. With the use of growth factors we achieved more satisfactory clinical and functional results.

We don't know the half-life of IGF-1 locally deposited in the muscle graft, but our attempt was to seal the growth factor inside by using fibrin, which was placed at the suture levels. Perhaps we can boost the regeneration in the early stage, but it is insufficient to keep the boost at that level. Several authors, (*Rind et al., 2002; Rabinovsky et al., 2003; Apel et al., 2010*) have described pulsed or continuous local IGF-1 through pumps, with empowerment of the functional and histological findings after the sacrifice of the animals.

## CONCLUSIONS

The selected biological method for chemical treatment of skeletal muscle achieves acellular grafts. We successfully could repair a critical lesion of the sciatic nerve in rats using this acellular muscle graft.

There were significant differences in the repair of a critical defect of rat sciatic nerve by acellular allogeneic striated muscle graft enriched with growth factors IGF-1. The evolution of treatment of sciatic nerve injuries with and without the addition of a concentrate of IGF-1, supports the role of growth factors as a promoter of nerve regeneration. Functional and histological study of treated nerves confirms the success of the evaluated technique.



# *INTRODUCCIÓN*

---



## **1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: EPIDEMIOLOGÍA**

## **2.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA**

## **3.- ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO**

- ANATOMÍA DEL NERVI CIÁTICO EN EL HOMBRE
- ANATOMÍA DEL NERVI CIÁTICO DE LA RATA

## **4.- HISTOLOGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO**

- TEJIDO NERVIOSO
- MORFOLOGÍA DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS
  - 8. Fascículos
  - 9. Cubiertas de los nervios periféricos
  - 10. Epineuro
  - 11. Perineuro
  - 12. Endoneuro
  - 13. Vascularización
  - 14. Nervi-nervorum
- MIELINIZACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO
- POTENCIAL DE ACCIÓN
- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE FIBRAS NERVIOSAS
- ESTUDIO POR ANÁLISIS DE IMAGEN DE FIBRAS NERVIOSAS

## **5.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN NERVIOSA**

- CAMBIOS PROXIMALES A LACAMBIOS EN EL FOCO DE LA LESIÓN
- CAMBIOS DISTALES A LA LESIÓN
- HISTOLOGÍA DE LA DEGENERACIÓN WALLERINA
- HISTOLOGÍA DEL PROCESO DE REGENERACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO
  - 3. La importancia del muñón distal
  - 4. El papel de la lámina basal

## **6.- ALTERACIONES NEUROBIOLÓGICAS INDUCIDAS POR LA LESIÓN**

## **7.- ETIOPATOGENIA DE LA LESIÓN NERVIOSA**

- MECANISMOS DE LESIÓN
  - 13. Sección
  - 14. Lesiones (neuromas) en continuidad
  - 15. Estiramiento, tracción y contusión
  - 16. Heridas de bala
  - 17. Isquemia
  - 18. Compresión
  - 19. Síndrome compartimental
  - 20. Lesión eléctrica
  - 21. Lesión térmica
  - 22. Inyección
    - a. Patogenia
    - b. Características clínicas

- c. Puntos de inyección
- d. Manejo
- 23. Irradiación
- 24. Lesión iatrogénica
  - a. Diagnóstico
  - b. Manejo

## **8.- CLASIFICACIÓN**

### **9.- TRATAMIENTO INICIAL DE LAS LESIONES NERVIOSAS**

- CIRURÍA DE LAS LESIONES NERVIOSAS
  - 1.- Cronología
  - 2.-Instrumental y equipo
  - 3.-Anestesia
  - 4.-Preparación del campo
- TÉCNICAS DE REPARACIÓN NERVIOSA
  - 9. Sutura término-terminal
    - c. Sutura epineural
    - d. Sutura perineural
  - 10. Injertos nerviosos autólogos
  - 11. Aloinjertos
  - 12. Conductos biológicos
  - 13. Reparaciones en tubo de silicona
  - 14. Transferencias nerviosas
  - 15. Neuroma en continuidad (neurolysis)
  - 16. Transferencias tendinosas

### **10.- REHABILITACIÓN POSTOPERATORIA**

### **11.- EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO: LA INVESTIGACIÓN**

#### **12.- IGF-1**

- SÍNTESIS Y CIRCULACIÓN
- MECANISMO DE ACCIÓN
- RECEPTORES
- CONTRIBUCIÓN AL ENVEJECIMIENTO
- FACTORES QUE INFLUYEN LOS NIVELES EN CIRCULACIÓN
  - 3. Modelo 3D del IGF-1
  - 4. Enfermedades de deficiencia y resistencia
- UTILIDADES CLÍNICAS COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA
- COMO AGENTE TERAPÉUTICO
- MECASERMIN
  - 1. Farmacocinética
  - 2. Efectos adversos
  - 3. Farmacodinamia
- IGF-1 EN LA REGENERACIÓN NERVIOSA

## 1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

### EPIDEMIOLOGÍA

Las lesiones de los nervios periféricos representan una causa mayor de morbilidad y discapacidad en los pacientes afectos y generan altos costes económicos en una perspectiva global (*Evans GR, 2001; Midha R, 2006; Ruijs et al., 2005*). Se ha estimado que las lesiones del nervio periférico afectan al 2,8% de los pacientes que precisan revisión en un servicio de traumatología, muchos de los cuales adquieren una discapacidad secundaria de por vida (*Noble et al., 1998; Jonsson et al., 2013*). Con respecto a la incidencia de estas lesiones de 13.9/100.000 habitantes por año (*Asplund et al., 2009*) y el número de habitantes de la UE (504.456.000 a fecha de 01/07/2013), el número de lesiones de nervio periférico que requieren reparación y reconstrucción, incluyendo las lesiones en miembros amputados, podrían superar los 300.000 casos anuales sólo en la UE (*Wiberg & Terenghi, 2003*). En relación a las lesiones del nervio periférico, los costes sociales son importantes, pudiendo dividirlos en directos (gastos de cirugía, consultas externas y tratamiento rehabilitador), e indirectos (pérdida de producción) (*Lad et al., 2010*). Se estima que el coste anual sólo en la UE podría ser mayor de 2,2 billones de euros, lo que demuestra que las mejoras en las estrategias terapéuticas sobre las lesiones de los nervios periféricos podrían, no sólo mejorar la situación de los pacientes, sino también reducir significativamente los costes sociales (*Eriksson et al., 2011*).

Los traumatismos de la extremidad superior representan el 10-30% de la asistencia urgente en un accidente (*Rosberg & Dahlin, 2004*). Hasta el 73,5% de las lesiones nerviosas ocurren en las extremidades superiores, con el nervio cubital, solo o en combinación (*Kouyoumdjian JA, 2006*). La mayoría de los pacientes son jóvenes (18-43 años), y la mayoría de las lesiones en las manos son de gravedad menor o

moderada (*Rosberg et al., 2013*). Sin embargo, tienen un impacto severo en la capacidad de trabajo, las actividades diarias y las de ocio del paciente (*Saxena et al., 2004*). Suponen una enorme repercusión en la atención sanitaria, en la economía por la pérdida de producción y una desconexión social (*Rosberg et al., 2005a;2005b*). Las lesiones aisladas de los nervios mediano y cubital en el antebrazo, suponen un coste total de 51.000 y 31.000 €, respectivamente, donde aproximadamente el 85% son pérdidas de producción (*Rosberg et al., 2005*), incluso excluyendo gastos por pérdida de calidad de vida (*Eriksson et al., 2011*).

La etiología de la lesión incluye lesiones penetrantes, aplastamiento, isquemia, y tracción, así como, aunque menos comunes, por choque eléctrico o vibración (*Robinson LR, 2000; Robinson & Madison, 2004*). Los accidentes de tráfico son la causa más frecuente de lesiones relacionadas por estiramiento sostenido. El treinta por ciento de las lesiones nerviosas periféricas derivan de laceraciones por objetos punzantes y fracturas de huesos largos (*Stanec et al., 1997*). Las explosiones de las bombas y otros artefactos son una causa común de trauma nervioso en condiciones militares (*Maricevic & Erceg, 1997*). Requieren una reparación de emergencia por la gravedad del traumatismo de alta energía que genera daño masivo en el tejido blando, pérdida ósea y lesiones vasculares (hasta un tercio presentan lesión arterial). Hasta el 15% son lesiones iatrogénicas, especialmente concomitantes a cirugía ortopédica, donde la asociación fue más alta con la osteosíntesis del húmero, la prótesis de cadera (*Telleria et al., 2012*), o la osteosíntesis de fémur. El paciente debe ser informado de este riesgo al firmar el formulario de consentimiento quirúrgico antes de la cirugía (*Rosberg et al., 2013*).

La pérdida de segmentos largos de nervios en la extremidad lesionada con frecuencia requiere injertos nerviosos para la restauración de la función. La lesión nerviosa grave tiene un efecto devastador en la calidad de vida del paciente. Los síntomas típicos son defectos de la función sensorial y motora que podrían resultar en una parálisis completa de la extremidad afecta o en el desarrollo de un dolor neuropático refractario. Las directrices actuales de la EFNS sugieren que la eficacia de los fármacos, su relación eficacia / seguridad, la presencia de comorbilidades y la calidad de vida son factores que deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el tratamiento farmacológico para la neuropatía periférica (*Attal et al., 2006*).

En los casos de falta de recuperación, es necesaria la reparación quirúrgica del nervio lesionado (*Matsuyama et al., 2000*). Aproximadamente 100.000 pacientes se someten a cirugía de nervio periférico en los Estados Unidos y Europa cada año (*Kelsey et al., 1997*). El objetivo principal de esta reparación es permitir la reinervación de los órganos diana por guiar la regeneración sensorial, motora, autonómica e individual de los axones en el medio ambiente con una mínima pérdida de fibras en la línea de sutura (*Brushart TM, 1991*). Hay muchos factores que se deben tener en cuenta al predecir el resultado de la reparación de nervios periféricos como: tipo, localización y extensión de la lesión del nervio, momento de la cirugía, tipo de reparación, alineación apropiada de los fascículos, técnica quirúrgica, y las comorbilidades del paciente.

El interés por el estudio de la reparación del nervio periférico ha aumentado significativamente en los últimos 20 años; mientras que en el pasado la mayoría de los traumatismos y patologías nerviosas eran tratadas de forma conservadora, hoy en día el número de reconstrucciones nerviosas está progresivamente incrementándose debido a la mejora continua de la tecnología quirúrgica y al desarrollo de la destreza microquirúrgica.

La reparación de la lesión del nervio periférico mediante trasplante de nervio autólogo es todavía considerada como el *gold estándar* para rellenar los vacíos nerviosos, cuando no es posible la coaptación de los extremos sin tensión. Este tipo de reparación es el procedimiento más habitual, ya que la sección del nervio completo (neurotmesis) no sólo incluye una interrupción de los axones, sino también del tronco nervioso en sí, incluyendo sus elementos del tejido conectivo (epi-, peri-y endoneuro). En tales casos, para lograr la regeneración axonal con la recuperación funcional de los órganos finales, es necesaria una estrategia de reparación de los nervios, que incluye la reconstrucción de estos elementos. La lesión nerviosa periférica se asocia a menudo con importantes pérdidas de tejido nervioso, causando defectos irreparables que requieren injertos para volver a conectar los cabos nerviosos (*Lundborg G, 2000; Dahlin et al., 2001*). Hasta ahora, el injerto de nervio autólogo ofrece la mejor composición celular, molecular y estructural para soportar la regeneración axonal. Sin embargo, este procedimiento está asociado a comorbilidades del nervio donante, así como a la disponibilidad limitada nervios autólogos donantes.

Desafortunadamente, a pesar de los impresionantes avances técnicos en la reconstrucción nerviosa, la recuperación completa y la normalización de la función nerviosa casi nunca ocurre y los resultados clínicos son con frecuencia pobres (*Battiston et al., 2005; Casha et al., 2008; Gordon et al., 2003; Höke A, 2006; Lundborg G, 2002*).

El aumento en el número de pacientes que reciben actualmente tratamiento quirúrgico podría representar un estímulo significativo para la potenciación de la investigación en la reparación y regeneración del nervio periférico, para definir estrategias innovadoras para mejorar la recuperación nerviosa en la medicina humana.

La neuropatía traumática es un problema complejo y multifactorial, que no puede resolverse sólo con cirugía. De hecho, su evaluación debe ser multidisciplinaria y abarcar también la prevención y el diagnóstico, el tratamiento farmacológico del dolor, la rehabilitación y el apoyo psicológico (*Ciaramitaro et al., 2010*).

## 2.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

La reparación del tejido nervioso ha sido motivo de investigación desde hace siglos. A pesar de que los avances más significativos en la reparación y regeneración de los nervios se han adquirido a lo largo de las últimas décadas, el estudio de la reparación de los nervios y el potencial de regeneración se remonta a tiempos antiguos, a saber, Galeno en el siglo II.

Tras superar la idea, hace más de cien años, de que los nervios no podían regenerarse espontáneamente y que su manipulación podía impedir la funcionalidad del mismo, han sido numerosos los científicos que han profundizado en el estudio de la regeneración del nervio periférico.

En el siglo XIX, *Waller* en 1850 describió la degeneración de axones y mielina producida en el segmento distal de una fibra lesionada (degeneración Walleriana). En el mismo ámbito demostró el sobrecrecimiento de axones desde el extremo proximal del nervio afectado (regeneración Walleriana), hasta el cabo distal.

Desde entonces, numerosos y diversos métodos de tratamiento tanto conservadores como quirúrgicos han sido aplicados, no sólo a nivel experimental sino también en la práctica clínica, obteniéndose con todos ellos un importante avance en el conocimiento de este tema (*Mackinnon SE, 1991*).

Sabemos que sólo existirá regeneración de una fibra nerviosa lesionada si el soma celular permanece intacto. Posteriormente, del extremo proximal seccionado, habrán de nacer nuevas ramas en longitud y diámetro, en dirección al extremo seccionado distal para crear nuevas conexiones sinápticas, restableciéndose así la continuidad de la fibra y su funcionalidad.

Según estos conocimientos, puede lograrse la restauración de la fibra nerviosa lesionada, para lo cual debe procurarse un adecuado y cuidadoso manejo del tejido, según refieren *Mackinnon et al., en 1987*, que destaca entre los principios básicos en el manejo del nervio periférico, los siguientes:

- 1.- Cualquier reparación nerviosa ha de hacerse siempre libre de tensión, ya que lo contrario producirá un incremento del grado de fibrosis en la línea de sutura, lo que reportará una disminución de su funcionalidad.
- 2.- Es importante mantener una correcta alineación y enfrentamiento de los fascículos nerviosos con el fin de evitar la formación de neuromas en la zona de unión, que afecten a la transmisión nerviosa.
- 3.- En el caso de que la lesión sea extensa y no pueda hacerse una reparación sin tensión, será necesario interponer un material que sustente o sirva de estructura para facilitar la regeneración de las fibras guiándolas hasta el segmento distal.

Estos experimentos han demostrado que tanto el neurotrofismo (capacidad de influir sobre la maduración de la fibra nerviosa), como el neurotropismo (capacidad de influir sobre la dirección de su crecimiento), juegan un papel importante en el campo de la reparación nerviosa, cuyo ideal sería optimizar al máximo los efectos de ambos, (*Dellon & Lee, 1993*).

Esta capacidad de "crecimiento dirigido" de la fibra nerviosa ha suscitado una repetida búsqueda de diversos materiales y tejidos, que interpuestos entre las fibras, sirvan de estructura para su elongación.

### **3.- ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO**

El cuerpo humano está gobernado por el sistema nervioso (*Guyton A, 1994*), el cual se encarga de sentir, pensar y controlar el organismo. Para realizar estas tareas, recoge la información sensitiva del organismo a través de las terminaciones nerviosas y las transmite por los nervios a la médula espinal y al encéfalo. Éstos procesan la información y responden enviando señales a los músculos (respuesta motora) y a los órganos internos. De igual manera, se puede provocar una determinada acción que es generada por el encéfalo a partir de pensamientos o por combinación de diferentes componentes como la memoria o sensaciones obtenidas. Se puede decir que el sistema nervioso realiza tres tareas que son: función sensitiva, función integradora (memoria, pensamientos) y función motora.

Para clasificarlo, el sistema nervioso se puede dividir, en: 1.- sistema nervioso central (SNC), que incluye el encéfalo y la médula espinal y 2.- el sistema nervioso periférico (SNP), constituido por nervios cráneo-espinales, que se bifurcan desde el encéfalo y la médula espinal.

Mientras que el encéfalo tiene toda la parte cognitiva, recuerdos, memoria, pensamientos y está subdividido en varios segmentos, la médula espinal desempeña dos funciones: primero sirve de conducto para las fibras nerviosas que van y vienen del encéfalo y la segunda, es la de realizar funciones reflejas como son las derivadas del dolor y los actos reflejos. Por otro lado, el sistema nervioso periférico se trata de una red ramificada de nervios que componen las fibras aferentes y eferentes que llevan la señal sensitiva a la médula y las acciones motoras a los músculos.

El resultado es que poseemos un sistema central donde se procesan las señales que van y vienen de las diferentes partes del cuerpo, ya sean órganos, músculos o fibras nerviosas sensitivas. Las señales viajan por los axones que agrupados, forman los

nervios todos ellos localizados en la médula espinal hasta llegar a las ramificaciones que terminan conectando con los órganos y músculos de todo el cuerpo.

## ANATOMÍA DEL NERVO CIÁTICO EN EL HOMBRE

Este nervio es el más grande del organismo. Se origina en el plexo sacro principalmente a partir de los segmentos espinales L-5 a S-2, luego abandona la pelvis posterior medialmente con respecto a la tuberosidad isquiática y discurre distalmente en la región posterior del muslo rodeado por los músculos que alcanzan el hueco poplíteo. A lo largo de este trayecto, suministra ramas musculares a todos los músculos profundos por detrás de la articulación de la cadera y para los músculos de la región posterior de la rodilla. Todos estos músculos producen extensión del muslo, siendo los ocupantes del hueco poplíteo también fuertes flexores de la pierna.

En el límite inferior del muslo, inmediatamente proximal a la articulación de la rodilla, el nervio ciático se divide en dos ramas principales, el nervio tibial y el nervio peroneo común. El nervio tibial continúa distalmente en la región posterior de la pierna, ubicándose en el espacio entre la tibia y el peroné. Finalmente penetra en el lado medial del pie por detrás del maleolo interno. En este trayecto proporciona ramas sensitivas para la piel lo mismo que las ramas para todos los músculos del dorso de la pierna, especialmente para el sóleo, el gemelo, el tibial posterior y los flexores de los dedos. Las funciones principales de estos músculos son la flexión del plantar del pie y los dedos y también la inversión del pie.

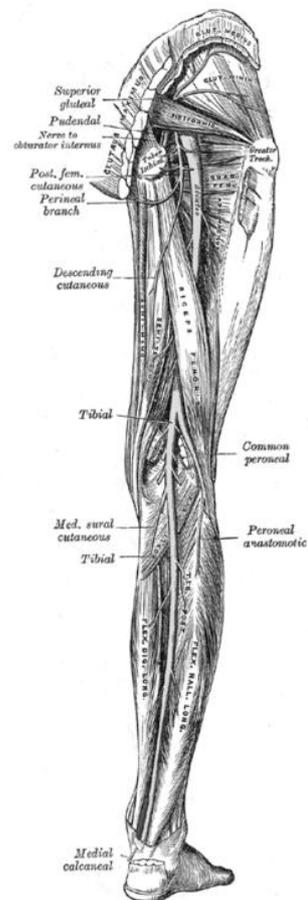


Figura 1. 1 **Anatomía del nervio ciático en el hombre.** Esquema anatómico de la disección del nervio ciático en su recorrido por la extremidad inferior. Nomenclatura clásica de las estructuras músculo-esqueléticas.

El nervio peroneo común gira alrededor del borde externo del peroné, donde se divide en los nervios peroneos superficial y profundo. El primero de éstos desciende por la parte lateral de la pierna para suministrar inervación motora a los músculos peroneos e inervación cutánea al dorso del pie. El nervio peroneo profundo desciende en la región anterior de la pierna en relación con los músculos anterolaterales, tibial anterior y los músculos extensores de los dedos, inervándolos. Su función principal es la dorsiflexión del pie.

### **ANATOMÍA DEL NERVIIO CIÁTICO DE LA RATA**

El plexo sacro de la rata está formado por parte del cuarto nervio lumbar, el quinto y parte del sexto. Da salida a dos grupos de nervios, un tronco anterior (ventral) y otro posterior (dorsal) que se unen y consolidan en la región pélvica como nervio ciático.

Este tronco nervioso sale de la pelvis por la escotadura ciática y pasa por debajo del músculo glúteo mediano apoyado sobre los gemelos pelvianos y obturadores, después de encontrarse al músculo piriforme en su camino descendente. El tronco común a menudo está dividido poco después de su origen en dos ramas terminales principales, el nervio tibial y nervio peroneo. Tras la división o incluso antes (esta circunstancia es francamente variable), el ciático pasa sobre los músculos aductores y semimembranoso, delante del semitendinoso y cubierto por el músculo aductor craneal corto y bíceps femoral.

A nivel de la región crural posterior se descubren los nervios tibial y peroneo agrupados en un tronco común junto al nervio sural, rama alta del nervio peroneo, que le sigue en su trayecto. Este tronco común da el aspecto macroscópico de tronco único. Estos nervios recorren unidos el muslo en toda su longitud, para separarse en la parte alta de la región poplíteo, aunque a veces lo hace más proximal.

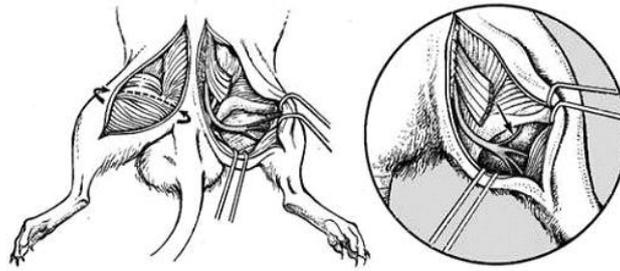


Figura 1. 2 **Dissección del nervio ciático de la rata.**

Dissección del nervio ciático de la rata con seguimiento de su trayecto. Esquema desde el origen a sus ramas terminales.

Por debajo de la rodilla, el nervio peroneo se divide rápidamente en nervio músculo-cutáneo y nervio tibial anterior que van a inervar los músculos anteriores y laterales de la pierna y los músculos dorsales del pie. El nervio tibial da importantes colaterales para los músculos superficiales y profundos de la celda posterior de la pierna, antes de dividirse en nervio plantar mediano y nervio plantar lateral que van a inervar a los músculos plantares del pie.

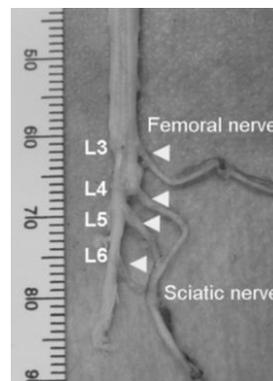
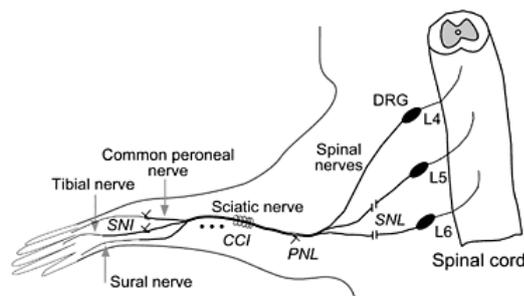


Figura 1. 3 **Anatomía del nervio ciático en la rata.**

Las neuronas motoras del nervio ciático parten de las raíces de los niveles L3-L6 de la médula espinal lumbar. **Van Neerven** SG, Bozkurt A, O'Dey DM, Scheffel J, Boecker AH, Stromps JP, Dunda S, Brook GA, Pallua N. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2012;30;7(1):5.

La correspondencia entre la composición del nervio y las características funcionales de las poblaciones de sus fibras no siempre es evidente. Para investigar la correspondencia y dar una imagen sistemática de la morfología del nervio ciático

humano, se realizó un estudio amplio morfométrico en el nervio ciático de las extremidades traseras de las ratas de laboratorio, sus raíces espinales dorsales y ventrales, y sus ramas principales (*Prodanov et al, 2007*). Se examinó su histología en secciones biológicas, a través del análisis de la imagen microscópica. Se estudiaron la variación en la densidad de las fibras mielinizadas, el espacio intermedio de la fibra, y el área de sección transversal del nervio. En las raíces dorsales, el número de fibras y las zonas de sección transversal eran directamente proporcionales al nivel de la raíz espinal. La identificación funcional de las poblaciones de fibras reveladas se estableció mediante el uso de los cálculos de las velocidades de conducción correspondientes de acuerdo con *Arbuthnott et al. 1980* y según las consideraciones anatómicas.

El método propuesto proporciona un marco conceptual para la comprensión de la anatomía comparativa de los nervios periféricos y las raíces espinales y se puede aplicar con más detalle en otras especies (*Schmalbruch H, 1986; Castro et al. 2008*).

## **4.- HISTOLOGÍA DEL NERVIIO PERIFÉRICO**

### **TEJIDO NERVIOSO**

El tejido nervioso, tanto del sistema central como del periférico, está compuesto por dos estructuras celulares que son: 1.-Las neuronas: que conducen las señales del sistema nervioso central. 2.- Las células de sostén y aislamiento: que tienen la función de mantener las neuronas en su lugar y limitar la diseminación de las señales; en el caso del sistema nervioso periférico se conocen como células de Schwann.

Una neurona está compuesta por:

- 1.- Cuerpo celular: es básicamente, el cuerpo de la neurona y de él se ramifican las otras partes de la neurona.
- 2.- Dendritas: son múltiples prolongaciones que se expanden hacia otras neuronas para recibir señales. De la intersección con otras neuronas se obtiene la sinapsis.
- 3.- Axón: es la ramificación que lleva la señal a otras neuronas o hacia las fibras nerviosas que salen de la médula espinal para inervar en los músculos.
- 4.- Terminaciones axónicas y sinapsis: es la terminación de los axones en el sistema central. Todos los axones tienen numerosas ramificaciones que terminan en la conexión con otra dendrita obteniendo en la intersección, la conexión sináptica. El funcionamiento se basa en la liberación de sustancias químicas que excitan o inhiben la siguiente neurona (sinapsis química); no obstante, se puede producir el mismo efecto producido por iones que en tal caso será una sinapsis eléctrica.

## **MORFOLOGÍA DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS**

El sistema nervioso periférico está formado por un conjunto de nervios de diferente grosor y longitud, que tienen la función de recoger los estímulos desde la periferia y transportar hacia ella la respuesta motora, secretoria o vegetativa que se origine. La mayoría de los nervios son mixtos y están formados por fibras de naturaleza sensitiva, motora y, algunos de ellos, también de naturaleza simpática. Los nervios desde su origen se dirigen a la estructura anatómica que van a inervar y en su trayecto se dividen, al igual que hacen los vasos sanguíneos, en múltiples ramas colaterales antes de dar sus ramas terminales. El ángulo de las ramas colaterales es generalmente agudo respecto al nervio principal. A lo largo de su recorrido, los nervios frecuentemente se anastomosan entre sí, disponiéndose las fibras nerviosas yuxtapuestas y paralelas en paquetes, pero nunca se produce una fusión de las fibras, ya que éstas mantienen siempre su individualidad.

Por lo general los nervios se asocian íntimamente con una red vascular, dado que la conducción nerviosa es un proceso que consume energía (*Lundborg G, 1975*), por lo cual obliga a que los nervios periféricos estén irrigados en todos sus compartimentos, incluyendo una extensa red capilar endoneural en la que el sistema nervioso simpático desempeña un papel importante como regulador del grado de perfusión necesario (*Selander et al, 1985*).

El tejido conectivo que rodea a los nervios periféricos en toda su extensión está formado por tres estructuras (*Key & Retzius, 1876*). El endoneuro rodea a los axones de forma individual, éstos se agrupan en fascículos, cada uno de ellos envuelto por el perineuro, y por último el conjunto de fascículos que agrupan a la totalidad de los axones presentes en ese nervio se encuentran envueltos por el epineuro.

## Fascículos

Los axones son la prolongación citoplasmática de las neuronas, que permiten proyectar señales eléctricas y neuroquímicas desde el cuerpo o soma de la neurona hasta los puntos más lejanos donde se encuentra el extremo distal del axón. El axón contiene en su interior el axoplasma y está limitado por una membrana denominada axolema. En el sistema nervioso periférico, el axón se encuentra rodeado por la célula de Schwann y, en la fibra mielinizada, por un manguito de mielina que esta misma célula produce. Este conjunto está envuelto por una membrana basal denominada neurolema y luego por otra vaina más externa, el endoneuro (*Aguayo et al, 1976; Stewart JD, 2003*). Los axones se organizan en fascículos, describiendo un plexo intraneural, donde los axones van ocupando posiciones en los diferentes fascículos a lo largo de su trayecto, lo que permite una relación de vecindad con diferentes axones y una ubicación más periférica o más central de acuerdo con el fascículo que ocupen a lo largo de su recorrido (*Sunderland & Bedbrook, 1949; Sunderland & Marshall, 1959; Sunderland & Ray, 1948; Sunderland S, 1945*). El número y el tamaño de los fascículos pueden variar a lo largo del trayecto de un nervio por esta disposición en plexo de los axones, y en general, es raro que un patrón fascicular se mantenga constante más allá de los 15 mm.

Esta organización desempeña un papel importante en la distribución de las fibras nerviosas. Las fibras destinadas a las ramas de división proximales tienden a agruparse en la periferia. Distalmente, la proporción de fibras destinadas a una rama de división aumenta tanto más cuanto más se aproxima a la división, y la rama sólo se individualiza poco antes de su emergencia del tronco del nervio.

En general, en un determinado nervio el número de fascículos aumenta, y el área de cada uno de ellos disminuye en las zonas donde se desprenden las ramas nerviosas y en las zonas próximas a las articulaciones. Por el contrario, el número de los fascículos disminuye y el área de cada uno de ellos aumenta en las zonas ubicadas entre la aparición de las subdivisiones del nervio y en las localizadas entre las articulaciones, donde los fascículos son más delgados y numerosos y están más acolchados y protegidos por una mayor cantidad de perineuro, con lo cual aumenta la resistencia de esta estructura a la presión y al estiramiento (*Lundborg G, 1975; Wang et al., 2011*).

Con respecto a la migración de las sustancias introducidas en los nervios hacia espacios del canal espinal, a principios del siglo XX se demostró que dichas sustancias

en el espacio subaracnoideo podían llegar a alcanzar los nervios periféricos y, de forma inversa, las inyectadas dentro de los fascículos de un nervio podían penetrar en sentido centrífugo hacia el espacio subaracnoideo, ya que podían migrar hacia el espacio subdural y la rotura de la aracnoides podía facilitar el ingreso de dichas sustancias en el espacio subaracnoideo (*Sunderland & Bradley, 1952; Meng et al., 2011*).

### **Cubiertas de los nervios periféricos**

El endoneuro, el perineuro y el epineuro constituyen las cubiertas de los nervios periféricos. Entre estas estructuras, se pueden encontrar fibroblastos, mastocitos, macrófagos, fibras de colágeno agrupadas en haces, fibras elásticas y fibras de reticulina. Estas tres cubiertas de tejido conectivo están presentes a lo largo de toda la extensión del nervio y, a medida que los nervios se van ramificando, este tejido se va adelgazando.

En el extremo proximal, el endoneuro del nervio se fusiona con el de la raíz, mientras que el epineuro se fusiona con la duramadre; en cuanto al perineuro, sólo sus capas más internas se prolongan para recubrir la raíz. En el extremo distal, el perineuro se reduce y entra en continuidad con las cápsulas de los órganos sensoriales. En cambio, se interrumpe antes de la unión neuromuscular, dejando un corto espacio abierto.

Las características individuales de cada una de las cubiertas permiten a los nervios una pequeña elongación favorecida por la elasticidad de las fibras elásticas y por la disposición en enrejado de las fibras colágenas, aportando al nervio solidez y consistencia. Como respuesta a la adaptación frente a zonas de roce, las cubiertas de los nervios presentan engrosamientos en su espesor, que en ocasiones, adoptan una forma gangliforme cuando la fricción es crónica; tal es el caso del nervio circunflejo que rodea la cara externa de la porción tendinosa superior del tríceps, del nervio mediano en la muñeca, del nervio interóseo posterior en la muñeca y de la rama terminal externa del nervio peroneo profundo en el tobillo.

En los pacientes ancianos, hay un aumento del endoneuro, perineuro y epineuro, por la obliteración de las arterias de los nervios, como consecuencia de la proliferación endotelial y de la fibrosis de la túnica media.

Existe otra estructura de tejido conjuntivo más, la cual tiene gran significación clínica, el "paraneuro" adventicial o mesoneuro. Éste es un tejido areolar laxo que permite el deslizamiento del nervio; a intervalos, existen pedículos vasculares que atraviesan esta capa en dirección al tronco nervioso.

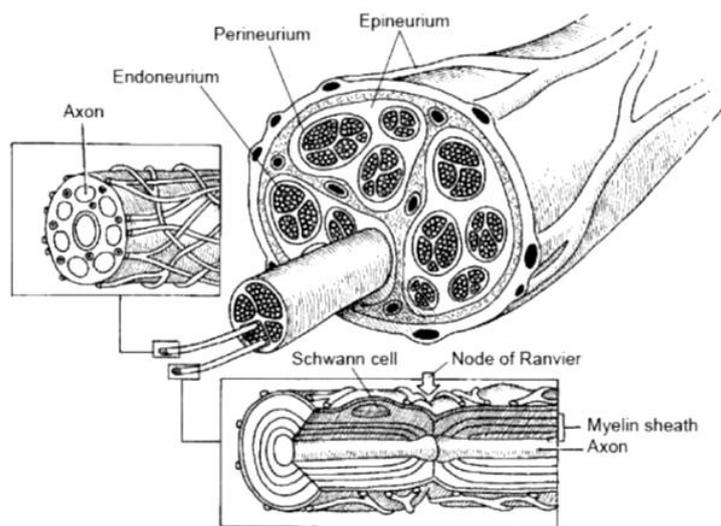


Figura 1. 4 **Morfología del nervio periférico.**

Estructura del nervio. Presentación de sus coberturas de tejido conectivo y la interacción de las células de Schwann.

## **Epineuro**

El epineuro es el tejido que rodea y agrupa todos los fascículos y que se condensa sobre la superficie externa del nervio. Su origen es mesodérmico, y su naturaleza, areolar. Por sus características aporta cierta movilidad al nervio al separarlo de sus estructuras vecinas. Esta movilidad está disminuida en los puntos de salida de las subdivisiones, en la aparición de las ramas nerviosas, en la entrada dentro de los haces musculares y cuando existe una estrecha relación con un vaso durante su trayecto, ya

que en tal caso, el nervio se adhiere más al vaso que al resto de las estructuras que le circundan formando un conjunto neurovascular. La cubierta que aporta el epineuro no siempre está presente en todos los nervios y, cuando un nervio está formado por un solo fascículo, el epineuro está ausente, o su espesor es tan delgado que es difícil identificarlo. Lo mismo ocurre con los terminales nerviosos, donde el epineuro se adelgaza progresivamente hasta desaparecer.

El espesor del epineuro es diferente en cada nervio y en los distintos puntos a lo largo de un mismo nervio. En general, ocupa entre el 30 y el 75% del área total (el 88% en el caso del ciático a la altura del glúteo) (*Sunderland & Bradley, 1949; Sunderland S, 1965*). En proporción, hay mayor porcentaje de epineuro cuando el nervio está formado por mayor cantidad de fascículos, aunque éstos sean de menor tamaño.

El epineuro está formado principalmente por fibras de colágeno con una disposición longitudinal respecto al eje del nervio, escasas fibras elásticas, tejido adiposo, escasos fibroblastos, mastocitos (*Olsson Y, 1971*), vasos sanguíneos y delgadas fibras nerviosas que inervan los vasos (*Waggener & Beggs, 1967; Burkel WE, 1966*). Las fibras de colágeno se caracterizan por una periodicidad de los tipos I y III (*Junqueira et al., 1979; Salonen V, 1987*). Las fibras elásticas están presentes en menor proporción. El tejido adiposo se halla entre los fascículos, es difícil encontrarlo dentro de los fascículos, aumenta en los pacientes obesos y su proporción respecto al contenido fascicular varía de un nervio a otro y en diferentes puntos de un mismo nervio. El nervio ciático contiene considerables cantidades de grasa, a diferencia de los nervios de la extremidad superior (*Sunderland S, 1945*). Aquí se encuentran los vasos de mayor calibre, linfáticos y pequeñas terminaciones que inervan los vasos, los *nervi-nervorum* (*Sunderland & Bradley, 1949; Wang et al., 2011*).

El epineuro, en su conjunto, aporta ciertas ondulaciones en el trayecto nervioso que permiten elongaciones nerviosas durante los movimientos de las extremidades. Durante el estiramiento, las fuerzas tensionales y las propiedades elásticas se aplican en primer lugar al fascículo y después a las fibras, que permanecen mucho tiempo con su forma normal. El diámetro del fascículo disminuye y la presión intrafascicular aumenta, lo cual puede comprometer la vascularización del nervio si se prolonga en el tiempo. La resistencia a la elongación depende de la importancia de la fuerza de deformación, la velocidad de aplicación y la duración. El amortiguamiento de las fuerzas de compresión

ejercidas sobre el nervio depende del epineuro y del número de fascículos que componen el nervio (*Stewart JD, 2003; Cauley & Filippi, 2013*).

Los troncos nerviosos que contienen pocos fascículos, así como las raíces son más sensibles a la compresión, ya que no tienen una estructura equivalente al epineuro y poseen un perineuro más delgado (*Osawa T, Ide C; 1986*). Esta función se suma a la de protección frente a una eventual fuerza radial que tienda a comprimir el nervio.

Durante la etapa del desarrollo, el epineuro aparece después de las células de Schwann. Las fibras de colágeno aumentan su diámetro después del nacimiento.

### **Perineuro**

El perineuro es la cubierta que envuelve de forma individual cada uno de los fascículos y está formada por un conjunto de láminas celulares continuas y concéntricas, y fibras de colágeno interpuestas entre dichas láminas (*Gambe & Eames, 1964; Paetau et al; 1980*). Cada lámina está formada por un solo plano de células unidas entre sí, células perineurales, aplanadas y poligonales, con membranas basales que contienen proteoglicanos heparinsulfato, fibronectina y laminina (*Schiff & Rosebluth, 1986; Hope & Bourne, 1963*). El número de láminas depende del tamaño de los fascículos y de su proximidad al sistema nervioso central (*Klemm H, 1970; Shanta & Bourne, 1968*). Las células perineurales adyacentes se unen entre sí por uniones estrechas, tipo *zonula ocludens* y hemidesmosomas para formar una lámina y, en suma, una barrera a la difusión (*Thomas & Jones, 1967; Lieberman AR, 1968*). Entre ellas se encuentran los espacios perineurales, ocupados por sustancia amorfa fundamental, fibras de colágeno y escasos fibroblastos (*Sunderland & Bradley, 1952*). Pueden identificarse tres zonas concéntricas. La zona intermedia está formada por una única lámina de células perineurales con firmes uniones entre sí, que está separada del endoneuro por el espacio subperineural (*Thomas PK, 1963; Shantaveerappa & Bourne, 1964; Shantaveerappa & Bourne, 1966*). En esta zona el número de láminas es proporcional al tamaño de los fascículos. La zona externa es una zona de transición con el epineuro, donde se pierde la disposición laminar de las células y aparecen fibras de colágeno más gruesas. El número

de láminas disminuye al ramificarse los nervios y en los terminales nerviosos (*Burkel WE, 1967*).

Las células perineurales tienen una alta actividad metabólica, y en su citoplasma se encontraron enzimas desfosforilantes como la ATPasa, la 5-nucleotidasa o la creatinfosfatasa, se parecen controlar la concentración de sodio, potasio y glucosa en la proximidad de la fibra nerviosa (*Shantaveerappa & Bourne, 1962; Shantaveerappa & Bourne, 1963; Llewelyn & Thomas, 1987; Cauley & Filippi, 2013*). El perineuro forma una vaina tubular que permite algunos movimientos de los axones dentro de un fascículo. En general, cuando aumenta el número de fascículos en un nervio, disminuye el espesor del perineuro.

Una fibra mielinizada puede tener sólo una lámina de perineuro, y también una sola lámina de perineuro puede acompañar a varias fibras amielínicas y a sus respectivas células de Schwann. En las fibras mielinizadas, la envoltura perineural termina próxima a la placa motora y en la cápsula que rodea a las terminaciones nerviosas. En las fibras amielínicas, la terminación de la envoltura perineural puede apreciarse con más facilidad y se observa cómo disminuye el número de láminas en esta zona (*Saito & Zacks, 1969; Kerjaschi & Stockinger, 1970*). El perineuro forma una barrera a lo largo del nervio y existen tres zonas donde el perineuro está ausente y pueden comunicarse el epineuro y el endoneuro (en las terminaciones nerviosas, a la entrada y salida de los vasos sanguíneos que irrigan los nervios y en el punto donde las fibras de reticulina penetran en el perineuro). En el punto donde los vasos sanguíneos entran y salen de los nervios, el perineuro sólo tiene una delgada lámina que la separa del endoneuro.

La función del perineuro es mantener la presión intrafascicular y garantizar un efecto barrera (*Ollsson & Kristensson, 1973; Soderfeldt et al, 1973*). Transmite presión al endoneuro durante los procesos de maduración (*O'Daly & Imaneda, 1967*). Las células mantienen una barrera de difusión que permite proveer y transportar nutrientes a los axones y a las células de Schwann que los rodean (*Kristensson & Olsson, 1971; Gambe & Breathnach, 1965*). Limita la extensión de infecciones y reacciones inflamatorias asociadas; se defiende generando un engrosamiento (*Sunderland S, 1946*). A diferencia de esto, la rotura del epineuro no tiene efectos nocivos (*Ochoa J, 1971; Duckett & Scott, 1913; Shield et al, 1986; Stewart JD, 2003*).

## **Endoneuro**

El endoneuro es una delicada lámina tubular que rodea directamente las células de Schwann y que contribuye a mantener el medio interno en el que se encuentran estas células y los axones (*Sereviratne & Peiris, 1970*). El endoneuro que rodea tanto los axones mielinizados como los que no lo están, está constituido por dos láminas diferentes: una externa con fibras de colágeno agrupadas en una dirección longitudinal, y otra interna donde las fibras de colágeno tienen una dirección desorganizada (*Sunderland & Bradley, 1950*). Las fibras de colágeno de la lámina interna están en estrecha relación con la lámina basal de las células de Schwann.

El colágeno en el endoneuro también aporta resistencia a la tensión, porque se interdigita en la membrana basal (*Usbiki & Ide, 1986*). Los macrófagos del endoneuro se caracterizan por la presencia de grandes gránulos heterogéneos en su citoplasma y se hallan en localizaciones perivasculares (*Olsson Y, 1968*). Éstos tienen una importante actividad lítica mediada por la fosfatasa ácida, con gran capacidad de fagocitosis (*Gambe HJ, 1964; Oldfords A, 1980*).

Cuando los macrófagos se encuentran fagocitando desechos de las envolturas de mielina, desarrollan contactos especializados con las células endoteliales. Los fibroblastos del endoneuro también desarrollan actividad fagocítica (*Schubert & Friede, 1981*). Las ondulaciones de los axones facilitan la resistencia a la elongación del axón sometido a tensión, desarrollado también por el endoneuro (*Clarke & Bearn, 1972; Cauley & Filippi, 2013*).

El conjunto endoneuro-célula de Schwann funciona como un mecanismo de aislamiento que evita interferencias entre la conducción del impulso nervioso de los axones vecinos (*Esplin EW, 1962*).

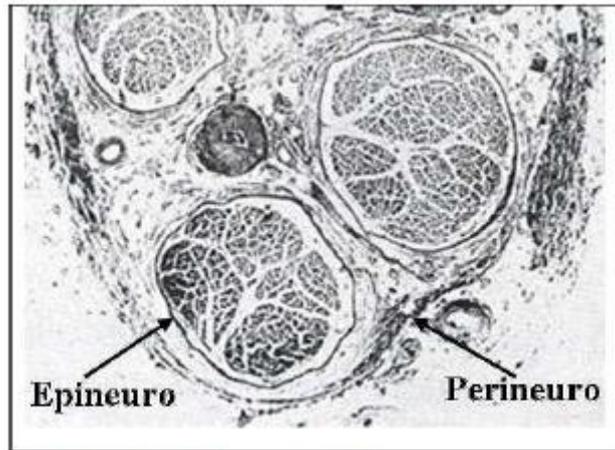


Figura 1. 5 Cubiertas de los nervios periféricos.

El endoneuro (también referido como canal endoneural, vaina endoneural, tubo endoneural, o vaina de Henle), es una capa de tejido conectivo delicada constituida por células endoneurales que encierra la vaina de mielina de una fibra nerviosa de la médula espinal. Las fibras nerviosas recubiertas por endoneuro, están empaquetadas en grupos llamados fascículos nerviosos, que tienen una vaina protectora llamada perineuro. Varios fascículos pueden ser a su vez agrupados con un suministro de sangre y tejido adiposo en otra vaina, el epineuro. “Traumatismos del adulto. Cirugía Ortopédica y Traumatología en zonas de meno”. Rodrigo Miralles (Centre de Cooperació al Desenvolupament, URV Solidaria) Universitat Rovira i Virgili (Tarragona).

## Vascularización

La importancia de la vascularización de los nervios periféricos viene dada porque sus axones son vulnerables a la isquemia por la gran distancia que hay entre el cuerpo neuronal y la extensión del axón. Las múltiples anastomosis que existen en los nervios periféricos permiten asegurar un equilibrio entre las demandas metabólicas y el flujo sanguíneo, así como adaptar las necesidades de los axones ante situaciones de hipoxia, isquemia, estrés y de los diferentes estados morfológicos presentes en las distintas neuropatías (*Low et al, 1989; Wang et al., 2011*).

Para asegurar una adecuada irrigación sanguínea, los nervios periféricos tienen dos sistemas vasculares independientes que se anastomosan entre sí. Hay un sistema vascular extrínseco y otro intrínseco. El primero está formado por arterias, arteriolas y vénulas que se encuentran en el epineuro, y el segundo está formado por el conjunto de capilares longitudinales que se encuentran dentro de los fascículos y en relación con el endoneuro (*Marcarian & Smith, 1968*). La anastomosis entre ambos sistemas vasculares

está formada por vasos que se encuentran en el epineuro y perineuro, y gracias a ellos los nervios pueden resistir ante los estados de isquemia. El número de anastomosis entre todos estos vasos es tan considerable que los nervios pueden quedarse en largo trecho desprovistos de los tejidos que les rodean. Sunderland insiste en la importancia de conservar los vasos superficiales que acompañan longitudinalmente a los nervios cuando estos se decortican, pues forman eslabones importantes del sistema que proporcionan tales anastomosis eficaces para la nutrición (*Sunderland S, 1945*).

Los vasos endoneurales tienen características propias que les confieren una particularidad funcional, lo cual se pone de manifiesto ante las situaciones de isquemia y de hipovolemia. Los capilares endoneurales son más grandes que en otros tejidos; sin embargo, la distancia entre los capilares es mayor comparada con la de otros tejidos. El gran tamaño de los capilares contrarresta la escasa autorregulación de estos vasos, que tienen una escasa contractilidad, por lo que los nervios son sensibles frente a los cambios de volumen y de presión de perfusión. A esto se le suma la distancia intercapilar, que puede convertir en ineficiente la perfusión endoneural, convirtiéndolo en un sustrato más vulnerable al edema endoneural (*Goedee et al., 2013*).

Morfológicamente, las arteriolas tienen menos músculo liso y lámina elástica interna, lo que hace que sean menos rígidas y tengan una mayor tendencia al colapso cuando aumenta la presión endoneural.

Los nervios tienen una abundante irrigación. La relación vasos y fibras mielínicas es de 1:25 (*Marcarian & Smith, 1968*), y esta proporción es bastante constante en diferentes zonas de los nervios. Son excepciones el nervio ciático y el mediano, porque poseen vasos de mayor calibre. El número de arterias que llegan a un nervio varía entre los pacientes y, dentro de un mismo paciente, varía entre las regiones contralaterales homónimas. El origen es variable y puede ser reforzado y/o reemplazado en el curso de su trayecto por las anastomosis procedentes de las arterias próximas. En general, los nervios de mayor tamaño no tienen por qué recibir más vasos. Los nervios pueden recorrer distancias considerables sin recibir ningún vaso, ya que en ese segmento pueden nutrirse de los vasos descendientes intraneurales. Suelen ser vasos cortos que entran y salen del nervio a través del espesor de una lámina de tejido conectivo que une el vaso al nervio, el mesoneuro (*Kline et al; 1975*). Así penetran a lo largo de la línea de fijación del mesoneuro, lo que permite movimientos del nervio sin

afectar su irrigación y justifica la retracción de los extremos de un nervio tras ser seccionado (*Goedee et al., 2013*).

En la superficie del nervio, las arterias se dividen en dos ramas, ascendente y descendente, que se unen con ramas similares ubicadas más arriba y más abajo formando una red vascular en el espesor del meso. Los vasos aportan las arteriolas superficiales que se suceden con las intraneurales, los precapilares y los capilares que, tras sucesivas anastomosis, forman una red vascular longitudinal intraneural que irriga todo el nervio. Los vasos intraneurales suelen recorrer un trayecto vertical u oblicuo entre los fascículos (*Hromada J, 1963*). Los de mayor calibre se encuentran en las zonas centrales entre los fascículos o en su superficie. En el interior de los fascículos suele haber capilares. Los vasos nutricios adoptan un curso oblicuo cuando pasan a través de la vaina perineural formando un mecanismo de válvula que se cierra mediante ciertos engrosamientos de los fascículos (*Lundborg G, 1970*). Los capilares entran en el endoneuro en su lámina externa después de recorrer una corta extensión por el perineuro, lo que ayuda a mantener la integridad de la barrera hemato-nerviosa, que evitan el paso de sustancias al endoneuro (*Jacobs J, 1977*). También los capilares endoneurales tienen uniones más fuertes que las células endoteliales de los vasos encontrados en el epineuro y el perineuro, y se caracterizan por ser más impermeables a muchas sustancias, como las proteínas de alto peso molecular (*Jacobs JM, 1976; Frijlink et al., 2013*). Ante una respuesta simpática, en estos vasos se produce constricción y enlentecimiento del flujo, por completo, reapareciendo el mismo cuando cesa el estímulo. Son también sensibles a la diferencia de temperatura y aumentan el flujo súbitamente a partir de los 35 °C, lo que se manifiesta clínicamente por una recuperación de la visibilidad capilar (*Goedee et al., 2013*).

### **Nervi-nervorum**

Son nervios especiales de naturaleza simpática y sensitiva, que se originan a partir del propio nervio y de los plexos perivasculares (*Rechthand et al, 1986*). Estos nervios forman un plexo que se ubica en su mayor parte en el epineuro y que envía proyecciones hacia el perineuro y el endoneuro para terminar en los *vaso-vasorum*. Los

vasos epineurales y perineurales tienen un plexo adrenérgico que los envuelve, ausente en los vasos endoneurales (*Appenzeller et al, 1984; Dhintal et al, 1986; Appenzeller et al, 1989; Carrero G, 2003*).

Debido a que las neuronas no son remplazadas en los mamíferos adultos, la recuperación de la función depende de que vuelvan a crecer los axones de las neuronas dañadas y formen las conexiones adecuadas. Sin embargo, el crecimiento de los axones es muy limitado.

## **MIELINIZACIÓN DEL NERVIIO PERIFÉRICO**

Las células de sostén del sistema nervioso periférico comprenden las células de Schwann que se asocian a todas las fibras nerviosas periféricas. Estas células se denominan neurilemas o vainas de Schwann por la forma en que rodean a sus correspondientes axones. Todo axón del sistema nervioso periférico desde las raíces dorsales y ventrales hasta las ramificaciones más distales de las fibras sensoriales o motoras, está rodeado en la mayor parte de su longitud por una serie de células de Schwann (*Weiss L, 1982*).

Los nervios periféricos están cubiertos por varias capas, siendo la compuesta por las células de Schwann la que se halla en más íntimo contacto con los axones.

La vaina de mielina de un nervio periférico está rodeada por el protoplasma de una célula de Schwann; a su membrana celular se añade una membrana basal, la cual envuelve el internodo, aislando las fibras nerviosas unas de otras. La mielina de las fibras mielínicas no es continua; está interrumpida de manera periódica por estrechamientos llamados nodos de Ranvier (*Kun et al., 2012*). En estos nódulos no hay mielina y la vaina de Schwann de la célula nerviosa se invagina y, no la cubre por

completo en estos sitios, como se ha demostrado por los estudios de Robertson al Microscopio Electrónico (ME) (*Robertson JD, 1962*). La fibra nerviosa está descubierta en parte por lo tanto, habiendo una célula de vaina de Schwann entre dos nódulos.

En los nervios periféricos, la mielina entre los estrechamientos de Ranvier está interrumpida por fisuras o surcos pequeños que se extienden hacia ella desde la superficie. Estos sitios se denominan surcos de Schmidt-Lanterman, y los segmentos entre ellos se denominan segmentos de Schmidt-Lanterman (*Kun et al, 2012*). Los surcos han sido estudiados por métodos histoquímicos por Shanklín y Azzam, (*Shanklín & Azzam, 1989*).

Existe una relación entre el calibre del cilindroeje, el espesor de la vaina de mielina, la distancia entre los nodos de Ranvier y la velocidad de la conducción del impulso nervioso. Cuanto mayor es el calibre del axón, mayor es el espesor de la vaina de mielina y mayor la distancia internodal.

Por ello cuando una fibra nerviosa está creciendo, las distancias internodales aumentan progresivamente. La velocidad de la conducción aumenta a medida que aumenta la distancia internodal. Las fibras nerviosas se clasifican en A, B y C (clasificación de Erlanger y Gasser) dependiendo de su contenido en mielina y la velocidad de la conducción. Las fibras de tipo A, fuertemente mielinizadas, tienen un diámetro que oscila entre 3-20  $\mu\text{m}$  y una velocidad de conducción de hasta 20 m/s, las de tipo B están pobremente mielinizadas y su diámetro oscila entre 1-3  $\mu\text{m}$  y los impulsos discurren a una velocidad de hasta 15 m/s. Finalmente las de tipo C son amielínicas y de conducción lenta (hasta 2 m/s), (*Fricker et al., 2013*).

Puede decirse que en las fibras amielínicas la propagación del impulso se produce de forma continua, mientras que en las mielínicas la transmisión de los impulsos se realiza a saltos. Las bases morfológicas de esta conducción saltatoria se hallan en la alternancia, a lo largo del nervio, de segmentos con cubierta mielínica (internodos y de zonas desmielinizadas \_nodos de Ranvier\_). Este tipo de conducción es mucho más rápido y requiere mucha menos energía que la propagación continua de la excitación nerviosa (*Fricker et al., 2013*).

En lo referente a la histología del nervio periférico, a la observación de los cortes transversales de un nervio a través de la microscopía óptica se demuestra que la mielina

que rodea a cada fibra nerviosa se disuelve durante el proceso de inclusión y deshidratación debido a su naturaleza lipídica. Esto hace que la fibra nerviosa se deslice hacia un lado del espacio tubular que crea la mielina a medida que se va disolviendo. Por lo tanto los cortes transversales teñidos con hematoxilina-eosina, o con cualquier tricrómico muestran la zona previamente ocupada por la vaina de mielina como pequeños espacios redondeados y vacíos.

Sin embargo, en una preparación con ácido ósmico, la mielina que rodea las fibras nerviosas no se disuelve ni desaparece, sino que se conserva y se tiñe de negro. Se dice que es osmófila. Por lo tanto, las vainas de mielina de las fibras nerviosas aparecen como anillos de color pardo-negrucos en este tipo de preparaciones. Pero los demás elementos del nervio no se observan muy bien. Estas preparaciones permiten poner de manifiesto que las fibras que componen un nervio tienen dimensiones diferentes.

## **POTENCIAL DE ACCIÓN**

La señal nerviosa o potencial de acción viaja a través del axón que se encuentra aglutinado con otros muchos axones formando el nervio (*Matthews GG, 1989*). La transmisión del potencial de acción es debida al movimiento de cargas entre el interior y exterior del axón a través de las membranas que lo forman. El axón está constituido por una bicapa lipídica que separa el interior del exterior y solamente es posible la circulación de cargas a través de proteínas que se encuentran intercaladas. Estas proteínas se controlan por ligandos o por voltaje. En el caso de que el control sea por ligando, el mecanismo de apertura para dejar pasar las cargas es debido a una sustancia (denominada "ligando"): un ejemplo es el debido a acetilcolina sobre el canal del mismo nombre que abre una puerta de un tamaño de 0,65 nm, dejando pasar todos los iones y moléculas de tamaño inferior a éste. Dicha puerta es de suma importancia en la

transmisión de las señales de una célula a otra y de las células nerviosas a las musculares.

En el caso de las puertas proteicas que se mueven por voltaje, éstas se controlan por la diferencia de potencial eléctrico de la membrana celular. Si hay una fuerte carga negativa en el interior, las puertas de sodio estarán cerradas, pero si pierden parte de la carga negativa se abrirán de forma brusca dejando pasar el sodio. Por otro lado, si la membrana interna se carga positivamente la puerta que se abre es la de potasio, aunque de forma mucho más lenta.

El potencial de acción se genera cuando el potencial de membrana de una célula se despolariza por encima de un determinado umbral, efecto que suele durar unos milisegundos. En este tiempo, se produce un cambio muy rápido de la polaridad de la membrana de negativo a positivo (despolarización) y vuelta al negativo (repolarización), terminando con una fase de hiperpolarización antes de volver al nivel de reposo (*Bakkum et al., 2013*).

La propagación del potencial de acción se produce cuando una parte de la membrana se despolariza y se abren los canales de sodio, momento en el que entran los iones de sodio. Una vez dentro, los iones de sodio, que son positivos, desplazan a los iones próximos a lo largo del axón por repulsión electrostática, atrayendo los iones negativos de la membrana adyacente. En este momento en la membrana adyacente, se produce un efecto de despolarización y el proceso se repite provocando un desplazamiento del potencial de acción a través del axón.

La capacidad de la membrana determina la velocidad de propagación del potencial de acción. La mielina separa ambos lados de la membrana aumentando la distancia y como consecuencia disminuye la capacidad asociada. El resultado es una conducción rápida en las secciones con mielina porque no se generan los potenciales de acción que obligan a los iones a desplazarse hasta el siguiente nodo de Ranvier, punto en el que se encuentra una concentración superior de canales de sodio y que permite la regeneración del potencial de manera más eficiente. El resultado final es que los potenciales de acción se desplazan entre los nodos de Ranvier a una velocidad superior que en el caso de los axones mielínicos (*Bakkum et al., 2013*).

Así pues el potencial de acción es la señal que viaja del sistema central al periférico para producir una acción, como puede ser una contracción en el músculo, de igual manera el sistema sensorial envía señales al sistema central. Como el potencial de acción es debido al movimiento de cargas, y éste a su vez a la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana del axón, se deduce que si se modifica el potencial o la concentración de cargas es posible generar un potencial de acción que se propagará. Esto lleva a considerar que es posible generar un potencial de acción artificialmente a partir de una inyección de carga en las proximidades de un axón o bien aplicando una diferencia de potencial a lo largo del mismo. Aunque, las dos opciones son válidas si se aplica una diferencia de potencial entre dos puntos, no se controla exactamente las cargas inyectadas, que en sí son las que producen el potencial de acción, por tanto una estimulación por corriente es mejor. Otra consideración en la estimulación es que el potencial de acción sigue un funcionamiento de activación o no activación, lo que implica que la modulación de la respuesta se produce modificando la frecuencia de los estímulos o de los potenciales de acción generados.

También, se puede conseguir visualizar el potencial de acción si se registra en dos puntos distantes del axón porque al propagarse se produce una diferencia de potencial característica del propio potencial de acción.

De la estimulación de los axones eferentes se puede lograr realizar una acción sobre los músculos, mientras que una estimulación aferente puede provocar una sensación que se reconocerá en el sistema central. De igual manera, el registro de señales eferentes puede permitir identificar las acciones que se realizan, mientras que el registro aferente puede determinar las sensaciones que se tienen.

## **ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE FIBRAS NERVIOSAS**

En 1939 fue Coons quien introdujo por primera vez, un nuevo concepto en el diseño de la técnica histoquímica, basado en el uso y aprovechamiento de la

especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, mediante el uso de anticuerpos acoplados a trazadores fluorescentes. Así se inició el desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas. Actualmente, estas técnicas son de uso común y se han generalizado tanto en la experimentación biológica como en el uso del diagnóstico histopatológico.

La mayoría de los anticuerpos utilizados en las técnicas inmunohistoquímicas pertenecen a las IgGs: grandes glicoproteínas formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuros. Cada molécula completa de IgG posee dos sitios idénticos de unión al antígeno a través del fragmento Fab. El fragmento cristalino, Fc, es capaz de unirse a una gran variedad de moléculas (IgGs, proteína A, etc.), lo cual facilita la visualización de la reacción inmunológica a través del marcaje de estas últimas.

Como ocurre en el caso de todas las técnicas experimentales, para la técnica inmunohistoquímica se pueden describir cinco criterios de fiabilidad, (*Petrusz et al, 1980*): eficacia, exactitud, precisión, sensibilidad, y especificidad.

La eficacia proporciona información sobre la relación que existe entre la intensidad de la reacción específica y el fondo. La exactitud relaciona un valor dado en ensayos cuantitativos, con el valor real. En inmunohistoquímica, la exactitud depende en gran medida del microscopio que se utilice; en particular, en la técnica del PAP este valor es de 20-80 nm. La precisión se refiere a la reproductibilidad de las medidas.

Las técnicas inmunohistoquímicas, una vez estandarizadas, presentan un alto grado de precisión; sin embargo, este valor no puede expresarse matemáticamente, ya que los resultados están en función de variaciones en la técnica, los reactivos utilizados, la obtención de antisueros, etc. La sensibilidad en inmunohistoquímica se puede definir como la menor concentración de un antígeno presente en un tejido que es posible distinguir del fondo. Finalmente, la especificidad de esta técnica da cuenta de la capacidad del anticuerpo para detectar un determinante antigénico en particular, excluyendo el otro, (*Sternberger et al., 1970; Mohammadi et al., 2013*). A pesar de la especificidad del anticuerpo, en la aplicación de la técnica inmunohistoquímica se debe satisfacer también la especificidad del método, es decir, durante el transcurso de la reacción todos los reactivos utilizados han de ser selectivos, de forma que no reaccionen con ningún otro componente tisular (*Watanabe et al., 2013*).

Aunque existen diversos trazadores enzimáticos que se han utilizado en inmunohistoquímica (fosfatasa alcalina, citocromo oxidasa, fosfatasa ácida...), la peroxidasa de rábano resulta ser el trazador enzimático más ampliamente utilizado. Además de su idoneidad para la detección a nivel de la microscopia óptica, el producto del revelado con diaminobenzidina (DAB), (*Karnowsky, 1965*), tras su posterior osmificación, resulta opaco a los electrones. La peroxidasa ofrece, además, la posibilidad de ser aplicada en los diversos sistemas de detección indirecta del antígeno, contribuyendo a aumentar la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica, que desarrollada inicialmente para la microscopia óptica, se puede aplicar a la localización ultraestructural (PAF, Avidinabiotina, intensificación con plata...). El principal inconveniente resulta ser la dificultad en la cuantificación de la reacción y cierta difusión del producto de la reacción que limita, en cierto sentido, su resolución a nivel ultraestructural (*Watanabe et al., 2013*).

## **ESTUDIO POR ANÁLISIS DE IMAGEN DE FIBRAS NERVIOSAS**

El análisis de imagen es una técnica que está tomando un impulso cada vez mayor en ciencias biomédicas ya que cuenta con numerosas aplicaciones. Es en la década de los 80 cuando comienza su utilización en biomedicina ya que anteriormente se aplicaban plantillas y métodos caseros para cuantificar estructuras o como máximo se contaba con planímetros para medir áreas, perímetros, número de células, etc. El desarrollo de esta tecnología se debe en parte a que el coste de los ordenadores bajó considerablemente, así como al incremento de la potencia de los mismos y al desarrollo de equipos y tarjetas especializadas para el proceso de imágenes, (*Moragas A, 1984; Kísner HJ, 1988*).

Las técnicas de análisis de imagen suponen la realización de medidas y la obtención de valores directamente sobre un documento digital, apoyándose sobre

imágenes visualizadas en el monitor del ordenador. La digitalización de una imagen consiste en la conversión de un sistema analógico, es decir, sin coordenadas espaciales de referencia y con amplitud continua, a un sistema digital, que es discreto. La imagen, es la función de una magnitud física proyectada sobre una superficie plana, en el caso de imágenes monocromas (tonalidades de gris o blanco y negro).

Una vez digitalizada, la imagen se realza y mejora con filtros y funciones adecuados para cada aplicación, con el fin de binarizarla (consiste en extraer de la imagen las estructuras que se quieren valorar) y asociarla a procesos tópicos de morfología matemática (para realizar medidas, contajes, etc.).

## **5.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN NERVIOSA**

Cuando se lesiona el axón, la neurona se divide en dos partes y esto desencadena unas consecuencias inmediatas y otras a largo plazo, no sólo para los componentes distales, sino también para los proximales, incluyendo el propio cuerpo neuronal. Los receptores distales también sufren un proceso de degeneración por falta de uso. El axón tiene que crecer y progresar a veces largas distancias hasta lograr el objetivo. Además, la lesión nerviosa tiene consecuencias inmediatas en la corteza cerebral, que debe reorganizarse funcionalmente con mucha rapidez. La regeneración nerviosa es un proceso biológico complejo en el cual interviene sobre todo la neurona, pero además, las células de Schwann, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos (Lundborg & Danielsen , 1991; Wright & Jobe, 1992; *Antoine JC, 1999; Brushart TM, 1999*).

### **Cambios proximales a la lesión**

Cuando las lesiones son muy cercanas al cuerpo neuronal, algunas células pueden incluso morir por pérdida de axoplasma. En las que sobreviven, se produce edema del cuerpo, desplazamiento del núcleo celular hacia la periferia y desaparición del material basófilo del citoplasma (cromatolisis). Aumenta el RNA y la síntesis proteica (*Grafstein B, 1975; Goldberg & Barres, 2000*).

### **Cambios en el foco de la lesión**

A los pocos días los axones lanzan unos brotes o "filopodios" terminales y laterales que avanzan en busca de un tubo endoneural distal. Estos filopodios están continuamente moviéndose y explorando el entorno que los rodea. Todo este proceso está influenciado por "contacto guía" del axón y por la composición molecular del

ambiente, que puede ser atractiva o repelente para el desarrollo axonal (quimiotaxis), cuya existencia fue demostrada por Cajal (*Cajal RS, 1928*). Existen también factores neurotróficos y factores promotores del crecimiento axonal, secretados por los macrófagos y las células de Schwann, que favorecen la regeneración.

La supervivencia de las células nerviosas en condiciones normales depende de la influencia trófica de las células del territorio de inervación distal autónomo de dicho nervio. Los factores tróficos producidos por aquéllas se transmiten por transporte axonal retrógrado hasta el cuerpo de la neurona. Normalmente hay una baja concentración de factores neurotróficos; sin embargo, cuando se produce una sección del nervio, los niveles de estos factores se incrementan notablemente y se cree debido a los macrófagos que invaden el foco. Por tanto, los macrófagos son células pluripotenciales que participan en la degradación de la mielina y además, en la síntesis de factores neurotróficos (*Nathan CF, 1987; Goldberg & Barres, 2000*).

### **Cambios distales a la lesión**

Se desintegra la parte del axón que ha quedado sin contacto con el cuerpo neuronal y se destruye la mielina que es fagocitada por las células de Schwann y los macrófagos, todo este proceso se conoce con el nombre de degeneración walleriana. Al final, las células de Schwann se ordenan en columnas dentro de los tubos endoneurales, los cuales quedan preparados para recibir el nuevo axón.

Entre el sistema extrínseco e intrínseco se forma una rica red anastomótica que conecta ambos sistemas en sentido longitudinal y en sentido radial. Los troncos nerviosos son relativamente resistentes a la isquemia, la cual sólo se produce cuando existen lesiones vasculares o microvasculares extensas. En caso de isquemia del nervio, las lesiones se producen con mayor frecuencia en la zona centrofascicular que en la zona subperineural, probablemente debido a que esta última contiene mayor densidad de capilares y a que las sustancias nutritivas pueden difundirse a través del perineuro. No obstante, las escasas necesidades energéticas del nervio, que son muy inferiores al aporte normal, así como la posibilidad de funcionar parcialmente en anaerobiosis, parecen contribuir a la resistencia a la isquemia.

Estos tubos no se neurotizan, aparece la fibrosis y su calibre se reduce, impidiendo el paso de los axones. Las terminaciones que enfilan un tubo endoneural van creciendo a una velocidad de aproximadamente 1 mm al día. El crecimiento axonal es más rápido cuanto más proximal sea el nivel de la lesión. Para este crecimiento axonal son fundamentales dos proteínas que se encuentran en la membrana basal de la célula de Schwann, la laminina y la fibronectina (*Baron-Van Evercooren et al., 1982; Goldberg & Barres, 2000*). El axón que hace conexiones con los órganos distales adecuados es estimulado para crecer, se ensancha y madura. Los otros se reabsorben y desaparecen. Se mieliniza o no, dependiendo de la estructura originaria de la fibra.

Cuando el axón contacta con el órgano diana se debe reconstruir la sinapsis y recuperarse el órgano de sus cambios atróficos sufridos durante el periodo de denervación. Como las fibras musculares se atrofian y se dañan irreversiblemente hacia los 18 meses, habremos de tener en cuenta la distancia desde la lesión y el tiempo transcurrido, para prever las posibilidades de recuperación.

## **HISTOLOGÍA DE LA DEGENERACIÓN WALLERINA**

*Waller en 1850*, fue el primero en descubrir las alteraciones que se producían tras la sección de un nervio. A él debe su nombre la denominada degeneración Walleriana que explica el conjunto de cambios que se producen en el segmento distal de un tronco nervioso después de haber sufrido una lesión que cause interrupción axonal.

En las primeras 12 horas que siguen a la sección axonal, no se observan signos de degeneración, excepto una cierta laxitud en la vaina de mielina que se acompaña de un aumento de actividad enzimática en el extremo distal del nervio.

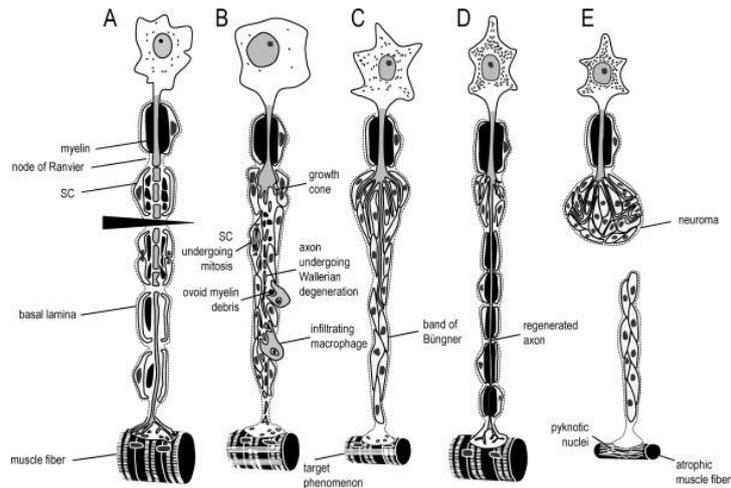
A las 24 horas de la sección, se produce una abundante reacción tisular en el lugar de la lesión y se inicia una proliferación de tejido perineural procedente de ambos extremos, proximal y distal, hacia la zona de interrupción.

Al segundo y tercer día, la alteración de la vaina de mielina es más intensa y los cambios axonales se hacen visibles. La mielina comienza a segmentarse y se separa formando hileras de ovoides y elipsoides, entre los que se incluyen fragmentos axonales. Ya Cajal observó que la segmentación de la vaina de mielina tiende a ocurrir en las segmentaciones de Schmidt-Lanterman (*Cajal SR, 1905; Cajal SR, 1928*). Esta fragmentación de la vaina de mielina, está asociada con hipertrofia e hiperplasia de las células de Schwann, (*Bradley & Adsbury, 1970*). Finalmente todas las fibras del extremo distal degeneran.

Hacia el cuarto día, una importante actividad mitótica se hace evidente en la población de células de Schwann, en la parte más distal del cabo proximal y por completo en el cabo distal. Las células de Schwann proliferantes se alinean de forma longitudinal, dando lugar a las llamadas bandas de Büngner, en el interior de los tubos de Schwann. Ya *Thomas en 1964*, sugirió la posibilidad de que las células de Schwann sintetizaran un precursor de colágeno, que condicionara su agrupamiento alrededor de los tubos de Schwann.

Al octavo día de la sección, un corte longitudinal de la porción distal del nervio muestra una gran cantidad de glóbulos orientados longitudinalmente que corresponden a productos de degeneración de mielina que se cruzan con cabos ondulantes de proliferación de células de Schwann. Cuando el proceso regenerador procedente del cabo proximal falla, los tubos de Schwann encogen y el extremo distal del nervio se va contrayendo y siendo reemplazado por tejido conectivo quedando de él solamente un esqueleto (*Yao et al., 2013*).

Finalmente, en los días siguientes el axón y la mielina degenerados de los muñones distales de nervios periféricos cortados atraen macrófagos del endoneuro, que fagocitan el material degenerado. Se sabe que las células de Schwann colaboran activamente en la resorción de las fibras de mielina, al adquirir una actividad fagocítica, ayudando a suprimir los restos en la zona lesionada (*Lassner et al., 1989; Yao et al., 2013*).



**Figura 1. 6 Histología de la degeneración Walleriana.**

Proceso de degeneración Walleriana del nervio periférico, que conduce al desarrollo de un neuroma proximal a la sección, y una interrupción de los estímulos distales al órgano diana.

## **HISTOLOGÍA DEL PROCESO DE REGENERACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO**

Cuando se produce daño en los nervios periféricos, los axones y la mielina asociada a ellos se degeneran (degeneración Walleriana). Estos restos celulares son removidos por las células de Schwann y por los macrófagos invasores. Los macrófagos a su vez producen factores mitogénicos que permiten que las células de Schwann sobrevivientes proliferen sobre los tubos de membrana basal que rodean las fibras nerviosas originales. Estos tubos formados por células de Schwann y rodeadas de lámina basal sin axones se conocen como bandas de Büngner que Cajal describió como “el cordón tutorial”.

Otros investigadores de principios del siglo XX atribuyeron a la falta de capacidad regenerativa del sistema nerviosa central la ausencia de células de Schwann en este sistema. Sin embargo, varios experimentos han mostrado que para crecer, los

axones requieren no sólo estar acompañados de las células de Schwann, sino que ciertos componentes de la lámina basal (laminina, colágena tipo IV, entactina y otros) actúen como potentes promotores del crecimiento de neuritas (*Ide et al, 1983; Howard et al., 2013*). Esto se ha demostrado con un segmento de nervio periférico que se congela y se descongela, de manera que las células de Schwann se mueren, pero la lámina basal que las rodea permanece intacta. Cuando el nervio tratado de esta manera se trasplanta al muñón proximal de un nervio axotomizado de otro animal, los axones se regeneran a través del nervio trasplantado pero sólo por una corta distancia. Estos axones migran acompañados de las células de Schwann presentes en el muñón del nervio proximal. Por otro lado, si las células de Schwann presentes en el nervio proximal se inactivan con agentes citotóxicos, se observa en los axones muy poca o ninguna regeneración. De la misma manera, si la lámina basal se desnaturaliza por calor, además de congelarla y descongelarla, los axones no penetran en el trasplante hasta que las células de Schwann migran primero del nervio proximal a los remanentes extracelulares del trasplante (*Sketelj et al, 1989*). Experimentos in vitro son también ilustrativos: cuando las células de Schwann crecen en condiciones que no forman la lámina basal, son capaces de promover el crecimiento axonal de las neuronas periféricas. De la misma forma, cuando las células de Schwann crecen en condiciones que depositan lámina basal al medio y después se remueven, la matriz extracelular que las células generaron sobre las cajas de cultivo es también eficaz en promover el crecimiento axonal de las neuronas del sistema nervioso periférico (*Feneley et al., 1991*). En conclusión, estos experimentos demuestran que tanto las células de Schwann como la lámina basal son importantes en promover una regeneración axonal exitosa en el sistema nervioso periférico.

Desde las primeras horas siguientes a la sección nerviosa, existe una evidencia de actividad regenerativa con profusión de brotes axonales, formados preferentemente a expensas de las fibras amielínicas del muñón proximal. Estos brotes, se dirigen por contacto con las superficies y no por factores intrínsecos hacia los tubos de Schwann del fragmento distal. El descubrimiento del factor de crecimiento nervioso puso de manifiesto que el proceso de regeneración axonal se veía notablemente influenciado por los factores de crecimiento. *Seckel et al. en 1986*, demostraron la gran importancia del extremo distal nervioso en la producción de factores de crecimiento necesarios para el proceso regenerador. El crecimiento masivo de células perineurales, fibroblastos y células de Schwann desde el extremo proximal y distal, da lugar a un puente por el cual

los axones regenerantes pueden alcanzar el extremo distal, (*Thomas PK, 1964*). Posteriormente, estos axones regenerados continúan por los tubos de Schwann, progresando por el fragmento distal sin obstrucción.

En su progresión, estos axones son englobados por el citoplasma de las células de Schwann que han proliferado en gran cantidad. En el caso de las fibras mielínicas, estos axones sufren un proceso de selección que condiciona la permanencia del mayor de ellos, único que se beneficia del proceso de mielinización. Estas fibras mielínicas, aunque estructuralmente semejantes a las normales, son de tamaño más pequeño y no es extraño encontrar la presencia de dos fibras mielínicas en el interior de la vaina de Schwann (*Fricker et al., 2013*).

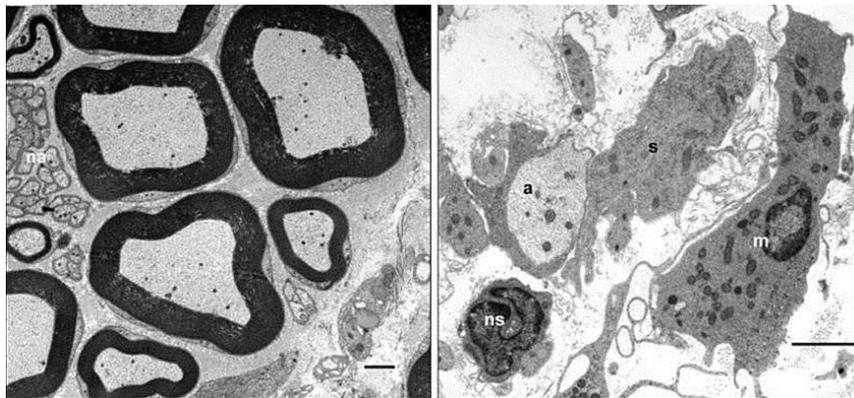


Figura 1. 7 **Histología del proceso de regeneración del nervio periférico.**

Electromiograma de la sección del nervio ciático de los controles y de las ratas tratadas. A) Axones mielinizados de tamaño grande y pequeño y axons no mielinizados en una rata control. Los axons mielinizados se rodean por una capa compacta de mielina, citoplasma de la célula de Schwann y lámina basal. Se observan varios conjuntos de axons no mielinizados (na) en el borde izquierdo, rodeados por la lámina basal de una célula de Schwann no productora de mielina. B) Axon desmielinizado (a) rodeado por una célula de Schwann (s) con su lámina basal. Axón no mielinizado y su célula de Schwann asociada (ns) que ha sido seccionada a través de su núcleo. Una célula grande elongada nucleada (m) con pseudópodos y sin lámina basal, asociada a un macrófago activado.

**Valentine** HL, Does MD, Marshall V, Tonkin EG, Valentine WM. Multicomponent T2 analysis of dithiocarbamate-mediated peripheral nerve demyelination. *Neurotoxicology*. 2007;28(3):645-54.

Estos hechos hacen suponer que el afrontamiento de los cabos nerviosos debe ser perfecto, para permitir el contacto entre los brotes axonales del polo proximal y la vaina de Schwann del polo distal. En caso contrario, los axones crecen a partir del extremo proximal, pero no pueden penetrar en los tubos Schwannianos del cabo distal y

dan lugar a una masa desorganizada o traumática, mientras que las células de Schwann del extremo distal proliferan de forma anárquica originando un neuroma.

Cuando la regeneración se alcanza gracias a un injerto, inicialmente, el espacio del injerto se rellena con una sustancia rica en moléculas neurotróficas y precursores de la matriz celular. Durante la primera semana, el fluido se sustituye por una matriz fibrosa acelular, fibronectina positiva, laminina negativa, que a continuación es invadida por células (células perineurales, fibroblastos, células de Schwann y células endoteliales) que crecen desde ambos cabos, proximal y distal, para formar un cable de tejido en el centro del tubo. Los axones son los últimos elementos en introducirse en los tubos, algunos días después de la aparición de las células no neuronales. Es ampliamente aceptado que no crecerán más de unos pocos centímetros en la ausencia de un microambiente facilitador (*Moore et al., 2011*).

Lo que impone el límite aparente en el alargamiento axonal no se conoce, pero puede ser consecuencia de un suministro inadecuado de células (*Fricker et al., 2013*). Así, las células germinales derivadas pueden simplemente dejan de dividirse, o su tasa de división puede disminuir a un punto en el que la oferta puede dejar de seguir el ritmo de demanda, o pueden perder su fenotipo migratorio.

### **La importancia del muñón distal**

El muñón distal del nervio juega dos papeles diferentes en el proceso de reparación: inicialmente atrae a los axones regenerados y luego apoya su elongación dentro de las bandas persistentes de Büngner. *Forssman en 1900* fue probablemente el primero en formular el concepto de neurotropismo (quimiotaxis). *Cajal en 1928* demostró posteriormente que el muñón distal de un nervio seccionado ejerce un potente efecto atrayente sobre los axones que crecen desde un muñón proximal vecino, incluso cuando los dos muñones no son correctamente alineados. Desde la década de 1980, numerosos estudios utilizando tubos en forma de “Y” y otros tejidos, han confirmado la hipótesis, y demuestran que un muñón distal puede atraer axones a distancias de 1 cm (*Politis et al. 1982*). Se supone que los axones responden y crecen a lo largo de un gradiente químico de moléculas trópicas secretadas por las células dentro del cabo

distal. Es poco probable que incluyan al NGF (*Doubleday & Robinson, 1995*) y que sean exclusivamente neurotrópicos, ya que así pueden actuar sobre las células de Schwann y fibroblastos endoneurales que acompañan a la regeneración de los axones (*Williams et al 1993; Abernethy et al. 1994; Gordon T, 2009*).

La participación de las células de Schwann que responden adecuadamente es fundamental para la regeneración axonal en el SNP. Dos o tres días después de la lesión del nervio, las células de Schwann proliferan en el muñón distal. Sus células hijas permanecen indiferenciadas dentro de los tubos de la lámina basal y, si se les priva del contacto axonal, pronto dejan de dividirse. Una fase secundaria transitoria de la proliferación se produce si los axones alcanzan las células de Schwann (*Pellegrino & Spencer, 1985*). Las señales derivadas del axón, ya sea actuando por contacto directo o por moléculas difusibles, conduce la expresión de numerosos genes de las células de Schwann durante el desarrollo (*Jessen et al., 1994; Gordon T, 2009*), y probablemente también durante la regeneración (*Gupta et al. 1993*). El contacto funcional de células de Schwann y el axón se establece en las bandas de Büngner. Estudios in vitro han demostrado que el contacto axonal es generalmente necesario para la deposición de células de Schwann en la matriz extracelular (*Bunge, 1993*): hay evidencia de que los fibroblastos endoneurales también pueden secretar factores que estimulen la deposición de lámina basal por células de Schwann en ausencia de axones (*Obremski et al. 1993, 1995*).

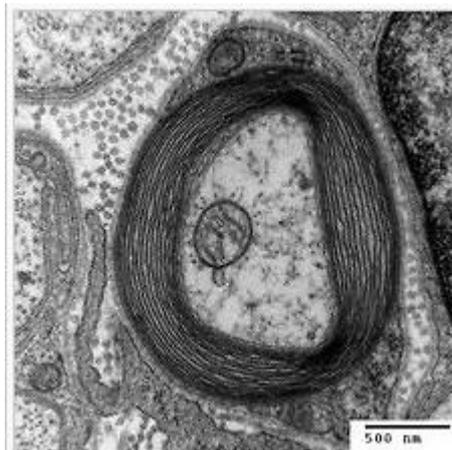


Figura 1. 8 **El muñón distal.**

Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un axón mielinizado. Imagen generada por el Electron Microscopy Facility en el Trinity College, Hartford, CT.

## El papel de la lámina basal

En el contexto de la regeneración axonal, ciertas moléculas que contiene la lámina basal, en particular la fibronectina, la laminina y el sulfato de heparina promueven la elongación axonal in vitro e in vivo (*Sandrock & Matthew, 1987; Giftchristos & David, 1988; Rogers et al., 1988; Tomaselli & Reichardt, 1988; Toyota et al., 1990; Wang et al., 1992; Bryan et al., 1993; Kauppila et al., 1993*).

En un contexto biológico más amplio, se ha demostrado que la unión célula-laminina in vitro afecta a fenómenos tan diversos como la migración celular, la división de la difusión, y el mantenimiento del fenotipo diferenciado (*Timpl & Brown, 1994; Karlsson et al., 2011*).

La lámina basal derivada de células de Schwann parece ser una estructura muy duradera. Sobrevive a la penetración por la invasión de macrófagos durante las fases agudas de la degeneración walleriana o a la desmielinización primaria, y persiste crónicamente en los muñones distales denervados, donde rodea las pilas reducidas de citoplasma de la célula de Schwann, que constituyen las bandas supervivientes de Büngner.

Presumiblemente la lámina basal pueda someterse a una reparación con el tiempo, debido a que sus bucles redundantes asociados con bandas de Büngner recién denervadas están ausentes en el endoneuro de nervios crónicamente denervados (*Feneley et al., 1991; Karlsson et al., 2011*).

Los axones y células de Schwann crecen preferentemente a lo largo de la cara interna de la lámina basal en lugar de en asociación con su exterior, la cara extracelular.

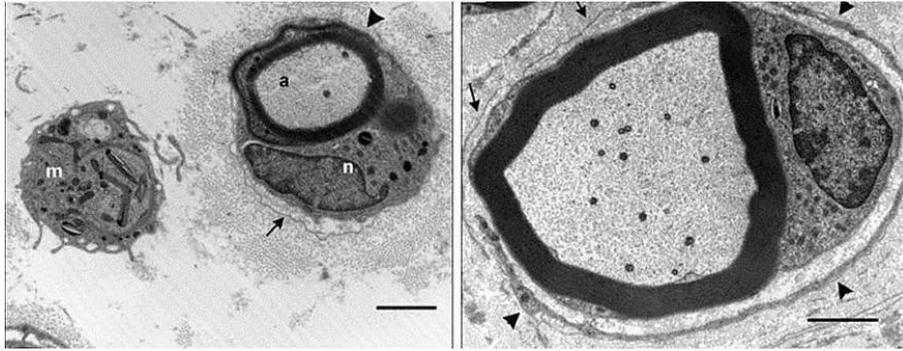


Figura 1. 9 **La lámina basal.**

Imagen de microscopía electrónica de la sección del nervio ciático de las ratas control y de las tratadas. (C) Axón mielinizado (a) rodeado por lamina basal persistente (flecha). La célula nucleada asociada (n) parece ser una célula de Schwann mielinizante seccionada a través de su núcleo y una incisura de Schmidt-Lanterman (punta de flecha) o un macrófago que se ha infiltrado en la cobertura de la lámina basal y es la inserción entre las láminas de mielina (punta de flecha). (D) Un axón remielinizándose y su célula de Schwann actual, rodeados de lámina basal (flechas) de las células de Schwann y una célula de Schwann supernumeraria (puntas de flecha). **Valentine** HL, Does MD, Marshall V, Tonkin EG, Valentine WM. Multicomponent T2 analysis of dithiocarbamate-mediated peripheral nerve demyelination. *Neurotoxicology*. 2007;28(3):645-54.

## 6.- ALTERACIONES NEUROBIOLÓGICAS INDUCIDAS POR LA LESIÓN

Las alteraciones neurobiológicas en las neuronas y células de Schwann son importantes para desencadenar la regeneración del sistema nervioso periférico. Después de la sección de un nervio, las proteasas dependientes de calcio se activan en el axón, distal al sitio de la lesión. De este modo, la parte distal de los axones se desintegra y las células de Schwann pierden rápidamente la vaina de mielina que rodea al axón. Los macrófagos invaden el segmento distal del nervio para eliminar la mielina y las partes restantes del axón. Las células de Schwann reaccionan muy rápidamente ante la lesión del nervio con la expresión de factores asociados a la regeneración cruciales (*Mårtensson et al., 2007; Dahlin et al., 2008*).

Algunas células de Schwann incluso mueren después de la lesión. La gran variedad de factores que desarrollan el estado regenerativo o la muerte celular (apoptosis) son controlados por vías específicas de señales intracelulares iniciadas después de la lesión. Se activan distintas vías de transducción de señales con la activación de receptores y un número de eventos en la célula que conducen a cambios genéticos con el propósito de transformar las células a una condición regenerativa. Las diferentes vías de transducción de señales se activan, por lo general por la fosforilación de la etapa subsiguiente, en las células. En las células de Schwann, la quinasa que regula la señal extracelular (Erk 1/2) se fosforila rápidamente cerca de la sección; un proceso para el que se requiere la proliferación de las células de Schwann (*Mårtensson et al., 2007*).

Otro factor importante es la activación del factor de transcripción 3 ATF3 (*Tsujino et al., 2000*), que se expresa en las células de Schwann dos días después de la lesión, importante para la excrecencia de los axones después de una lesión (*Hunt et al.,*

2004; Saito & Dahlin, 2008). El número de ATF3 que expresan las células de Schwann se correlaciona con la longitud del crecimiento de los axones, que además suelen crecer cerca de las células de Schwann que expresan dicho factor (Saito et al., 2008). Las células de Schwann proliferan en el segmento distal del nervio. Curiosamente, las células de Schwann pierden su capacidad para producir factores que son necesarios para el crecimiento axonal (Kataoka et al., 2007; Hall S, 2005). Si hay una denervación prolongada del segmento distal del nervio las células de Schwann dejan de responder. En terminaciones nerviosas crónicamente denervadas, las células de Schwann regulan a la baja la expresión de los receptores de c-erbB (Li et al., 1997), el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) (Hoke et al., 2002) y el ATF3 (Kataoka et al., 2007).

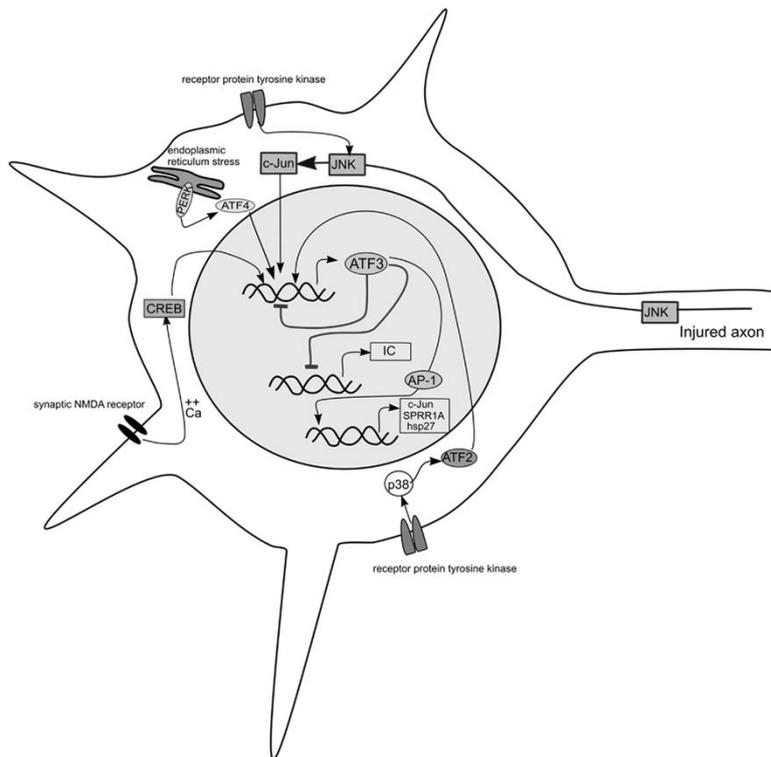


Figura 1. 10 La activación del factor de transcripción 3 ATF3.

Diagrama que muestra la inducción de ATF3 en una neurona por diferentes estímulos y su efecto sobre algunos de los objetivos relevantes para la regeneración axonal. Las vías de inducción de la expresión de ATF3 incluyen axotomía, la estimulación del receptor de la proteína tirosín-quinasa, la activación del receptor de NMDA sináptico y de estrés del retículo endoplásmico. ATF3 muestra la represión de su propia expresión y la de citocinas inflamatorias (IC) y, con otros AP-1 factores, la activación de la transcripción de c-Jun, SPRR1A, y hsp27.

La neurona y el extremo proximal del nervio, que contiene los axones, reaccionan al trauma con la activación de vías de transducción similares a las células de Schwann. Más importante aún, la sección del axón induce señales que se transfieren hasta el soma en cuestión de segundos a minutos (primera fase), así como tras horas, días o semanas de la lesión. El sistema de transporte intracelular o axonal transfiere información desde el lugar de la lesión por transporte retrógrado. Las señales retrógradas transportadas incluyen factores ya sean formados en el axoplasma en el sitio de la lesión o liberados de las células en el medio ambiente y recogidos en el sitio de la lesión. El complejo de factores y señales de localización nuclear que se transfieren por transporte retrógrado son necesarias para transferir proteínas importantes a través de los poros nucleares (Hanz *et al.*, 2003). Éstos son buenos mecanismos de control en las neuronas para regular retrógradamente la señalización de lesiones en los nervios periféricos (Yudin *et al.*, 2008).

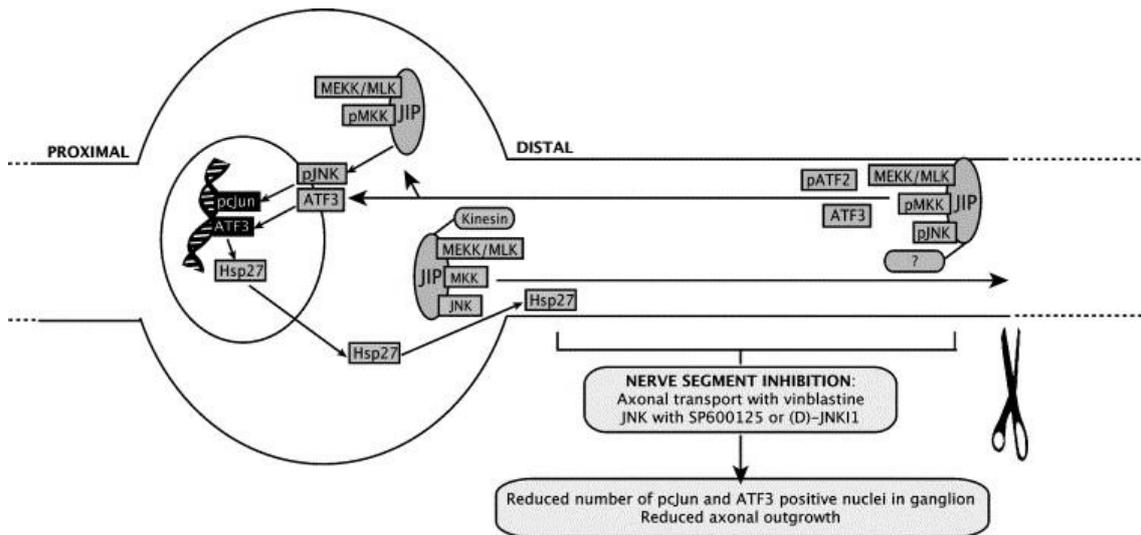


Figura 1. 11 **Transporte axonal retrógrado.**

Las proteínas endógenas, incluyendo JNK y proteínas de señalización de JNK-relacionadas, pueden transmitir información de una lesión distal al cuerpo de la célula neuronal en neuronas sensoriales de la rata adulta. En el nervio ciático ligado, encontramos un transporte axonal retrógrado de JNK quinasas retrógrado, en sí p-JNK, y la interacción de proteínas JNK, JIP. También encontramos un transporte axonal retrógrado de los factores de transcripción p-ATF2 y ATF3, pero no, o muy poco, el transporte axonal de pc-Jun. Además, se encontró un transporte axonal anterógrado de Hsp27. Estos resultados pueden indicar que un módulo de JNK es transportado retrógradamente en el axón como resultado de una lesión axonal. Esta respuesta, y el transporte axonal de diversos factores de transcripción, pueden a su vez conducir a la iniciación de la respuesta del cuerpo de la célula mediante la unión del factor de transcripción, ATF3, y la activación, c-Jun, y la posterior inducción de la transcripción, activando las proteínas implicadas en la regeneración, tales como Hsp27. Lindwall C, Kanje M. Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29(2):269-82.

La "señal negativa" es la pérdida de información normalmente transportada retrógradamente, contribuyendo aún más a la señalización intraneural. Estas señales positivas y negativas (segunda fase) alcanzan el soma en horas o días, mientras que una tercera fase se caracteriza por otras señales positivas procedentes de los alrededores del cono de crecimiento o formado por las señales que son liberadas por las células en el sitio de la lesión. Las señales inician la expresión de genes en el núcleo de la célula.

En la fase final, como respuesta a la sección, es probable que haya señales de los axones en crecimiento, particularmente cuando se reinerva el músculo diana. Estas señales implican que el resultado directo de los axones debe finalizar. Curiosamente, algunas de las alteraciones inducidas, tales como el factor de transcripción ATF3, son espontáneamente reguladas en las neuronas, no sólo en las células de Schwann, con el tiempo. Esto puede ser uno de los factores detrás de la alteración de la regeneración, cuando hay un retraso en la reparación del nervio (*Kataoka et al., 2007; Saito et al., 2008*). Las reacciones de las células de Schwann y los cambios intracelulares en las neuronas, particularmente en el cono de crecimiento, son factores que explican el efecto de la lesión (*Lund et al., 2002*).

La muerte celular programada es activada por moléculas pro-apoptóticas, que son liberadas de las mitocondrias o a través de receptores de muerte celular. Hay una reacción diferente de las neuronas motoras y sensoriales no sólo con respecto a factores asociados a la regeneración, sino también con respecto a la apoptosis. Las neuronas sensoriales muestran una muerte celular más amplia que las motoras en el tiempo (hasta 40% de las neuronas sensoriales en la raíz dorsal de los ganglios pueden morir) si una lesión en el nervio no se repara. Sin embargo, la muerte celular de ambos tipos de neuronas puede disminuirse si se realiza una reparación temprana de los nervios (*Ma & Eisenach, 2003*).

La apoptosis es un evento de inicio muy temprano (las posibilidades farmacológicas para reducir la apoptosis tendrían que ser iniciadas dentro de las 24 primeras horas), como la N-acetil-cisteína para la muerte celular sensorial (*McKay et al., 2002; West et al., 2007*).

Cuando el tronco de un nervio se lesiona y los extremos de los nervios están unidos quirúrgicamente, los axones crecen a partir del segmento proximal del nervio en

el segmento distal del nervio. La consecuencia es un proceso muy delicado en el que un gran número de señales de transducción, se integran en el cono de crecimiento donde se polimeriza la actina para restaurar los microtúbulos.

En estos procesos, destaca el papel de las integrinas, que interactúan con la matriz (*Dahlin et al., 2008*). En el cabo distal, se forma un gran número de brotes en cuyas puntas se desarrolla un cono de crecimiento, que palpa el medio ambiente con el propósito de encontrar la mejor dirección de crecimiento. Si hay señales positivas de orientación del cono de crecimiento, los brotes se encaminan en esa dirección (atracción), mientras que la orientación negativa conduce al colapso (repulsión) obligando al cono de crecimiento a seguir otro camino.

En el espacio entre el segmento nervioso proximal y distal, se produce una respuesta inflamatoria y una matriz de fibrina, con macrófagos. Las células de Schwann pueden migrar desde ambos extremos, donde participan en el crecimiento axonal (*Brandt et al., 1999; Scherman et al., 2001*).

## 7.- ETIOPATOGENIA DE LA LESIÓN NERVIOSA

Los traumatismos de los nervios periféricos se asocian con múltiples tipos de agentes lesivos que pueden ser (*Sánchez-Martín MM, 1987; Burnett & Zager, 2004*):

- Abiertos: suelen afectar a nervios superficiales, como el mediano, el cubital o el ciático poplíteo externo. En un porcentaje muy elevado necesitan la intervención quirúrgica. Pueden ser heridas incisas limpias, o heridas contusas; las primeras con mejor pronóstico.
- Cerrados: se lesiona el nervio sin haber solución de continuidad en la piel. Puede producirse por tres mecanismos:
  - o Compresión del nervio de fuera a dentro: se produce, por ejemplo, un manguito neumático utilizado para mantener isquemia en los miembros durante la cirugía, si se mantiene mucho tiempo o a demasiada presión.
  - o Compresión del nervio de dentro a fuera: cuando la fuerza de compresión está dentro del miembro, por ejemplo, la compresión del nervio mediano en una luxación anterior del hueso semilunar o una espícula ósea en una fractura.
  - o Tracción o estiramiento: es el mecanismo más frecuente de los tres, ocurre cuando se tracciona un miembro con una fuerza excesiva, como en las lesiones del plexo braquial, o en algunas fracturas, como las del húmero, que pueden estirarse el nervio radial.
- Post inyección: las inyecciones en el nervio pueden lesionar a éste por el efecto mecánico de la aguja y el líquido, o por el efecto químico irritativo del líquido; el nervio más frecuentemente lesionado por este mecanismo es el ciático.

- Isquemia: la isquemia del nervio produce necrosis y destrucción del tejido nervioso. En un tercio de las lesiones nerviosas, hay lesiones vasculares asociadas y se ensombrece el pronóstico. En el síndrome de compartimento se produce un aumento de la presión tisular dentro de un estuche osteo-aponeurótico, más frecuente en el antebrazo y pierna, lo que ocasiona cierre de la circulación arteriolar y lesión de los nervios.

## **MECANISMOS DE LESIÓN**

### **Sección**

La laceración de los tejidos blandos tiene el potencial de seccionar los nervios, pero esta situación sólo ocurre en el 30% de los casos. Dichas lesiones, agudas y repentinas, son reparadas rápida y satisfactoriamente. El otro 70%, suelen conservar la continuidad del nervio, pero el daño intraneuronal que causan posee una severidad variable, por mecanismos de contusión o compresión.

Casi el 15% de las lesiones nerviosas asociadas a una sección son parciales. La pérdida de función resulta variable entre neurotmesis, axonotmesis y neuroapraxia, pero el nervio o parte de él, mantiene su continuidad. Con el tiempo, ese nervio se adelgaza y, dependiendo de la severidad interna, puede convertirse en un neuroma (*Alant et al., 2012*). Esto puede ocurrir a pesar de que la lesión de los tejidos lacerados sea completa.

Si un nervio es parcialmente seccionado, la lesión de estas fibras cortadas es por definición una neurotmesis o lesión de Sunderland tipo V; presentando otras fibras nerviosas con un grado variable de lesión, Sunderland II, III o IV. La pérdida de función puede ser desde suave e incompleta hasta severa y total (*Bélanger et al., 2011*). Además, la capacidad de recuperación es muy variable, como lo es el tiempo que tarde en conseguirlo (*Bauder & Ferguson, 2012*). En los humanos, la porción de nervio seccionado rara vez se regenera lo bastante bien de forma espontánea como para restaurar la función.

La apariencia física de una sección total varía de forma brusca y está relacionada con la brusquedad de la laceración. Cuando el epineuro se corta claramente, hay un mínimo cambio por contusión o hemorragia. Con el tiempo, los extremos se retraen y se envuelven por cicatriz. La cantidad de neuroma formado a nivel proximal y distal es muy inferior a la generada tras una sección más contusa o hemorrágica.

La sección hemorrágica se asocia con un desgarro irregular del epineuro y una extensión longitudinal del daño. El hematoma puede extenderse varios centímetros en todas las direcciones. Luego, se desarrollarán los neuromas en ambos extremos. La retracción y la formación de cicatrices son frecuentemente más severas en estos casos.

Si el objeto que penetró la extremidad llevaba una dirección oblicua, el sitio real de lesión del nervio puede encontrarse lejos del punto de entrada, pudiendo haber sido lesionados también músculos, tendones o vasos que requieran su revisión.

Las secciones iatrógenas intraoperatorias, por objetos cortantes como el bisturí, por compresión en excesiva distracción, o por manipulación indebida, pueden pasar desapercibidas en el momento o incluso electrocauteradas accidentalmente (*Wang et al., 2012*).

### **Lesiones (neuromas) en continuidad**

En la mayoría de las lesiones no existe sección ni distracción, permaneciendo cierta continuidad macroscópica (*Alant et al., 2012*). Pueden ser lesiones focales o difusas. Normalmente, la visión global externa del nervio se correlaciona bien con el daño interno. Pero en algún caso, un grupo de fascículos clínicamente afectados, sólo presentan una neuroapraxia y se resuelven espontáneamente en un periodo de meses. Y en otros casos, hay un espectro de fibras con distintos grados de lesión, que evolucionan con diferentes ritmos, predominando desafortunadamente en estas situaciones, la axonotmesis y la neurotmesis. La regeneración satisfactoria espontánea depende de la afectación mínima del tejido conectivo. Con un daño interno mayor, y un aumento del grado de fibrosis intrafascicular, resulta frustrante la regeneración axonal y el crecimiento, a pesar de que sea una lesión por continuidad en sí misma.

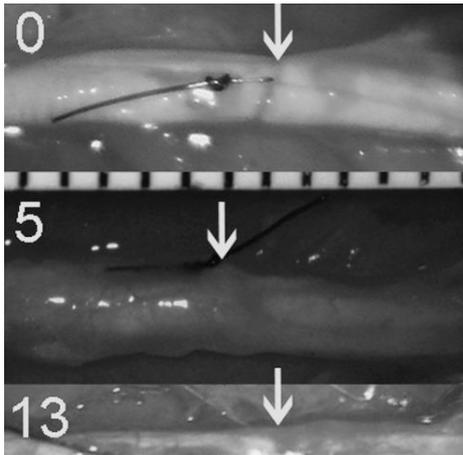


Figura 1. 12 **Lesión (neuroma) en continuidad.**

En las fotos in situ de los neuromas experimentales en las zonas de lesión de continuidad a los 0, 5, 13, 21, y 65 días después de la lesión se demuestra una ampliación sutil focal fusiforme después de 13 días. Los nervios están orientados proximal (izquierda) a distal (derecha).

Alant JD, Kemp SW, Khu KJ, Kumar R, Webb AA, Midha R. Traumatic neuroma in continuity injury model in rodents. *J Neurotrauma*. 2012;20;29(8):1691-703.

El neuroma en continuidad resultante contiene una malla de tejido conectivo entrelazada de fino calibre, y los axones mielinizados incorrectamente. Dependiendo del grado de perturbación interna, la recuperación espontánea puede o no ocurrir. Desafortunadamente, en muchas lesiones por estiramiento o contusas, se genera un daño grave en las capas perineural y endoneurial, con una proliferación secundaria considerable de tejido conectivo, resultando una regeneración axonal eficaz mínima (Seddon H, 1954; Alant et al., 2012).

Con la lesión típica en continuidad, el nervio está inflamado y edematizado de forma aguda, con extravasación de suero o sangre, necrosis de los axones con pérdida de sus cubiertas de mielina, así como trastornos de los elementos del tejido conectivo (Seddon H, 1954;

Zachary & Roaf, 1954). Se desarrolla el proceso de degeneración walleriana, y los residuos axonales y de la mielina son fagocitados tanto en el sitio de la lesión como en el cabo nervioso distal (Waller A, 1850). Las células de Schwann, la lámina basal, y los elementos del tejido conectivo tratan de sobrevivir, posicionándose para colaborar en la diseminación axonal (Martini R, 1994). Por desgracia, los elementos endoneurial y perineurial en el sitio de la lesión proliferan rápidamente y se rellenan de colágeno mal estructurado, lo que interfiere con la regeneración organizada y dirigida para la reparación axonal correcta (Siironen et al, 1992). Debido a que existe un daño retrógrado proximal al sitio de la lesión con la mayoría de las lesiones nerviosas, las agrupaciones de axones en regeneración deben atravesar primero esta zona de pérdida (Morris et al, 1972). Estos encuentros se siguen de una mala reestructuración del colágeno en el sitio de la lesión, lo que lleva a la desorganización en su orientación (Kline DG, 1979). Los axones se ramifican muchas veces a medida que atraviesan el sitio de la lesión. Tal ramificación axonal en el ser humano se puede producir varios

cientos de veces (*Woodhall et al., 1957*). Otros axones pueden ser desviados en capas periféricas del tejido conectivo en el lugar de la lesión, así como distalmente. Como resultado, los axones que alcanzan el muñón distal son delgados, están mielinizados de forma incompleta, y por lo tanto con menos probabilidades de alcanzar los órganos diana tras una lesión que supere la axonotmesis. Muchas de estas lesiones en continuidad suponen tal patología de gravedad que no son capaces de asegurar una regeneración de calidad que conduzca a la recuperación de la función distal útil (*Carvalho et al., 1997*).

Si la desorganización del tejido conectivo es grave, la regeneración de los axones, a pesar de penetrar en la zona de la lesión por miles, son pobres en calibre y mal dirigidos (*Zachary & Roaf, 1954*). Por otro lado, si la participación del tejido conectivo es leve con relativa preservación de tejidos no sólo perineurales, sino también de las vías endoneurales en una proporción significativa, los axones se regeneran, alcanzando las estructuras distales después de una ramificación mínima, y, finalmente, recuperan un nivel adecuado de calibre y mielinización. Éste es el tipo de regeneración espontánea que puede conducir a la restauración de la función.

Pronosticar que la lesión en continuidad recupera adecuadamente la función distal espontáneamente es difícil. El conocimiento del mecanismo de la lesión puede ser algo útil. Con la excepción de la compresión severa o la lesión contusa, una lesión por estiramiento muy suave, o, sorprendentemente, algunas heridas de bala son más propensas a prescindir de ciertas estructuras de la arquitectura interna del tejido conectivo, permitiendo una respuesta axonal regenerativa estructurada. Las lesiones por fuerzas de estiramiento más contusas y asociadas a mecanismos de alta velocidad de tierra, agua, aire y los accidentes, son menos propensas a alcanzar una regeneración funcional. A pesar de estas generalizaciones, es difícil predecir los resultados, y la mayoría de las lesiones en la continuidad tienen un futuro incierto (*Kline DG, 1977*).

Un nervio que se ha suturado o reparado mediante injertos se convierte también en una lesión o neuroma en continuidad (*Woodhall et al., 1957*). El tamaño, la firmeza y la apariencia histológica de una lesión depende del defecto; influirán el tipo de reparación, la rigurosidad de la resección del tejido dañado antes de sutura, la precisión con la que los muñones y sus estructuras son enfrentadas, y el grado de tensión en la sutura (*Tarlov IM, 1947*). Proporciones variables de la sutura desarrollan un neuroma en

continuidad porque se derivan de la proliferación del tejido conectivo; la cicatriz que generalmente frustra el éxito de una reparación excelente, la nueva lesión en continuidad producida por la sutura o los injertos, muestra remolinos de tejido conectivo y un número variable de axones mal dirigidos. Algunos axones llegan a la estructura fascicular más distal, pero otros están mal dirigidos en la cicatriz en sitios extrafascicular. Incluso con un mal estado, sin embargo, un gran número de axones puede llegar al muñón distal del nervio, debido a que el empuje neuronal para la regeneración de los axones es grande. Dependiendo del número de veces que se debe dividir para alcanzar este nivel, y la cicatriz en el sitio de la reparación, los axones pueden o no adoptar un calibre suficiente como para ser funcionales. Incluso si las fibras alcanzan con éxito los órganos distales a inervar y consiguen la maduración en el nivel del muñón distal, siguen siendo delgadas y relativamente poco mielinizadas durante muchos años en el sitio de la reparación. Con un mal estado, la proliferación de tejido conectivo es grande. Los axones se ven obligados por la cicatriz a dividirse muchas veces más para atravesar esta barrera, la colocación extrafascicular distal es más probable, y la madurez de las fibras en la zona de reparación y más distal, es menos completa que con una reparación más meticulosa.

Un factor importante que afecta a la recuperación de la función es la de si la regeneración de las fibras para alcanzar o acercarse a los sitios que previamente inervaban por la sensación y la función motora. La especificidad de regeneración pobre con la mala dirección de los axones, juegan un papel importante en la reducción de los resultados de la reparación del nervio (*Brushart TME, 1991*).

### *Neurofisiología de las lesiones por continuidad*

Debido a que la mayoría de estas lesiones han perdido la continuidad axonal, se desarrolla un proceso de degeneración walleriana. Esto cuenta con un tiempo limitado para que la estimulación distal al sitio de la lesión produzca contracción muscular durante 1-3 días a pesar de que el paciente no pueda contraer los músculos voluntariamente. Esto es interesante, pero no clínicamente predictivo, ya que casi todas las lesiones en la continuidad poseen finas fibras que penetran en la zona de la lesión. Este tipo de respuesta regenerativa temprana no es predictivo de un grado funcionalmente útil de regeneración que tarda varias semanas o meses en ocurrir.

La grabación intraoperatoria puede producir información sobre una regeneración fiable a las 6-8 semanas de las lesiones causadas por fracturas y contusiones y algunas heridas de bala. Otras lesiones menos focales requieren más tiempo para que se produzca una regeneración adecuada y para ser registrada neurofisiológicamente. Varios miles de fibras de más de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro se requieren para producir este tipo de potencial de acción nervioso. Tal respuesta puede ser rastreada a través del sitio de la lesión y en el muñón distal.

Con el tiempo, además, se anuncia una adecuada regeneración por la reversión de los cambios en el músculo distal denervado y la presencia de potenciales de reinervación incipientes. La actividad de inserción y, finalmente, un potencial de acción muscular pueden ser evocados en la electromiografía. Además, en algún momento antes de la recuperación de la función voluntaria, la estimulación del nervio que está regenerándose con éxito, es capaz de producir contracción muscular. Estos cambios más distales pueden tardar muchos meses en producirse, sobre todo en las lesiones ciáticas, lesiones proximales en el brazo a nivel radial, mediano y cubital, y en la mayoría de las lesiones del plexo braquial. La conducción a través del sitio de lesión también sigue siendo lenta durante años, a veces porque, a pesar de la maduración axonal más distal, el diámetro de la fibra y la mielinización siguen siendo pobres en el sitio de la lesión. Los valores de velocidad evalúan fibras grandes solamente, mientras que la amplitud del potencial de acción nervioso y el área debajo de su curva ofrecen una estimación aproximada del espectro de fibras involucradas. Hay variables relativas tales como distancia entre los cabos, contacto del electrodo, la temperatura y la humedad de la herida, que deben ser evaluadas antes de completar la interpretación final de las amplitudes de potencial de acción de estos nervios.

### **Estiramiento, tracción y contusión**

Normalmente, el nervio puede soportar fuerzas moderadas de estiramiento, dada su capa perineural rica en elastina y colágeno, que lo dotan de resistencia a la tracción, y su excelente capacidad para deslizarse durante el movimiento fisiológico. Sin embargo, incluso el 8% de estiramiento conduce a una alteración de la circulación intraneural y de

la función de barrera sangre-nervio, mientras que si supera el 10-20%, especialmente si se aplica de forma aguda, los resultados conducen a un fallo estructural. Tales fuerzas pueden distraer un nervio, o más comúnmente como lesión en continuidad, pero con un daño considerable en su arquitectura interna. Si se distrae por fuerzas sustanciales, el nervio se deshilacha, y se daña a lo largo de varios centímetros. La retracción cicatricial es grave. Si el nervio permanece en continuidad, como es más probable, el grado de daño intraneural es variable y puede, en ocasiones, presentarse como un espectro de cambio de fibra incluyendo neuroapraxia, axonotmesis y neurotmesis.

Los mecanismos responsables de un grado relativamente suave de estiramiento pueden estar asociados con las fuerzas que producen fracturas o con menores grados de retracción quirúrgica. Normalmente, las fuerzas de tracción son suficientes para destrozarse la estructura del tejido conjuntivo intraneural así como desconectar los axones. Son lesiones Sunderland grado IV, neurotmesis, a pesar de la continuidad física del nervio. Con menos frecuencia, el resultado es una axonotmesis o Sunderland grado II-III que puede tener potencial para la regeneración eficaz debido a la menor destrucción del tejido conectivo. Un mecanismo de estiramiento que también es responsable del daño en el nervio son las lesiones por los misiles de alta velocidad, especialmente con heridas de bala.

La lesión del plexo braquial es un trastorno común que resulta de un mecanismo de estiramiento. Es común en los movimientos extremos de la articulación del hombro, con o sin desplazamiento o fractura del húmero o la clavícula. Rara vez la fractura en sí produce una lesión focal para el plexo subyacente. Cualquiera de los elementos superiores o inferiores del plexo puede sufrir la lesión predominante, o, con fuerzas de tracción graves, todos los elementos pueden estar involucrados, además del nervio frénico o los vasos subclavios. Todos los grados de daño son posibles. Los nervios espinales y las raíces se pueden avulsionar de la médula espinal o más lateralmente, de las salidas del tronco distal. Los elementos estirados se pueden dejar en continuidad y tener una mezcla de neuroapraxia y axonotmesis. Una combinación de neuroapraxia, axonotmesis y neurotmesis pueden coexistir pero desafortunadamente estos grados mixtos de lesiones son más comunes en grado severo. La mayoría de las lesiones de tracción no avulsionan ni separan los elementos del plexo. En tales casos, la lesión no es focal sino que se extiende más de 5-6 cm o más de nervio.

El efecto de estiramiento en los nervios periféricos es similar en todo el cuerpo, pero la relación anatómica específica contribuye al desarrollo de patrones característicos en el caso de estiramiento del plexo braquial. La tracción a lo largo del eje del plexo braquial puede literalmente rasgar las raíces de la médula espinal. La avulsión de las raíces subtendidas por un nervio espinal no implica avulsión de todas las ramas del plexo braquial.

Después de que las raíces penetran la duramadre, se convierten en los nervios espinales. En este nivel intraforaminal, los nervios están atados por mesoneuro relativamente similar a las conexiones de los canales. Los nervios espinales se lesionan de forma característica al pasar por el borde de la apófisis transversas, por fuerzas que pueden distraer el nervio espinal desde el tronco, produciendo una ruptura. Alternativamente, se pueden producir graves daños intraneurales dando lugar a lesiones extensas en la continuidad que implican no sólo los nervios espinales y los troncos, sino que pueden extenderse hasta las divisiones.

La clavícula tiene una importante relación con el plexo braquial. La abducción y la aducción del brazo pueden generar una angulación aguda del plexo debajo de la clavícula. Un callo de una fractura clavicular puede, en ocasiones, incidir directamente en el plexo, causando una parálisis del plexo braquial por compresión, o prolongando o agravando una lesión nerviosa subyacente.

La parálisis de nacimiento de partos difíciles es menos común ahora debido a una mejor formación obstétrica y a la práctica. La más común es la parálisis de Erb, involucrando la parte superior y media del tronco. La parálisis de Klumpke implica daño a la parte inferior del tronco, raíces, o los nervios espinales y se produce en circunstancias en las que permanece sólo el brazo en la pelvis y se mantiene la hiperabducción mientras que la tracción se aplica al cuerpo. Al igual que las lesiones por estiramiento del plexo en adultos, el resultado de la parálisis del plexo obstétrica es variable, pero a diferencia de los adultos, las lesiones que suelen ser causadas por fuerzas mayores, asociados con el parto tienen una mayor posibilidad de recuperación espontánea.

Además del plexo braquial, los elementos nerviosos que son propensos a daños extensos y graves incluyen el plexo lumbosacro de las fracturas y luxaciones graves en la pelvis, el nervio ciático en la luxación de cadera, el nervio peroneo en la luxación de

rodilla, y el nervio axilar en la luxación de hombro. Las lesiones del plexo lumbosacro suelen ser lesiones largas en continuidad con la distracción de las raíces lumbosacras.

El nervio peroneo se puede dañar en relación a una variedad de lesiones de rodilla y algunas veces con fractura o avulsión de la cabeza del peroné. El componente peroneo del nervio ciático a nivel de la escotadura ciática y nalgas puede ser estirado en el contexto de una luxación o una fractura de la cadera. Un ejemplo ilustrativo es la parálisis del nervio radial después de una fractura humeral medio, que exhibe una tendencia a recuperar de forma espontánea en 70-80% de los pacientes.

Aunque algunos pueden mejorar, muchos no lo hacen y requieren reconstrucción quirúrgica. Sin embargo, puede que no haya cirugías satisfactorias sobre los nervios para algunas de las lesiones más graves de estiramiento. Una neurotmesis puede implicar un segmento tan extenso del nervio que el único método quirúrgico para reemplazar el neuroma resultante es el uso de injertos largos. Los resultados de la reparación de dichos injertos largos son a menudo pobres, y son especialmente propensos a fallar a nivel proximal donde muchas lesiones comienzan.

## **Heridas de bala**

Una fuente frecuente de lesión por contusión y estiramiento del nervio es una herida de bala. La mayoría de tales lesiones no son causadas por impacto directo del nervio por el misil o sus fragmentos. En algunos otros casos, en particular los disparos de escopeta, los gránulos pueden incrustarse en los nervios, a pesar de que el nervio mantiene la continuidad macroscópica. Algunos fragmentos de misiles pueden golpear el hueso, fracturarlo y conducir fragmentos de hueso al nervio, lacerándolo.

En la mayoría de los casos, el nervio lesionado por herida de bala queda en continuidad física. Estas lesiones tienen un grado variable de alteración intraneural, porque la mayoría (85%) de las trayectorias de los misiles no golpean el nervio, pero sin embargo pueden lesionar el nervio con severidad como un traumatismo directo. Puede resultar en un bloqueo de la conducción (neurapraxia, axonotmesis, neurotmesis) o una mezcla de dos o tres de estos grados. Con demasiada frecuencia, las fuerzas de

estiramiento y contusión asociadas con herida de bala separan no sólo los axones, sino también el tejido conectivo y vasos, extendiéndose sobre una longitud del nervio. En forma aguda, un segmento del nervio está hinchado, algo hemorrágico. Con el tiempo, a medida que prolifera el tejido conectivo y la regeneración, varía la proporción de axonotmetis a los cambios de neurotmesis (*Topuz et al., 2013*).

En forma aguda, el cabo del nervio suele presentar bordes irregulares, con cambios hemorrágicos, contusos en ambos extremos. Posteriormente, se forma un neuroma bulboso proximal y menos voluminoso distal. El hallazgo de fragmentos incrustados de metal o espículas de hueso puede estar asociado con edema localizado o hemorragia. Con el tiempo, el tejido conectivo puede proliferar alrededor de estos objetos extraños.

La demora en la exploración y la reparación está generalmente indicada, debido al tiempo necesario de evolución para la definición de las lesiones. Un hematoma agudo, aneurisma traumático, fístula arterio-venosa, cerca de la lesión neural, pueden requerir una cirugía relativamente precoz. Algunos síndromes de dolor son paliados por los primeros bloqueos simpáticos y, en muchos casos, responden a la simpatectomía. En ocasiones, fragmentos de metal en los nervios o gránulos intraneurales producen un dolor intenso disestésico. La manipulación del nervio asociado a su eliminación puede ayudar a veces a paliar el dolor.

Por lo tanto, la progresión del déficit neurológico obliga a una búsqueda agresiva de la etiología de compresión, seguida de la exploración quirúrgica urgente y descompresión para evitar la pérdida permanente de la función.

## **Isquemia**

El nervio periférico, como otros tejidos neurales, es críticamente dependiente del flujo de sangre. Debido a que rara vez es posible comprimir un segmento de nervio sin que ello implique afectar el suministro de sangre, la función de la isquemia y la deformación física en las lesiones por compresión permanece sin resolver. La evidencia

más reciente sugiere que, aunque la isquemia puede ser el principal responsable de un tipo leve de lesión del nervio rápidamente reversible, la distorsión mecánica directa es el principal factor subyacente más grave y duradero de parálisis. Sin embargo, es probable que en la mayoría de las lesiones por compresión, incluyendo neuropatías por atrapamiento crónicas, la isquemia localizada en el sitio de la deformación juegue algún papel. Puede producir una amplia gama de lesiones de las fibras nerviosas y, si los resultados son graves y la lesión prolongada, desencadenará una pérdida axonal extensa y la degeneración walleriana.

En grados más leves de isquemia, la reducción en la densidad de fibras nerviosas es característicamente el resultado de abandono temprano de las grandes fibras mielinizadas. Aunque el daño a una arteria nutricia puede conducir a la lesión isquémica de un nervio periférico, las lesiones isquémicas neurogénicas puras, aisladas, son poco frecuentes en los seres humanos. Más común es que los troncos nerviosos estén implicados junto con otras estructuras de partes blandas de las extremidades como el músculo y los grandes vasos, influyendo sobre la gravedad de la lesión del nervio, el grado, la duración de la isquemia y la compresión. Existe un período crítico de aproximadamente 8 horas, después de lo cual la lesión del nervio es irreversible.

La anatomía vascular de los nervios periféricos, con anastomosis entre los vasos longitudinales en el epineurio, perineurio, y endoneuro y el suministro regional segmentario, permite al cirujano movilizar largos segmentos de nervio sin producir isquemia. Sin embargo, la disección extensa intraneural por un cirujano inexperto puede poner en peligro la microcirculación y generar en daño isquémico. La evidencia también sugiere que un nervio seccionado o bajo tensión es más sensible a la isquemia. El cirujano, por tanto, debe minimizar la interrupción de ambas irrigaciones, regional y segmentaria, además de evitar la tensión en el lugar de la sutura.

## **Compresión**

La compresión de las fibras nerviosas mielinizadas parece producir cambios en las fibras nerviosas que son propios de este mecanismo: alteraciones en la mielinización

axonal paranodal, adelgazamiento y demielinización segmentaria. La degeneración walleriana es el resultado de los grados más severos de compresión.

El grado de recuperación después de una lesión por compresión o isquemia puede predecirse con exactitud en algunas situaciones clínicas. La mayoría de las parálisis asociadas a la inconsciencia debido a la anestesia o a la mala posición o presión durante la operación (*Hopayian et al., 2010*), así como las relacionadas con la aplicación indebida de los yesos, tienen un buen pronóstico para la recuperación espontánea. Hay, sin embargo, excepciones importantes. A veces, la compresión o aplastamiento ha sido lo suficientemente grave o prolongada como para causar daño irreversible a menos que la reparación quirúrgica se realice. El plexo braquial y el cubital, el ciático y los nervios peroneos son los más afectados por estas etiologías compresivas más graves.



Figura 1. 13 **Lesión por compresión.**

Fotografías intraoperatorias que demuestran el aspecto macroscópico de las lesiones. A) Lesiones por electrocauterizador bipolar, B) Lesión por aplastamiento. Las flechas indican el punto medio del sitio de la lesión. **Moradzadeh A**, Brenner MJ, Whitlock EL, Tong AY, Luciano JP, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Bipolar electrocautery: A rodent model of Sunderland third-degree nerve injury. *Arch Facial Plast Surg.* 2010;12(1):40-7.

La restauración de la función después de la compresión aguda y la lesión isquémica puede ser menos evidente en algunas otras circunstancias. Puede ser difícil, por ejemplo, predecir el grado de recuperación que sigue a la evacuación de hematomas o al alivio de la compresión aneurismática de estructuras como el plexo braquial y los nervios femoral o ciático (*Wang et al., 2012*). Aunque poco frecuente, también hay

circunstancias en las que dos niveles de compresión pueden existir. En estas circunstancias, existen múltiples factores que afectan al resultado de la cirugía del nervio periférico, incluyendo la identidad y el nivel del nervio involucrado, la edad del paciente, la gravedad de la lesión pre-compresión de los nervios, y el momento de la cirugía correctora.

La lesión grave por aplastamiento, las fracturas esqueléticas con compromiso vascular y la hemorragia secundaria a la administración de tratamiento anticoagulante, pueden conducir a una mayor presión dentro de un compartimiento muscular. Como consecuencia, se puede generar una compresión severa y el daño isquémico de los nervios periféricos y de otros tejidos. Requiere descompresión inmediata con correctamente con fasciotomías longitudinales. La demora en los resultados del tratamiento en el infarto isquémico de los músculos, nervios y otros tejidos, lleva a contracturas y otras deformidades incapacitantes.

### **Síndrome compartimental**

La contractura de Volkmann es un ejemplo grave de compresión isquémica. La parálisis puede seguir a una manipulación o inmovilización de una fractura cerrada cercana al codo que está asociada con inflamación muscular grave y hemorragia en el compartimiento anterior del antebrazo. Este tipo de lesión isquémica se asocia más frecuentemente con una fractura supracondílea de húmero o luxación de codo y puede ocurrir incluso antes de la manipulación. El infarto de la musculatura del antebrazo volar puede ocurrir, y la inflamación puede resultar suficiente para comprimir los nervios a pesar de que la lesión arterial o el espasmo puede estar presente.

En el síndrome de Volkmann habitual, existe lesión de la arteria braquial junto con daño difuso segmentario del nervio mediano y los músculos de la cara palmar del antebrazo. A veces las fibras del nervio radial que actúan sobre la función motora y propioceptiva están más severamente afectadas que las fibras del dolor más pequeñas. El EMG puede ayudar en el diagnóstico, mostrando las descargas motoras temporales pero repetitivas y espontáneas de los músculos más distales al sitio de la lesión. La hinchazón del antebrazo que resulta en una dolorosa mano parestésica debe alertar al

médico de un síndrome compartimental, mucho antes de que los signos más evidentes de compromiso vascular sean evidentes.

La isquemia de magnitud suficiente para producir resultados como la contractura de Volkmann puede generar una cicatriz de un segmento tan extenso del nervio mediano que haga improbable la regeneración espontánea. Bunnell cree que la contractura de Volkmann se explica lo suficiente por la existencia de un espacio cerrado de compresión del vaso braquial entre la fractura y el tejido fibroso del codo. En cualquier caso, se desarrolla el espasmo de la arteria en la isquemia y algunas veces el infarto de los tejidos blandos de la cara volar del antebrazo.

La sección y la reparación del segmento dañado de la arteria braquial pueden ser necesarias. La anticoagulación sola puede no ser suficiente y puede incluso ser perjudicial, probablemente a causa de la hemorragia en un musculatura ya isquémica.

Además del nervio mediano, la radial, e incluso ocasionalmente el nervio cubital puede estar implicado debido a un codo severamente inflamado y el antebrazo, en particular si la contractura se asoció inicialmente con múltiples lesiones contusas a este nivel. Está indicada la fasciotomía inmediata, porque la recuperación quirúrgica de los grados más severos de la contractura de Volkmann, aunque posible, es decepcionante. La compresión del nervio mediano debe ser aliviada para la recuperación funcional, especialmente en la región del pronador redondo y el flexor digitorum longus. El tratamiento de emergencia es necesario ante los primeros signos de isquemia irreversibles para prevenir el daño neural y las contracturas de la extremidad.

Una afección relacionada es el síndrome del compartimiento anterior que implica la pierna, lo que resulta en una parálisis progresiva peronea o caída del pie. Una fractura de la tibia y el peroné puede o no ser un hallazgo concomitante, pero la inflamación de los tejidos blandos está siempre presente. Está indicada la fasciotomía amplia urgente, igual que en la contractura de Volkmann. Conviene medir la presión intracompartimental mediante un sistema de aguja y manómetro.

La extensión de la lesión neural por la compresión y la isquemia es muy posible que ocurra secundariamente a una inflamación suficiente del tejido blando o un aneurisma, fístula, hematoma, o insuficiencia arterial que produzca un compartimiento relativamente cerrado o confinado a nivel neurovascular. Estas lesiones son

particularmente propensas a desarrollarse en heridas puntiformes que implican arterias, aunque también pueden ser causadas por un traumatismo cerrado o contundente. El daño neuronal por lo general se puede prevenir mediante la descompresión rápida, pero se convierte en irreversible si la isquemia severa implica un largo segmento de nervio que persiste durante un período demasiado largo de tiempo.

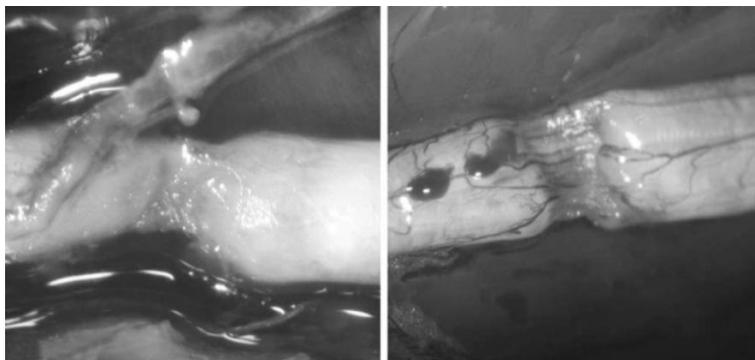
### **Lesión eléctrica**

La lesión eléctrica mediante el paso de una corriente grande a través de un nervio periférico generalmente resulta del contacto accidental de la extremidad con un cable de alta tensión. Si el individuo no sufre paro respiratorio o cardíaco, al menos tendrá daño nervioso difuso y muscular extenso. Las directrices para el tratamiento son controvertidas. El tratamiento conservador de la lesión nerviosa y la reconstrucción ortopédica temprana de la extremidad parece ser el mejor. El pronóstico en la mayoría de las lesiones de bajo voltaje es excelente, pero muy variable en las de alto voltaje. Sólo unas pocas de estas lesiones mejoran espontáneamente con el tiempo. La resección de un segmento largo de los nervios dañados y la reparación mediante injertos suele ser necesario y los resultados no han sido buenos. Histológicamente, el segmento del nervio está sustituido virtualmente, primero por necrosis y, a continuación por la reacción del tejido conectivo, incluyendo un grado severo de tejido cicatricial, tanto perineural como endoneural. El esquema fascicular puede preservarse, pero el daño intrafascicular y la fibrosis pueden ser lo suficientemente graves como para impedir cualquier regeneración axonal. Las quemaduras graves en la piel que acompañan, así como la necrosis de hueso y músculo en la extremidad, empeoran el pronóstico y conllevan contracturas graves que disminuyen aún más la probabilidad de reinervación útil.

### **Lesión térmica**

Aunque no es un mecanismo común de la patología del nervio periférico, la lesión térmica por fuego, vapor, o elementos calientes puede dar lugar a daños

neuronales que van desde una neuroapraxia transitoria a una neurotmesis grave con necrosis extensa de nervio, así como los tejidos adyacentes (*Moradzadeh et al., 2010*). En pacientes con quemaduras circunferenciales, el daño neural puede estar relacionado con la fibrosis constrictiva retardada, resultando un efecto de torniquete. Los pacientes con quemaduras graves involucran nervios presentes con pérdida de actividad motora y sensorial. El examen clínico es a menudo difícil debido a las lesiones de tejidos blandos asociados, la pérdida extensa de la piel, y a menudo una extremidad con inflamación importante. El grado de necrosis del tejido, el desarrollo de contaminación bacteriana, y la necesidad de un lecho de tejido blando adecuado, hace la reconstrucción inmediata del nervio raramente factible. Una adecuada atención a la herida mediante escarectomía, si está indicada, aumenta el éxito de las reparaciones secundarias. En la lesión térmica, ya sea por efecto directo o secundario a fibrosis constrictiva, involucra longitudinalmente los nervios, lo que exige injertos nerviosos. El pronóstico para la recuperación funcional es pobre en estos casos, especialmente si también hay una amplia participación de músculo y otros tejidos blandos.



**Figura 1. 14** Lesión térmica.

**Sección axial en T2 de resonancia magnética a través de la región de la cadera que muestra colección abscesidafica de una piomiositis glútea, en relación con la compresión del nervio ciático izquierdo.**

**Kamal T, Hall M, Moharam A, Sharr M, Walczak J. Gluteal pyomyositis in a non-tropical region as a rare cause of sciatic nerve compression: a case report. *J Med Case Rep.* 2008;12;2:204.**

Las quemaduras graves superficiales causadas por agentes térmicos pueden conducir a la necrosis por coagulación de los nervios subyacentes. Al igual que las lesiones eléctricas, las quemaduras más graves pueden afectar a una longitud de nervio. La infección puede complicar cualquier herida del tejido blando que implique tejido

nervioso. Es más probable que lo haga si el mecanismo de la lesión se ha producido por necrosis de los tejidos blandos, y por lo tanto se ve a menudo en quemaduras térmicas y eléctricas y algunos síndromes compartimentales. El tejido conectivo epineural e interfascicular suele resistir la invasión a menos que sea ampliamente dañado. En casos excepcionales, la infección puede conducir a un extenso segmento de necrosis intraneural, difícil de reparar con éxito.

### **Lesión por inyección**

La lesión por inyección, una categoría sorprendentemente común, merece una atención especial (*Topuz et al., 2011*).

#### *Patogenia*

La lesión por inyección es causada por una aguja colocada cerca de nervio, y se inyecta los productos químicos neurotóxicos. La extensión del daño varía, dependiendo no sólo del agente inyectado sino también de la aguja. En el ser humano, aproximadamente en el 10% de los pacientes, la lesión se descubre con un retraso de horas o incluso días después de la aparición de los síntomas. Esto sugiere un locus puramente epineural de la deposición del agente, cerca del nervio, o en un plano de tejido de la que el agente puede gravitar hacia el nervio.

La patología de las lesiones de inyección también varía en función del lugar de la inyección y el agente inyectado. El mecanismo patogénico principal, sin embargo, es la necrosis. Con la inyección intraneural, hay edema y cambios inflamatorios agudos, a menudo con necrosis, que afectan a los elementos del tejido conectivo, a los axones y a la mielina. Con el tiempo, la proliferación del tejido conectivo puede ocurrir, generando una cicatriz intraneural, frustrando la regeneración eficaz. La barrera sangre-nervio, tanto a nivel perineural como endoneural está gravemente perturbada, un hallazgo que podría ocurrir a pesar de la preservación del entorno fascicular. Después de los primeros días, el segmento inyectado ya no está edematizado y puede parecer con el tiempo un segmento de nervio con diámetro normal. En la inspección macroscópica con o sin aumento, el nervio normalmente parece tener continuidad física excelente (*Mishra &*

*Stringer, 2010*). Algunos agentes inyectados en perineuro o adyacente al nervio producen mayor proliferación de tejido inflamatorio y cicatriz que en un locus intraneural, pero la necrosis es especialmente dañina y difícil para que el proceso de regeneración lo supere espontáneamente.

### *Características clínicas*

En la práctica clínica habitual, los resultados de la colocación de la aguja genera una descarga eléctrica, seguidas de o concomitante con un dolor radicular intenso, ardor y parestesias cuando se inyecta el agente. Los síntomas agudos se describen variables, pero suelen ser graves. El dolor asociado a la inyección se describe como punzante, ardiente, eléctrico, o anestésico, y las sensaciones en general se transmiten en la distribución del nervio inyectado. De inicio demorado, lo que parece ocurrir en aproximadamente el 10% de los pacientes con lesiones por inyección, los síntomas son menos dramáticos pero molestos, no obstante. Estos incluyen un dolor ardiente, parestesias, y la radiación de una incomodidad como dolor sordo en las extremidades, en la distribución del nervio (*Topuz et al., 2011*).

La pérdida inicial puede ser completa o incompleta en la distribución del nervio inyectado. A veces, aunque la lesión es dolorosa, la pérdida sensorial o motora puede ser mínima. Ocasionalmente, la ausencia de reflejos y anomalías conductoras en la distribución del nervio lesionado son los únicos hallazgos clínicos. Más a menudo, la pérdida clínica es más dramática y grave, como pérdida sensorial o motora completa o ambos, acompañados de cambios de denervación valorados mediante EMG. La pérdida inicial puede mejorar con el tiempo, pero a menudo se mantendrá con las lesiones más graves. Muchas de las lesiones de esta zona no se regeneran adecuadamente o en absoluto a pesar del mantenimiento de la continuidad física. Si la pérdida total o clínica sigue siendo grave, no va a mejorar si no se corrige mediante una intervención quirúrgica.

### *Puntos de Inyección*

Las localizaciones más comunes de inyección son el nervio ciático a nivel glúteo y el nervio radial en la parte supero-lateral del brazo; también los nervios cutáneo femoral lateral y femorales, así como los nervios cubital y mediano en la muñeca, el codo, y los nivel proximal del brazo. Aunque es bastante inusual, se han detectado casos heridas por inyección de los nervios músculo-cutáneo y antebraquial cutáneo e incluso parte del plexo braquial.

El sitio más común es el ciático a nivel del glúteo o muslo proximal (*Mishra & Stringer, 2004*). Clásicamente, esto es más probable que ocurra si la inyección no se realiza en el cuadrante superior externo de la nalga. Incluso éste puede no ser siempre un sitio seguro. Si el paciente está tumbado sobre un lado o inclinado sobre él mientras está de pie, la relación del presunto cuadrante supero-externa en el glúteo puede cambiar su relación con el nervio ciático (*MacDonald & Marcuse, 1994; Mishra & Stringer, 2010*).

La longitud de la aguja usada y el ángulo en el que la aguja penetra en el tejido blando son factores de riesgo, como es la fuerza con la que se administra la inyección. La punta de la aguja puede penetrar tejido blando en un ángulo dirigido hacia los nervios en lugar de en ángulo recto al plano horizontal. Otros factores, tales como el movimiento del paciente, la inyección, a veces pueden desempeñar suponer un riesgo. La lesión por inyección del nervio radial en el tercio medio del húmero es el segundo sitio más frecuente de lesión por inyección, quizás por movimiento del paciente durante la inyección (el paciente se encoge de hombros o sufre un tirón muscular, tal vez en previsión del dolor relacionado con el evento). Las infusiones o agujas destinadas a las venas también pueden ser inadvertidamente colocadas en los nervios. Esto es más probable que ocurra en el nervio mediano o cubital, el primero, ya sea en la muñeca o el codo y el último en la muñeca. Han sido descritas complicaciones de infusión que involucran también al plexo braquial, el nervio femoral y el nervio tibial posterior en el tobillo.

## *Manejo*

Aunque el déficit en la función neural generalmente es causada por neuritis intraneural y tejido cicatrizal, algunos autores consideran que la neurolisis externa puede revertir la pérdida de función de esta complicación. Una lesión con pérdida parcial de la función y dolor severo que no responde a los analgésicos, puede beneficiarse de una neurolisis interna en diferido. Un paciente ocasionalmente puede tener una verdadera causalgia después de la inyección, y mejorando clínicamente mediante simpatectomía, especialmente si los bloqueos simpáticos recurrentes han proporcionado alivio temporal. El dolor en la mayoría de estos pacientes puede ser tratado eficazmente con los antidepresivos tricíclicos (como Nortriptilina) o los nuevos agentes anticonvulsivos (Gabapentina), ya que han demostrado un beneficio en los estados de dolor neuropático.

Los sedantes y los narcóticos, así como antibióticos y esteroides, pueden causar neuropatía por inyección. Si la complicación se nota inmediatamente, 50-100 ml de solución salina se puede inyectar con la esperanza de diluir el fármaco y evitar la neuropatía permanente. Si el déficit del nervio es parcial, el tratamiento expectante es el mejor, siempre que el dolor no sea un problema grave; pero si el déficit es completo después de varios meses de observación, la exploración quirúrgica estará garantizada.

El protocolo con lesiones por inyección ha sido exponer el nervio que muestra poca o ninguna función después de 8-16 semanas y tratar de evocar un potencial de acción nervioso (PAN) a través de la lesión. Si no hay respuesta que sea registrada, la lesión debe ser reseca. Con la parálisis ciática, una rama puede requerir resección y la otra únicamente neurolisis. El aspecto macroscópico de la lesión del nervio engaña en muchas de estas lesiones por inyección. Los segmentos que a la inspección y a la palpación parecen estar mínimamente lesionados, pueden tener una interrupción extensa axonal y endoneural como para impedir la regeneración funcional útil. En estos casos, la resección y reparación sólo puede proporcionar esperanza de recuperación. Como resultado, una parálisis grave secundaria a lesión por inyección generalmente se debe seguir durante al menos 2-4 meses. Si no hay entonces una recuperación significativa, eléctrica o clínica, el nervio debe ser explorado mediante estimulación directa y así poder realizar estudios de potenciales evocados.

El último punto a destacar es que la neuropatía de las inyecciones de medicamentos debe evitarse mediante la educación adecuada de enfermeras y personal auxiliar, así como del personal médico.

### **Irradiación**

Una causa iatrogénica de daño en los nervios mucho menos común que la inyección es la irradiación. Esto afecta generalmente al plexo braquial, pero también puede ocurrir a nivel del plexo pélvico. La formación de una cicatriz extensa en los tejidos blandos genera cambios intraneurales severos circundantes, que consisten en la pérdida de la mielina, la degeneración axonal y la fibrosis endoneural extensa.

### **Lesión iatrogénica**

Por desgracia, el daño iatrogénico de los nervios sigue siendo una etiología común de lesión del nervio. La lesión accidental de un nervio periférico crea una situación que es preocupante tanto para el médico como para el paciente. Es esencial que el paciente pueda comprender que la situación no es posteriormente agravada por las acciones inadecuadas.

En la mayoría de los casos iatrogénicos estudiados, el médico responsable es consciente de que el nervio ha sido accidentalmente dañado. El nervio puede haber sido lesionado por la presión inapropiada del separador o más directamente por cauterización, incisión, o sutura (*Katsimihis et al., 2002; Bistolfi et al., 2011*).

Los nervios pueden ser dañados por la presión mientras se inmovilizan en el quirófano o posteriormente por la inmovilización con yesos. La gestión quirúrgica apropiada de los nervios periféricos también puede resultar en una lesión inadvertida completa o parcial.

### *Diagnóstico*

A pesar de que este tipo de lesiones son de origen iatrogénico, los mecanismos de lesión implicados son similares a las no iatrogénicas. Es necesaria para el diagnóstico una historia clínica completa, seguida de una exploración detallada y un examen físico motor y sensorial, luego complementado por estudios electrofisiológicos (*Sutherland et al., 1996*). De gran importancia la búsqueda de fuentes colaterales de información de los miembros de la familia, notas médicas y registros, y otras investigaciones complementarias realizadas. El verdadero diagnóstico puede no ser evidente hasta pasados unos pocos días si el paciente está inmovilizado después de la operación o está sufriendo de dolor postoperatorio por el que precisa sedación. Por ejemplo, no es inusual que la parálisis del nervio ciático o femoral como complicación de la cirugía de cadera sea diagnosticada días después de la operación.

El mantenimiento de registros debe ser de la más alta calidad. Cualquier modificación o la pérdida de los registros es susceptible de ser interpretada como evidencia de la falta de honestidad por parte del cirujano, incluso si éste no es el caso. Las notas deben ser apropiadas para el problema. La descripción de largos evolutivos sobre cuestiones irrelevantes, aunque precisos en sí mismos, pueden ser posteriormente interpretados como un intento de confundir en lugar de iluminar el problema clínico. Lo más adecuado es consultar a un experto en nervio para que registre que dicha consulta se ha producido. Los resultados detallados de la consulta deben mantenerse en el hospital dentro de la historia del paciente.

### *Manejo*

El mecanismo supuesto de lesión determinará su gestión. Si el daño del nervio surge y la avanza tracción, el alargamiento de extremidades, o la aplicación de yeso que puede ser la causa de la presión externa, la interrupción del aparato infractor está claramente indicada. Si surge una sección del nervio y se reconoce su alteración funcional, la gestión adecuada es reconstituir el nervio utilizando la técnica de microsutura estándar. Esto permite que afrontamiento de los cabos nerviosos. Si hay una gran probabilidad de que la sección roma se ha producido durante la cirugía, puede

ser apropiada la reintervención varias semanas después de la lesión iatrogénica, al igual que en una laceración roma no iatrogénica.

En la mayoría de los casos, se hace la suposición de que una lesión en la continuidad está presente. El paciente se maneja de forma adecuada durante 3-4 meses mientras buscamos la evidencia de la regeneración espontánea mediante repetidos exámenes clínicos complementados con estudios eléctricos. Los pacientes pueden requerir férulas apropiadas y otros dispositivos ortopédicos, así como terapia física durante este tiempo de espera.

La preocupación acerca de las consecuencias legales de lesión iatrogénica puede alterar el patrón habitual del médico. Debe estar muy vigilante para que la alteración de la práctica normal no comprometa el resultado final. La programación de exploración debería ser recomendada por el propio médico, y no mostrarse alterado por la "esperanza falsa" de que el nervio de forma espontánea puede recuperar. Deben hacerse todos los esfuerzos para reducir la incapacidad definitiva por la atención adecuada de la extremidad después de la segunda operación.

## 8.- CLASIFICACIÓN

Seddon, en 1943, introdujo una clasificación funcional, describiendo tres niveles de lesión nerviosa, que según su gravedad progresiva son: neurapraxia, axonotmesis y neurotmesis (*Seedon HJ, 1954*).

### 1. Neuroapraxia

Bloqueo local de la conducción por afectación de la mielina en una zona concreta. El axón se encuentra íntegro; así como la excitabilidad del resto de las estructuras nerviosas distales a la lesión. Solamente se afectan las fibras mielínicas gruesas, por lo que se produce parálisis motora, encontrándose las funciones sensitiva y simpática conservadas. Se ve frecuentemente después de compresiones prolongadas del nervio, como la "parálisis del sábado noche" o después de utilizar torniquetes con presión excesiva. El nervio se recupera por sí mismo cuando se regenera la mielina, lo que suele llevar semanas o meses, pero hay recuperación completa (*Dosios T, 2005*).

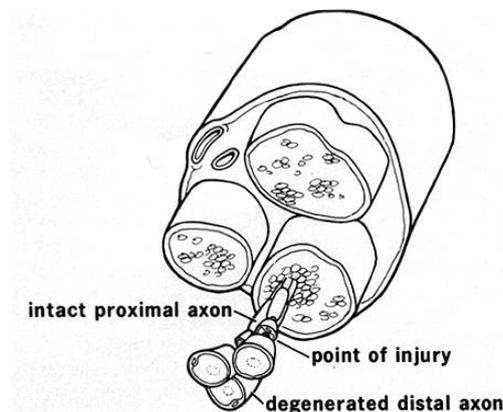


Figura 1. 15 Neuroapraxia.

Ruptura de los axones individuales resultantes. El nervio se mantiene intacto, excepto para los elementos lesionados. **Raffe MR.** *Peripheral nerve injuries in the dog. Part II. Compendium on Continuing Education for the Small Animal Practitioner* 1:269-276, 1979.

## 2. Axonotmesis

Implica una lesión axonal. Los tubos endoneurales están íntegros en todo el nervio. La lesión suele deberse a un fuerte aplastamiento o tracción, con la intensidad suficiente para romper el axón. Se produce degeneración walleriana de la zona distal a la lesión. El tiempo requerido para la recuperación funcional es el que necesita el axón para regenerarse y reinervar los órganos diana (1 mm/día de velocidad de crecimiento). El pronóstico de reinervación suele ser bueno puesto que se encuentran íntegros los tubos endoneurales (*Ohana et al., 2012*). Sin embargo, pueden producirse daños irreversibles en el tejido muscular durante el tiempo que existe denervación y fibrosis intraneural de graves consecuencias para la regeneración (*Rosaria et al., 2012*).

## 3. Neurotmesis

Conlleva una sección completa del nervio o destrucción total de sus estructuras inferiores. La regeneración espontánea es imposible y en tal situación es necesaria la intervención quirúrgica (*Leis et al., 2003; Rosaria et al., 2012*).

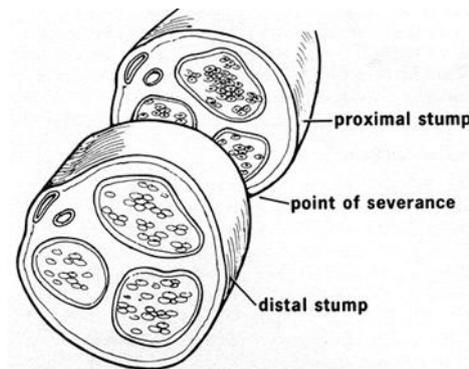


Figura 1. 16 **Neurotmesis.**

Resultado de la sección de la totalidad de los troncos nerviosas en la neurotmesis. **Raffe MR.** Peripheral nerve injuries in the dog. Part II. *Compendium on Continuing Education for the Small Animal Practitioner* 1:269-276, 1979.

Las lesiones de los troncos nerviosos que se ven en la clínica son de carácter mixto, y en muchas ocasiones, no se pueden incluir en ninguno de los grupos de Seddon; por ello, Sunderland introdujo una clasificación más detallada, basada en la estructura anatómica lesionada (*Sunderland S, 1951*).

En la clasificación de Sunderland, los dos primeros grados son iguales que en la de Seddon, pero el tercero (neurotmesis) fue subdividido en tres grupos: grado III hay pérdida de la continuidad axonal y del endoneuro; el perineuro está íntegro, pero hay sangrado intrafascicular, edema e isquemia, lo que va a desencadenar fibrosis; el grado IV es más grave, pues se pierde además la integridad del perineuro; y el grado V supone la lesión de todas las estructuras del nervio (*Mc Carroll HR, 1987; Irisarri C, 1992*).

- Grado 1. Bloqueo de la conducción en el axón, probablemente bioquímica y sin lesión anatómica del mismo, con recuperación funcional espontánea en días o hasta 5-6 semanas sin degeneración Walleriana. Corresponde a la llamada "neuroapraxia".

- Grado 2. Lesión pura del axón conservándose la capa endoneural, con lo que el axón se somete a los procesos de degeneración y regeneración, pero con las máximas probabilidades de una recuperación funcional "ad integrum", al llegar el axón regenerado a su diana periférica sin pérdida pues se conserva el tubo endoneural. Corresponde a la llamada "axonotmesis".

- Grado 3. Supone la lesión anatómica del axón y del tubo endoneural, aunque se conserva la estructura fascicular. Ahora los axones regenerados deben atravesar una cicatriz que bloquea los tumos endoneurales, por lo que los brotes axonales deben explorar y buscar los tubos distales disponibles y la exactitud en la llegada a las dianas asignadas es peor. Corresponde a una "axonotmesis-neurotmesis" de predominio axonotmético (*Moradzadeh et al., 2010*).

- Grado 4. Ahora se lesionan tanto el axón como el endoneuro y perineuro, con lo que se pierde la estructura fascicular y el nervio mantiene la continuidad a expensas del epineuro. La recuperación funcional es mucho peor. Corresponde a una "axonotmesis-neurotmesis" de predominio neurotmético.

- Grado 5. Se trata de una transección completa del nervio, sin posibilidades de recuperación funcional de ningún tipo y que corresponde a la "neurotmesis".

Classification of nerve injuries				
Degree of injury	Endoneurium	Perineurium	Epineurium	Tinel's sign
I. Neurapraxia				-
II. Axonotmesis				+
III.	+			+
IV.	+	+		+
V. Neurotmesis	+	+	+	+
VI. Variable injury to individual fascicles				

Tabla 1. 1 **Clasificación de la lesión del nervio periférico**

Correspondencia entre las dos clasificaciones de mayor relevancia de las lesiones de los nervios periféricos. Seddon v Sunderland.

Mackinnon y Dellon añadieron un nuevo grupo a la clasificación. Éste sería el sexto grado, llamado por los autores lesión mixta o neuroma en continuidad. Combina diferentes tipos de lesiones en los distintos fascículos a lo largo del nervio (*Mackinnon & Dellon, 1988*). Es la lesión más difícil de tratar, pues se juntan fascículos normales con potencial para la recuperación con otros gravemente lesionados que han de ser sustituidos por injertos.

## 9.- TRATAMIENTO INICIAL DE LAS LESIONES NERVIOSAS

Como en cualquier otra patología, el tratamiento inicial del paciente con una lesión nerviosa se iniciará por una cuidadosa valoración de las funciones vitales: evitar el fracaso cardio-pulmonar, el shock, pautando antibioterapia sistémica, profilaxis antitetánica... Una vez estabilizadas las funciones vitales se valorarán cuidadosamente las lesiones de los nervios periféricos (*Jobe & Martínez, 2004*).

Una herida con lesión nerviosa periférica es preciso lavarla y desbridarla cuidadosamente, eliminando cualquier material extraño o necrótico. Si la herida es limpia y reciente, el estado del enfermo es estable y satisfactorio, existe un ambiente quirúrgico tranquilo, sin prisas y con el material y personal adecuados, es preferible una reparación inmediata del nervio.

Si el estado general del paciente no es adecuado o si las circunstancias no son las idóneas, es preferible realizar una reparación durante los 3-7 días posteriores a la lesión. En este caso se cubrirá la herida con un apósito estéril observando la aparición de signos de infección.

En heridas por explosiones, abrasiones o aplastamientos y cuando la contaminación con cuerpos extraños es elevada, se debe lavar y desbridar cuidadosamente, cubriéndola con un apósito estéril. Si se encuentran los extremos nerviosos, deben marcarse con sutura de acero o plástico no reabsorbible para encontrarlos fácilmente en su posterior reparación. Si no hay separación importante de los extremos se debe realizar una aposición término-terminal sin tensión. Si existiera un defecto segmentario, los extremos deben suturarse a tejido blando para evitar la

retracción. Tras cubrir la herida con tejido blando, la neurorrafia se demora entre 3 y 6 semanas, cuando hayan cicatrizado los tejidos blandos.

En una lesión traumática cerrada con lesión nerviosa debe valorarse la función residual, manteniéndose las articulaciones flexibles, evitando la retracción de tejidos blandos y manteniendo en lo posible un adecuado tono muscular. Para ello, las férulas dinámicas o estáticas y la fisioterapia juegan un papel importantísimo.

Las fracturas con lesión neurológica asociada requieren un tratamiento inicial conservador, con electromiogramas y evaluaciones clínicas periódicas, evitando la exploración quirúrgica inicial.

Los déficits neurológicos debidos a la manipulación o inmovilizaciones de fracturas con escayola deben ser explorados quirúrgicamente de forma inicial.

## **CIRUGÍA DE LAS LESIONES NERVIOSAS**

La exploración quirúrgica del nervio está indicada si existe un déficit neurológico de causa traumática (*Topuz et al., 2011*):

- Cuando una lesión aguda ha seccionado un nervio claramente. La reparación puede ser inmediata o indefinida.
- Cuando una herida por abrasión, avulsión o explosión ha dejado al nervio en situación desconocida. Los extremos deben marcarse para una posterior neurorrafia.
- Cuando el déficit nervioso sigue a un traumatismo cerrado y no hay pruebas clínicas o eléctricas de regeneración pasado un tiempo adecuado.
- La exploración quirúrgica debe retrasarse en pacientes que presenten signos de regeneración progresiva: en fuerza, sensibilidad, pruebas eléctricas y avance del signo de Tinel.

## 1. Cronología

El momento de la reparación del nervio depende del tipo de lesión nerviosa, el estado de la herida, y el suministro vascular del sustrato de apoyo nervioso (*Spinner & Kline, 2000; Siemionow & Sari, 2004a*). En los casos de secciones nerviosas agudas con ninguno o mínimo componente de aplastamiento, buen suministro de sangre y herida limpia, la reparación del nervio principal es la mejor opción para restaurar la función.

Históricamente, la reparación directa se realizaba 3 semanas después de la lesión inicial para dar tiempo a la degeneración walleriana completa. En los estudios realizados por Mackinnon et al., se obtuvieron mejores resultados con la sutura inmediata del nervio seccionado (*Mackinnon SE, 1989*). Actualmente, la cirugía primaria se lleva a cabo dentro de las 72 h hasta 7 días después de la lesión del nervio (*Dvali & Mackinnon, 2003*).

Sin embargo, cuando no se cumplen los criterios de reparación inmediata, se requiere la reparación tardía. También se prefiere la reconstrucción secundaria de las lesiones nerviosas incompletas y cuando la recuperación natural podría dar mejor resultado que la reparación quirúrgica. La falta de signos clínicos y electrofisiológicos de la recuperación espontánea después de 3-6 meses impone una intervención quirúrgica (*Campbell WW, 2008*). El grado de daño a los muñones del nervio después de una sección roma del nervio o una avulsión, también se puede evaluar con mayor precisión varias semanas después de un trauma.

El retraso en la reparación quirúrgica también es uno de los factores conocidos que influyen de manera significativa en el pronóstico de las lesiones del nervio periférico (*Ruijs et al., 2005*). El tiempo de retraso está limitado por la viabilidad de las células de Schwann y los tubos endoneurales. Se ha demostrado que no sólo la axotomía prolongada sino también la denervación prolongada podría afectar a la recuperación funcional después de la reparación diferida del nervio (*Jonsson et al., 2013*). El mantenimiento del tejido muscular es dependiente de la estimulación eléctrica y neurotrófica que se pierden cuando el nervio se lesiona. Esto se traduce en atrofia, cambios mecánicos y moleculares en el músculo. La velocidad y la fuerza de la contracción se reducen y hay a menudo una conversión de un fenotipo de contracción

lenta hacia las fibras de contracción rápida (*Midrio M, 2006; Ashley et al., 2007*). Es esencial que los tubos endoneurales estén en contacto para la regeneración de los axones dentro de los 18-24 meses después de la lesión; de lo contrario se producirá la degeneración. Entonces la atrofia muscular se convierte en irreversible después de 12-18 meses de denervación, lo que limita el resultado funcional de la reparación (*Campbell WW, 2008*). Los receptores sensoriales sobreviven por un tiempo mucho más largo, y así la función sensorial puede ser restaurada después de intervalos de tiempo más largos, incluso años después del trauma inicial. La retracción de los troncos nerviosos que puede alcanzar hasta un 8% de la longitud del nervio dentro de las tres primeras semanas, puede hacer la reparación secundaria técnicamente más exigente que la reparación primaria o puede requerir injerto de nervio (*Trumble et al., 1999*).

## **2. Instrumental y equipo**

La disponibilidad de un estimulador nervioso es de gran utilidad para localizar y conservar los fascículos nerviosos funcionantes incluidos en tejido cicatricial, así como para explorar los nervios parcialmente seccionados y los neuromas en continuidad; los hay desechables o reutilizables (*Urbanek et al., 2011*).

Es indispensable el disponer de material quirúrgico de precisión adecuado para una correcta manipulación de los tejidos. Las gafas-lupa son básicas para una adecuada visualización fascicular. El manguito neumático, bisturí eléctrico-bipolar, aspirador y productos antiadherentes que evitan la fibrosis perineural son también de gran utilidad. Para la sutura se debe emplear un monofilamento no reabsorbible de 8/0 o 9/0 para las reparaciones epineurales, y de 9/0 o 10/0 para la sutura perineural o epiperineural.

## **3. Anestesia**

Puede ser empleada tanto la local, la regional o la general aunque de forma estandarizada se emplea la anestesia general para el cuello y los miembros superiores (en ocasiones la regional) y la general o espinal para los inferiores (*Wu et al., 2011*).

Los anestésicos locales trabajan produciendo bloqueo de la conducción nerviosa a nivel de los receptores de membrana. El agente más comúnmente utilizado es la lidocaína. La adición de epinefrina (EN) reduce el sangrado y la absorción sistémica por vasoconstricción local. El límite de toxicidad de la lidocaína se 5mg/kg sin epinefrina y 7mg/kg con la epinefrina.

Una de las ventajas de la utilización de la anestesia regional es reducir los requisitos de opioides por vía intravenosa con el fin de aliviar adecuadamente el dolor. Un bloqueo funcional del nervio periférico, usando un anestésico local de larga duración con tiempo de inicio rápido, atenúa la respuesta al estrés a las lesiones, y reduce la incidencia de los efectos secundarios de los opioides relacionados con la dosis incluyendo la depresión respiratoria, el aumento de la sedación, la confusión, el prurito, y las náuseas (*Malchow & Black, 2008*). Los beneficios adicionales son el transporte más seguro de los pacientes, una menor necesidad de control médico y un paciente estable, cómodo, y despierto en la mesa quirúrgica, lo que permite la disminución de personal (*Barker et al., 2008; Luyet et al., 2013*).

#### **4. Preparación del campo**

Se debe preparar toda la extremidad y, en el caso de lesiones distales, colocar el manguito neumático (bien almohadillado) proximalmente al codo o la rodilla según proceda; en lesiones más proximales debe valorarse el empleo de un manguito de isquemia estéril.

## **TÉCNICAS DE REPARACIÓN NERVIOSA**

La reparación del nervio debe hacerse de inmediato o sólo ligeramente retrasado (1-2 días) en un ambiente bien vascularizado. La técnica fue descrita por Millesi en cuatro pasos importantes: 1. Preparación del extremo del nervio. 2. Aproximación (longitud de separación y tensión). 3. Coaptación. 4. Mantenimiento (*Millesi et al., 1972*).

Para suturar un nervio periférico es recomendable utilizar lupas quirúrgicas (3,5 aumentos) o un microscopio si hay alguno disponible aumentando aún más la visualización (*McManamny DS, 1983*). La capacidad del ojo humano para discriminar potencialmente importantes estructuras anatómicas es limitada, lo que podría ser perjudicial para los resultados clínicos. Aunque no es jurídicamente obligatorio, aconsejan el uso de dispositivos ópticos de aumento para lograr resultados óptimos en la microcirugía y cirugía de la mano (*Schoeffl et al., 2013*).

Es imprescindible realizar una incisión amplia tanto proximal como distal a la lesión y siempre que se pueda, siguiendo el trayecto del nervio. Nunca se deben hacer incisiones perpendiculares a los pliegues de flexión de la piel (*Wu T, 2006*).

Se debe descubrir el nervio lesionado primero en sentido proximal y después distal a la lesión. En caso de neuroma de continuidad debe estimularse proximal y distalmente, así como cuando se disecciona un nervio de tejido cicatricial. Antes de movilizar el nervio, se deben dar puntos en el epineuro para evitar una malrotación posterior; el manejo del nervio debe realizarse con Vessel Loop® húmedo, nunca con hilos de sutura. Se deben cubrir con gasas húmedas las partes del nervio que estén expuestas y sobre las que no se están operando.

Es importante no hacer la reparación demasiado a tensión (adaptación libre); se prefiere un pequeño espacio entre los extremos, basado en el concepto de la reparación del tubo nervioso (*Schmidhammer et al., 2004*). La amplia movilización del nervio o la disección intrafascicular debe evitarse ya que esto probablemente no mejora los resultados, sino más bien induce cicatrices.

Para valorar la estimulación motora es preciso desinflar previamente el manguito para que el músculo y el nervio se recuperen de la isquemia.

Bora demostró que no había diferencia entre las reparaciones por sutura epineural y perineural, y que la acumulación de los hilos de sutura en el tejido perineural provocaba una reacción de cuerpo extraño, creando un obstáculo adicional para la regeneración nerviosa (*Bora FW Jr, 1978; Burke FD, 1990*). Por su parte, Lundborg observó que la disección intraneural es agresiva, porque desvasculariza el nervio y crea una intensa fibrosis (*Lundborg G, 1988*).

La técnica microquirúrgica bien empleada contribuye sobre todo a preservar el nervio y su entorno y a minimizar el traumatismo quirúrgico. Por estas razones debe evitarse la oposición doctrinaria entre sutura epineural y perineural. En realidad, ambas técnicas son a menudo complementarias, y según el traumatismo, es necesario asociar las distintas técnicas para mejorar la unión de los grupos fasciculares sin crear trastornos intraneurales mayores.

## **1. Sutura término-terminal**

La técnica de unir un extremo distal de un nervio lesionado al extremo de un nervio donante no lesionado, cuando no hay extremo proximal del nervio disponible, es una técnica que fue introducida en 1990. Incluso si se ha utilizado con éxito clínicamente (*Frey et al., 2003*), la controversia principal ha sido el mecanismo y las consecuencias para los axones en el extremo distal del nervio adjunto. En estudios doble ciego, se ha observado cierto brote colateral, pero esto no es probablemente el mecanismo principal. Un cierto grado de lesión del nervio donante es probablemente necesario para conseguir la activación de la neurona y el crecimiento de los axones (*Bontioti et al., 2006*). Incluso si ocurre la recuperación de los músculos inervados por el segmento distal del nervio adjunto, esta técnica de reparación se utiliza con más frecuencia para la reconstrucción del nervio sensorial (*Frey et al. 2003*).

Los estudios experimentales no mostraron ventaja en cuanto a la precisión de alineación fascicular lograda en la reparación, sobre la técnica epineural estándar,

cuando se comparan los resultados funcionales (*Bratton et al., 1979; Hudson et al., 1979; Levinthal et al., 1977; Lundborg et al., 1997*).

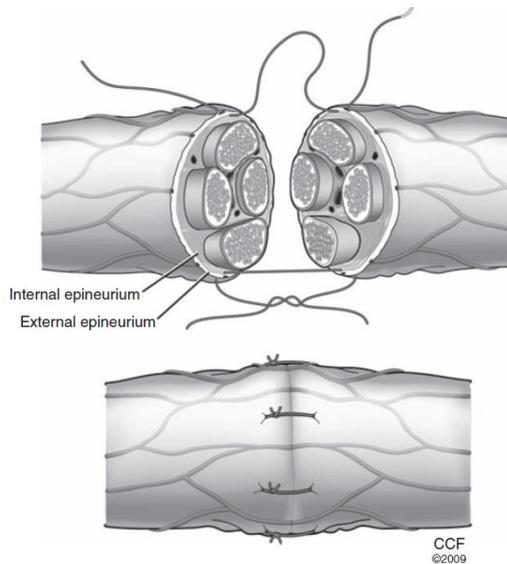


Figura 1. 17 **Sutura término-terminal.**

Diagrama de reparación término-terminal estándar. Los cabos se alinean según la posición de los vasos sanguíneos dentro del epineuro. Las suturas se pasan a través de la cara interna y la externa del epineuro del muñón proximal y distal. Siemionov M & Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

#### ❖ *Sutura epineural*

Los puntos de la sutura epineural se apoyan en una estructura conjuntiva, bien vascularizada y resistente. A fin de quitar tensión a la zona de la sutura, comenzamos por un punto posterior epineural, efectuado con Prolene o Ethilon 6/0. Después se siguen dando puntos en toda la periferia del nervio. Este tipo de sutura, se combina modernamente con el anclaje de algunos puntos en el perineuro de los fascículos más periféricos para mejorar el afrontamiento y evitar que aquellos se inviertan (*Merle et al, 1993; Mafi et al., 2012*).

Una lesión del nervio por continuidad resulta de la interrupción de la función axonal, pero se conserva la estructura del tejido conectivo. Una lesión nerviosa más severa como axonotmesis o neurotmesis garantiza la reparación del epineuro porque el tejido conectivo está dañado. El entumecimiento y parálisis varía en función de la cantidad de pérdida funcional debido a la interrupción axonal. El procedimiento se

puede aplicar a cualquier epineuro nervioso, diferentes tamaños fasciculares y fascículos no agrupados; en comparación con la reparación perineural de los grupos fasciculares (*Bersnev et al., 2009*).

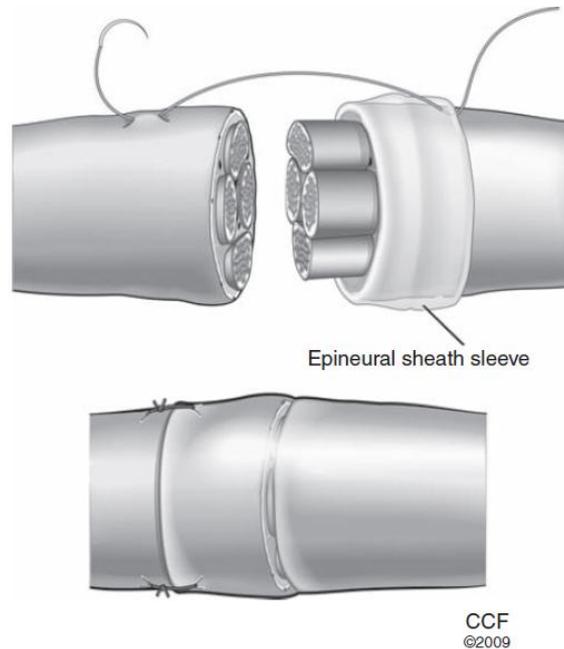


Figura 1. 18 **Sutura epineural.**

Diagrama de la sutura epineural. El borde libre de epineuro del muñón distal se revierte y se disecciona 2 mm.

Se reseca un segmento de 2 mm de nervio distal. Se envuelve el nervio proximal con la cobertura epineural respetada, que se ancla al epineuro 2 mm proximal al sitio de coaptación con dos suturas de 10-0 colocadas a 180°. **Siemionov M & Brzezicki G.** Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

#### ❖ *Sutura perineural*

También denominada fascicular. En realidad, la reparación se efectúa a partir de grupos fasciculares aglutinados. Los puntos de sutura se realizan con hilos de 10/0, montados en agujas de 50-70 µm de diámetro. La transfixión de la cobertura perineural es delicada, porque este tejido es a la vez elástico y resistente. Una manipulación poco cuidadosa del grupo fascicular puede dañar el tejido perineural y, por otra parte, la presión del fluido intraneural puede crear un efecto “en cuerno de caracol” perjudicial para la aproximación fascicular. Para evitar estos inconvenientes, resulta útil efectuar un

contra apoyo con una pinza de microcirugía en el momento de pasar el hilo. El número de puntos de sutura por grupo fascicular debe ser limitado (*Mackinnon SE, 1989; Sunderland S, 1990; Harris & Tindall, 1991; Dahlin & Lundborg, 2001; Siemionow & Ozer, 2002; Tetik et al., 2002; Maggi et al., 2003; Dvali & Mackinnon, 2003*). Si se logra un buen afrontamiento, puede bastar un solo punto, gracias a la contención adicional suministrada por los puntos interfasciculares o epineurales.

La sutura perineural estricta no es deseable, porque en lugar de tener que suturar 5 o 6 grupos fasciculares, el cirujano individualiza hasta 15 o 20 fascículos difíciles de afrontar. La inter-neuro-dissección provoca entonces daños vasculares, a los que se agrega una reacción inflamatoria producida por el importante número de puntos de sutura. Resulta útil dominar bien estos distintos tipos de sutura y evitar el dogmatismo, ya que la naturaleza del traumatismo y de la lesión será la que imponga la técnica de reparación. La sutura epineural es la que se emplea en lesiones proximales y en cortes limpios. La sutura fascicular es más útil en lesiones distales.

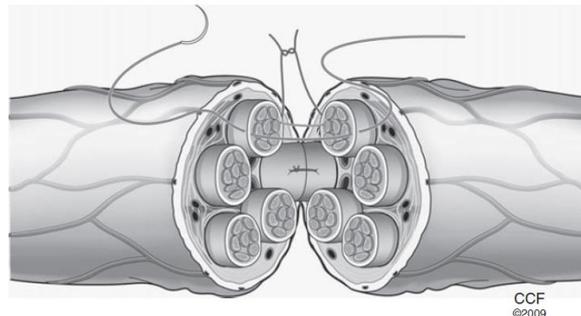


Figura 1. 19 **Sutura perineural.**

Presentación esquemática de la reparación de grupos fasciculares. El epineuro se retrae antes de coaptación. El grupo correspondiente de fascículos se suturan con 2-3 suturas que pasan por el epineuro interfascicular. **Siemionov M & Brzezicki G.** Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

## 2. Injertos nerviosos autólogos

Cuando existe un defecto de tejido nervioso, bien por pérdida en el traumatismo o por resección en el acto quirúrgico debido a la inviabilidad de un segmento nervioso,

hay que decidir cómo salvarlo. Los extremos de los nervios se inspeccionan para valorar la viabilidad y medir el tamaño del defecto. Cuando el defecto es pequeño, se puede suturar el nervio disminuyendo la tensión por varios métodos: acortamiento óseo, flexión de las articulaciones, transposición nerviosa, o liberación de los extremos del nervio.

Cuando es un defecto grande (mayor de 2 cm) no queda más remedio que utilizar injertos nerviosos, autólogos en un principio, para evitar suturas a tensión, porque la tensión paraliza la regeneración nerviosa (*Millesi et al., 1972; Schmidhammer et al., 2004*).

Las fuentes de injertos nerviosos son nervios sensitivos, cuya falta no crea un defecto importante, por orden de frecuencia en su utilización son: nervio sural, nervio cutáneo antebraquial lateral, la división anterior del nervio antebraquial cutáneo medial, la rama cutánea dorsal del nervio cubital y la rama sensitiva superficial del nervio radial (*Matsuyama et al., 2000*). En algunos casos, se puede emplear la rama dorsal cutánea del nervio cubital, o la rama sensitiva del mediano del 3° y 4° dedos. En amputaciones múltiples se pueden usar algunos nervios de estructuras que no van a ser reimplantadas como fuente de injertos. Con el fin de elegir el mejor injerto de nervio autólogo, un cirujano tiene que tener en cuenta el calibre del nervio a reparar, la longitud del defecto y la morbilidad del sitio donante.

La técnica de "injerto cable estándar" hace hincapié en la necesidad de obtener la máxima cobertura del área de sección transversal del nervio lesionado. En pequeños nervios, como los digitales, sólo un cable se requiere generalmente para la reparación, mientras que en las lesiones más proximales de los nervios principales, como el nervio mediano, se necesitan más cables para cubrir el área de la sección transversal de los cabos nerviosos. En defectos largos en grandes troncos, puede ser necesaria la obtención de injerto de varios puntos donantes para lograr la cantidad adecuada de material para la reparación. Para disminuir la morbilidad de la zona donante y ampliar la disponibilidad del material de autoinjerto, *Siemionow & Arslan en 2004* investigaron el método de un solo fascículo de reparación del nervio. Completaron un estudio experimental en nervios ciáticos de rata que reveló una regeneración más rápida y con mejores resultados funcionales en el grupo tratado con un solo fascículo, que cubría el 25-59% del área de sección transversal en comparación con el injerto convencional.

En casos en los que hay una pérdida de sustancia nerviosa se reseca el neuroma proximal y el glioma distal hasta la zona donde haya un patrón fascicular normal. Después, se disecan 2 o 3 cm de los extremos preparando los grupos fasciculares que se adaptan al grosor del injerto nervioso que vamos a colocar y se van suturando los injertos, con dos o tres puntos, a cada grupo fascicular que hemos preparado. Los injertos de nervios están orientados de manera inversa. Es aconsejable que el injerto de nervio se coloque sobre tejidos con vascularización óptima porque la supervivencia de la célula de Schwann depende inicialmente de la difusión de los alrededores y más tarde del proceso de revascularización de los alrededores y de los extremos del nervio adjuntos (*Xu et al., 2005*).

Modernamente se utiliza el pegamento biológico de fibrina (Tissucol®) para mejorar la coaptación, aumentar la fuerza de la sutura y dar más estabilidad a la zona de los injertos (*Narakas A, 1988; Silva et al., 2012; Rafijah et al., 2013*). Cuando la lesión nerviosa es parcial, se abre el epineuro longitudinalmente, se disecan los fascículos lesionados, sin lesionar el epineuro de los sanos, se cortan donde se observe zona sana y se colocan los injertos puenteando el defecto. Esta situación es la más difícil en la cirugía nerviosa diferida y se requiere la ayuda de estudios electrofisiológicos intraoperatorios para distinguir bien los fascículos viables de los que no lo estén (*Wright & Jobe, 1992*).

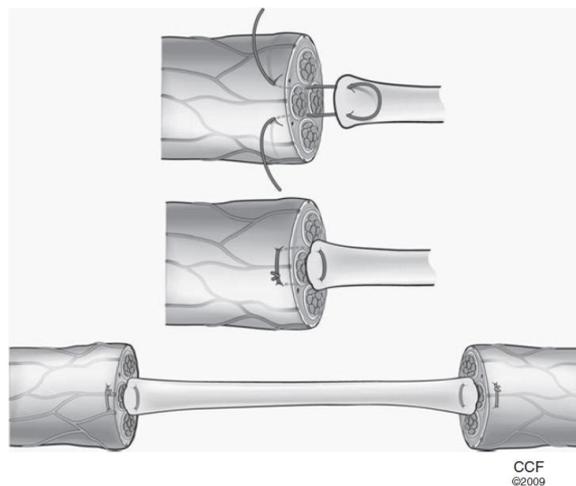


Figura 1. 20 **Injerto nervioso autólogo.**

Reparación del nervio fascicular único. El único fascículo disecado del nervio donante se coapta con una sola sutura de colchonero horizontal. Se logra la alineación central del injerto, puente entre los cabos proximal y distal de la reparación. **Siemionov M & Brzezicki G.** Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

### 3. Aloinjertos

El aloinjerto proporciona células de Schwann donantes que aporten orientación y viabilidad para permitir el crecimiento axonal para pasar desde el extremo proximal al muñón distal y reinervar los órganos diana. La principal ventaja de los aloinjertos nerviosos en comparación con los autoinjertos es la falta de morbilidad del sitio donante y la longitud prácticamente ilimitada de tejido nervioso disponibles para el trasplante. La inmunogenicidad del injerto del nervio tiende a disminuir a medida que avanza el proceso de intercambio de las células de Schwann de origen al donante (*Midha et al., 1993, 1994; Liu et al., 2012*). Requiere un tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo del injerto.

El aloinjerto nervioso ha sido discutido y puede requerir un tratamiento de por vida con fármacos inmunosupresores, tales como FK506 (Tacrolimus), con potenciales efectos adversos. FK506 per se probablemente no tiene ningún efecto positivo sobre la regeneración axonal. El desarrollo reciente de las estrategias de inmunosupresores en el trasplante mediante el bloqueo de la coestimulación de células T, induciendo de ese modo el mantenimiento a largo plazo de la inmunosupresión, también puede funcionar para el nervio aloinjerto (*Kvist et al. 2007*). Las estrategias para la prevención del rechazo de aloinjertos incluyen gran coincidencia de histocompatibilidad MHC, el tratamiento previo del injerto, la inmunosupresión de acogida y las estrategias que inducen tolerancia.

### 4. Conductos biológicos

Los conductos biológicos incluyen arterias (*Itoh et al., 1996*), venas (*Chiu et al., 1982; Walton et al., 1989; Tang JB, 2008*), las cámaras mesoteliales (*Lundborg & Hansson, 1980*), músculo esquelético fresco o desnaturalizado (*Itoh et al., 1996; Battiston et al., 2007*) y la vaina epineural (*Karacaoglu et al., 2001*). El injerto de vena se propuso para promover el crecimiento axonal y proporcionar un ambiente rico en colágeno, laminina y células de Schwann que se encuentran en la adventicia de los vasos (*Wang et al., 1995*). El músculo proporciona una adhesión adecuada de las fibras

nerviosas en crecimiento dirigidas por la lámina basal (rica en laminina y fibronectina), que se asemeja a la adhesión de las células de Schwann (*Battiston et al., 2007*). Otro material que se ha probado experimentalmente es el tubo epineural vacío. El origen neural es la ventaja potencial de este conducto sobre otros tubos biológicos. La alta concentración de B2-laminina y la expresión del VEGF proporcionan un ambiente altamente neuro-permisivo para la unión de células de Schwann y el crecimiento hacia el interior axonal.

La baja antigenicidad del tejido epineural permitirá el trasplante alogénico del conducto epineural a partir de cadáveres posiblemente sin la necesidad de la inmunosupresión en el receptor del injerto (*Liu et al., 2012*).

## **5. Reparaciones en tubo de silicona**

El tubo de silicona se ha empleado ampliamente en el laboratorio para estudiar la fisiología de la reparación nerviosa (*Lundborg & Hansson, 1979*). En la práctica clínica los tubos se han empleado con dos propósitos:

- Como alternativa a la sutura nerviosa primaria (se deja deliberadamente un corto espacio entre los extremos nerviosos).
- Como alternativa a los injertos nerviosos cuando el defecto de tejido es corto.

El uso de tubos en la sutura nerviosa tiene ventajas potenciales: concentración de factores neurotróficos en la zona de la lesión, el coágulo de fibrina formado dentro del tubo favorece el avance longitudinal de los axones, y la técnica es simple y no añade traumatismo al nervio por la sutura. Ha sido ya empleado por varios autores como alternativa a la sutura primaria y los resultados son esperanzadores (*Lundborg et al., 1997; Yang et al., 2011*). En reparaciones secundarias la experiencia es menor y los tubos no son aconsejables cuando el defecto nervioso excede los 5 cm (*Martín-Ferrero MA, 1996; Dellon & Mackinnon, 1988; Norris et al., 1998; Kemp et al., 2009*).

Durante los últimos 25 años había esperanza de que diversas técnicas de tubo pudiesen mejorar los resultados. Esencialmente, no hay ninguna diferencia en el

resultado funcional después de la reparación del nervio con técnicas de sutura convencionales y los tubos nerviosos, con la excepción de mejores umbrales para el tacto / presión a 1 año y menor intolerancia al frío después de 5 años con el último método (Lundborg *et al.*, 2004; Kemp *et al.*, 2009). Existen otros materiales, a parte de la silicona que pueden ser útiles para configurar los tubos (Meek & Coert, 2002; Battiston *et al.*, 2005; Ichihara *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011): otro polímero no reabsorbible (politetrafluoroetileno expandido PTFE), y 4 conductos reabsorbibles (polímero de ácido poliglicólico (PGA), polímero de polilactida-caprolactona (PLCL), polímero de ácido poliglicólico revestida con colágeno reticulado (PGA-c), y colágeno de tipo I) (Schlosshauer *et al.*, 2006). Los implantes no reabsorbibles apoyan la regeneración inicial, pero pueden interferir con las fibras nerviosas en maduración, causando la compresión de los axones sensibles a la presión.

La aplicación de guías nerviosas reabsorbibles artificiales para salvar defectos nerviosos hasta 3 cm tiene la misma tasa de éxito que la reparación con autoinjerto de nervio, lo que resulta en la recuperación en hasta el 69% de los casos (Mackinnon & Dellon, 1988; Evans GR, 2000; Lee & Wolfe, 2000).

## **6. Transferencias nerviosas**

El principio de una transferencia nerviosa es utilizar nervios proximales sanos, o una parte de ellos, de los que se pueda prescindir para inervar ramas distales de un nervio lesionado. Es famosa, por su buena función, la transferencia de las ramas motoras del nervio cubital para inervar el nervio músculo-cutáneo lesionado (Palazzi *et al.*, 2000). También se pueden hacer transferencias de nervios sensitivos como por ejemplo en las lesiones altas del plexo braquial, en las que queda un defecto sensitivo en los primeros dedos, pudiéndose transferir colaterales del tercero o del cuarto espacio al colateral radial del segundo y cubital del pulgar.

## **7. Neuroma en continuidad (neurolisis)**

La limpieza quirúrgica de la fibrosis intraneural que ahoga en ocasiones la conducción nerviosa es una técnica crítica para la evaluación de lo que se conoce con el

nombre de “neuroma en continuidad” (lesión de grado IV de Mackinnon y Dellon), que es aquella lesión en la que se juntan los 5 grupos patológicos de Sunderland. Se utiliza para diferenciar los fascículos viables, (aquellos que presentan una lesión del grupo I, II o III), de los no viables (los que presentan lesión del grupo IV o V). Es una técnica difícil de realizar, pudiéndose lesionar los fascículos nerviosos normales.

## **8. Transferencias tendinosas**

En los casos donde no es posible reparar o reconstruir una lesión nerviosa, las transferencias tendinosas pueden ser una alternativa. Hay una variedad de transferencias que pueden restaurar la función de la mano y el brazo en pacientes después de las lesiones nerviosas (*Omer & Graham, 2006*). Es importante que se tomen en cuenta las necesidades individuales del paciente en la planificación de las transferencias de tendón.

En cuanto al nervio ciático, la transferencia más común es del tendón del tibial posterior al tibial anterior (*Aydin et al., 2010*). Esta transferencia proporciona apoyo al pie y así previene al retropié de la inversión y deformidad en varo. Puede llevarse a cabo simultáneamente con la reparación de los nervios o como un procedimiento secundario. Algunos autores recomiendan la transferencia del tendón tibial posterior en el momento de la reparación del nervio ciático en casos con factores de mal pronóstico (*Millesi H, 1987; Kim et al., 2004*). Ferraresi informó que los resultados de la reparación del nervio pueden mejorar con la combinación de la transferencia de tendón (*Ferraresi et al., 2003*). El mecanismo de esta mejora fue propuesto como la estimulación de regeneración de los nervios, secundaria al permiso para realizar rehabilitación, por la corrección temprana del desequilibrio de flexión-dorsiflexión y la movilización temprana.

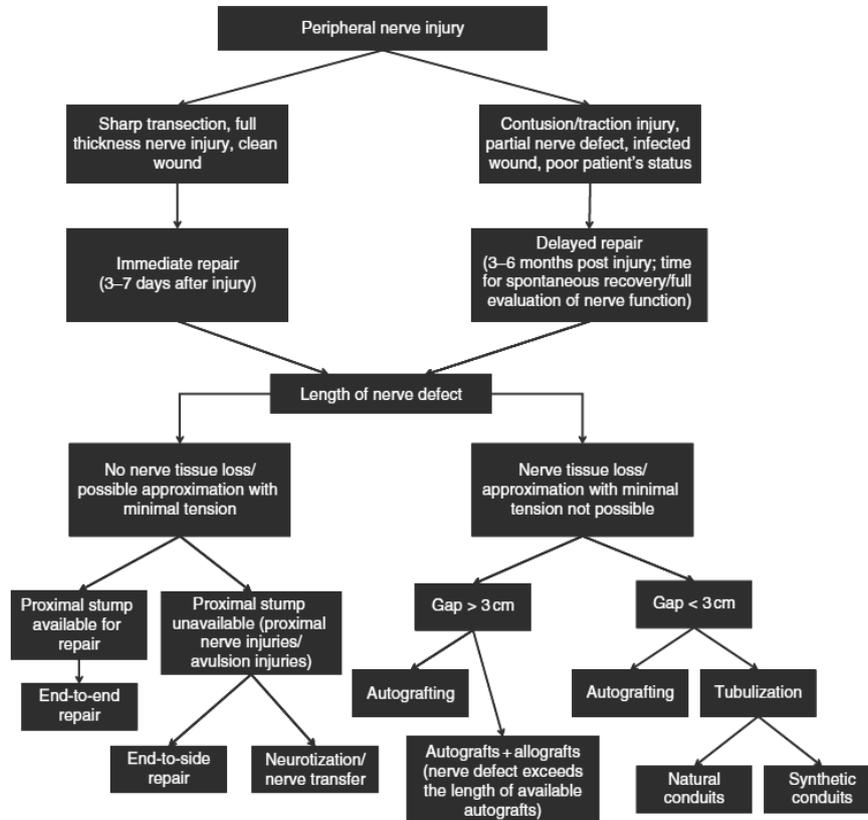


Figura 1. 21 **Algoritmo de diagnóstico y tratamiento ante una lesión del nervio periférico.**  
 Algoritmo de reparación del nervio periférico. **Siemionov M & Brzezicki G.** Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

## 10.-REHABILITACIÓN POSTOPERATORIA

Después del tratamiento quirúrgico el miembro ha de ser inmovilizado durante tres o cuatro semanas, según la gravedad de la lesión. Una vez retirada la inmovilización hay que iniciar fisioterapia motora, mediante estimulación eléctrica pulsátil de los músculos denervados, seguida de ejercicios activos del músculo según se vaya reinervando.

Después de la regeneración nerviosa hay siempre algunas fibras sensitivas equivocadas, que provocan alteraciones en la localización de la sensibilidad. Cuanto antes se inicie la rehabilitación y más se insista en la reeducación sensitiva, mejor reinterpretados por el enfermo van a ser los nuevos impulsos nerviosos. Se empieza por desensibilizar en el postoperatorio inmediato y en el momento en que el paciente comienza a tener tacto se inicia el trabajo en la localización de aquél, la percepción del movimiento, la distinción de objetos y texturas... Siempre hay que hacerlo de forma lenta y progresiva para que no aparezca la frustración en el enfermo (*Merle M, 1993; Birch et al., 1998*).

La reorganización funcional del córtex somato-sensorial es probablemente la primera razón de la recuperación incompleta de la estereognosis después de una reparación nerviosa en el adulto (*Ròsen & Lundborg, 2005*). La recuperación de la función sensitiva requiere una reprogramación cerebral, un proceso de reaprendizaje que puede ser sencillo en los niños, pero que es muy complicado en los adultos. Los programas de entrenamiento específico de la sensibilidad han demostrado que es posible reprogramar el cerebro mediante una combinación de acciones visuales y sensoriales (como cuando se aprende una nueva lengua), consiguiendo volver a tener algunas funciones estereognósicas útiles (*Dellon AL, 1981; Merzenich & Jenkins, 1993*).



Figura 1. 22 **Rehabilitación postoperatoria.**

“Scan-Mirror” es un espejo diseñado especialmente para la terapia de retroalimentación visual. La terapia del espejo fue introducida por primera vez en 1992 por Ramachandran y Rogers como terapia analgésica para reducir el dolor del miembro fantasma. Se trata de una técnica en la que el paciente debe movilizar su miembro superior no afecto, al mismo tiempo que se fija en el reflejo del movimiento de este en un espejo colocado en vertical en el lado del miembro amputado, de manera que este último quede tapado. Al mirar al espejo el paciente percibe el movimiento como una acción realizada por el brazo amputado. La ilusión visual del movimiento de las extremidades afectadas genera una retroalimentación positiva a la corteza motora, que a su vez puede interrumpir el ciclo de dolor. **Rösen &Lundborg.** Training with a mirror in rehabilitation of the hand. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 2005;39,(2)104-108(5).

La rehabilitación de los pacientes puede contribuir a una recuperación más rápida y más eficiente. El desarrollo de estrategias terapéuticas que sean capaces también de modular la organización del SNC alterada por las lesiones de los nervios periféricos, será de gran importancia, amplificando cambios adaptativos que mejoren la recuperación funcional. La elevada plasticidad de las conexiones centrales puede ser capaz de compensar la función perdida por la falta de una reinervación adecuada del órgano diana destino (*Deumens et al., 2010*).

## 11.- EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO: LA INVESTIGACIÓN

La finalidad de un injerto nervioso es sustituir un defecto de manera que puedan pasar el máximo número de fibras nerviosas regeneradas hasta sus órganos diana. *Millesi et al. 1972*, obtuvieron grandes resultados empleando autoinjertos de nervio safeno, técnica que se convirtió en el *gold standard*. La describen bajo estrictas medidas de asepsia e isquemia, con abordaje de la lesión nerviosa desde el tejido proximal y distal sano; con apertura longitudinal del epineuro, resección de los últimos milímetros de los cabos nerviosos y aislamiento de los fascículos o grupos de fascículos. La extracción del nervio donante se realiza normalmente del nervio sural, con su división en secciones con longitud mayor a la del defecto, para suturar a los fascículos, sin tensión entre los cabos. Luego, se procede a la sutura del perineuro de un fascículo al epineuro del injerto, enfrentando bien los extremos para reducir al mínimo el material de sutura necesario para enlazarlo. Con esta técnica, logran mejores resultados que con la sutura directa a tensión; además, defienden el uso de injertos autólogos frente a los homólogos, por la supervivencia de las células de Schwann y la preservación del armazón estructural.

Pero la limitada disponibilidad de tejido nervioso para autoinjerto, así como la incompleta recuperación funcional obtenida en la mayoría de las ocasiones y los problemas de la zona donante han hecho buscar otras alternativas. Desde que *Bielschowsky & Unger*, en 1917, propusieron el uso de nervios cutáneos como injertos, se han desarrollado técnicas específicas para unir varios nervios cutáneos y formar un cable del mismo tamaño del tronco nervioso que se quería reparar. *Bjorkesten & Holmes*, por otra parte, a partir de sus investigaciones concluyen que un tronco nervioso constituye un injerto mejor. Esto puede ser así por el hecho de que el injerto de cable se

usa de la misma forma que el tronco. Los injertos individuales se suturan y los extremos están unidos a los cabos del nervio mediante sutura epineural. Cuando los troncos nerviosos son usados como injertos, la necrosis central puede ocurrir antes de que se establezca una circulación efectiva. Los nervios centrales del injerto en cable pueden sufrir un daño similar porque no tengan, o sólo parcialmente, contacto con el tejido adyacente.

El músculo estriado contiene tubos de lámina basal del sarcolema, que persisten incluso cuando los miocitos que se encuentran dentro de ellos han sido destruidos química o térmicamente. Inicialmente, el método de desnaturalización consistía en congelar un trozo de músculo en nitrógeno líquido y luego generar el choque del tejido osmóticamente sumergiéndolo en agua destilada. Las modificaciones de este protocolo básico han incluido episodios repetidos de congelación-descongelación a  $-25^{\circ}\text{C}$ , seguido por inmersión en agua destilada (*Enver & Hall, 1994*); calentamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  en agua destilada (*Hall & Enver, 1994*); o calentamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  en una fuente de microondas (*Whitworth et al., 1995*).

El tratamiento térmico previo era una modificación experimental introducida con el objetivo específico de reducir la contracción y los problemas de manipulación del tejido que induce la congelación: el calentamiento del músculo en un baño de agua o en un microondas a  $60^{\circ}\text{C}$  produce injertos musculares que exhiben una contracción mínima, son más fáciles de suturar y facilitan la regeneración axonal. Todos estos tratamientos producen los mismos cambios generales, necrosis aguda de los miocitos, de las células endoteliales, de los nervios intramusculares y de las células intersticiales. Los restos celulares así generados se eliminan rápidamente por los macrófagos reclutados. Evacuado, intensamente laminina-positivo, los tubos de la lámina basal son penetrados por las células de Schwann, fibroblastos, células perineurales y células endoteliales de ambos cabos proximal y distal y por axones del muñón proximal. A las 3 semanas, los tubos contienen la mayoría de los minifascículos de la regeneración de los axones y las células de Schwann; cada unidad axón-célula de Schwann está rodeada por una lámina basal recién formada. Los pequeños fascículos individuales están rodeados por 1 o 2 capas de perineuro y células similares, que también están encerradas en láminas basales. Un mes después del injerto, los axones han atravesado un injerto de 1 cm y entran en el muñón distal.

Un injerto muscular acelular alineado coaxialmente al nervio que queremos regenerar, se comporta como un bloque de canales vacíos que aparentemente ofrecen poca o ninguna resistencia al crecimiento de las células. Más importante aún, las paredes de los tubos contienen moléculas tales como laminina y fibronectina, que poseen dominios conocidos para apoyar el desarrollo de neuritas y células de la cresta neural in vitro (*Humphries et al., 1988; Perris et al., 1989; De Curtis I, 1991; Carbonetto & Lindenbaum, 1995*).

El análisis microscópico y ultraestructural de las primeras etapas de la innervación de injertos musculares acelulares revela que los brotes axonales y las células no neuronales que les acompañan, parecen palpar la superficie interior de la lámina basal. Es de suponer que los tubos ofrecen un sustrato que facilita el avance de los conos de crecimiento axonal y demás células, pero no para la maduración de las unidades axón-célula de Schwann, que son rápidamente secuestradas por la lámina basal derivada de las células de Schwann. Los axones que crecen en injertos musculares acelulares están acompañados por las células que se han generado dentro de los cabos del nervio. Es razonable preguntar si estas células son esenciales para la regeneración axonal, especialmente cuando el injerto suministra una abundancia de superficies ricas en moléculas capaces de promover la elongación axonal. Dado que aproximadamente el 95% de los fascículos de menor tamaño crecen en el interior de los tubos de la lámina basal, en lugar del tejido conectivo que los rodea, el sarcolema de las láminas basales claramente proporciona una ruta preferencial entre los cabos del nervio. Sin embargo, es igualmente evidente que la regeneración axonal a través injertos musculares también requiere un suministro sostenido de células de Schwann, células perineurales y fibroblastos.

*Keynes et al., en 1984* demostraron que la lámina basal de las células musculares era útil como vía para el paso de axones en regeneración, por acción de la laminina de la membrana basal, mediante el examen de la capacidad del músculo de ratón degenerado para apoyar la regeneración de las secciones de los nervios ciático y safeno. Utilizan como injertos, secciones longitudinales de músculo glúteo mayor contralateral al nervio lesionado, fijándolo con etanol y formaldehído. El crecimiento del nervio posterior en el músculo degenerando se evaluó por tinción con plata después de 3, 4 y 10 días. Al cuarto día, ya observaron crecimiento axonal lineal, paralelo a la longitud de las fibras musculares, así como el inicio de la degeneración del sarcoplasma. Las secciones

transversales de las preparaciones a los 10 días mostraron que más del 90% de los axones en crecimiento se encontraban linealmente en el interior de las vainas restantes de la membrana basal de las fibras musculares. Esta relación fue confirmada mediante microscopía electrónica en preparaciones con tinción de rojo de rutenio. Tanto el componente motor como los axones sensoriales fueron capaces de crecer de esta manera, demostrando en las pruebas electrofisiológicas la presencia de axones motores del nervio ciático en el cabo distal; mientras que el nervio safeno contenía sólo axones sensoriales. Se observó un crecimiento idéntico a los 10 días en los músculos degenerados por la incubación en agua destilada. Sin embargo, el crecimiento lineal no se presentaba en los músculos inervados en vivo y fijados con glutaraldehído, en los que la arquitectura de la fibra muscular se conservó.

Posteriormente, *Glasby et al., en 1986* consiguieron un abundante paso de axones útiles a través de los canales del endomisio, utilizando músculo esquelético desnaturalizado para reparar los defectos nerviosos, ya que los canales del endomisio son similares a los del endoneuro. Preparaban el injerto extrayendo un bloque de la totalidad del grosor del músculo glúteo mayor ipsilateral al nervio dañado, fijándolo en el marco de tensión en Sylgard<sup>®</sup> (Dow Chemical Co.), y sumergiéndolo en nitrógeno líquido para adquirir el equilibrio térmico; entonces era descongelado en agua destilada para promover la rotura osmótica. Su tratamiento con nitrógeno líquido y descongelación parecía producir la interrupción de la arquitectura del músculo con la preservación de los tubos de membrana basal. Cuando los miotubos se habían colocado coaxiales a los fascículos nerviosos, se observaba un gran número de axones que se disponían en grupos circulares en la cara interna de las membranas, mientras que eran poco frecuentes los axones que discurrían por fuera.

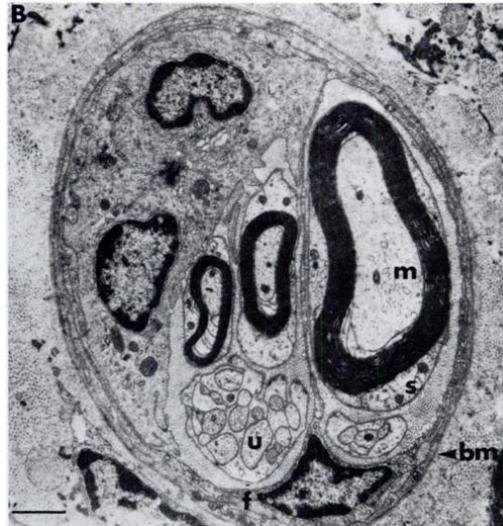


Figura 1. 23 **Músculo esquelético desnaturalizado para reparar los defectos nerviosos.** Imagen de microscopio electrónico de los injertos coaxialmente alineados. Un único tubo de membrana basal (MB) contiene fibroblastos (f), células de Schwann (s), axones mielinizados (m) y los axones no mielinizados (u). Los axones están rodeados por células de Schwann orientadas concéntricamente dentro de la membrana basal del músculo (escala 1.0 p). **Glasby MA, Hitchcock RJI, Huang CLH.** The effect of muscle basement membrane on the regeneration of rat sciatic nerve. *J Bone Joint Surg.* 68B: 829-833, 1986.

En las secciones transversales del nervio distal, había una alta densidad de axones sanos, aparentemente con un reducido número de ellos degenerando. Estos hallazgos se correlacionaban bien con las observaciones electrofisiológicas: positivas a los 30 días para el flexor del primer dedo ipsilateral. Destacan en sus conclusiones la necesidad de orientar apropiadamente los tubos de membrana basal para facilitar y guiar el recorrido de los axones. Las comparaciones de la regeneración axonal a través de injertos musculares cortos acelulares o autoinjertos nerviosos de igual diámetro en la rata demostraron que no había diferencia entre los tipos de injerto en términos de número o maduración de los axones que penetran en los muñones distales.

Los resultados obtenidos utilizando injertos acelulares musculares para reparar nervios seccionados en ratas fueron lo suficientemente alentadores como para ser traducido en más ensayos clínicos (*Norris et al., 1988*).

Otros autores han continuado con estos estudios. *Pereira et al., en 1990* comenzaron sus estudios sobre injerto muscular desnaturalizado como injerto para

lesiones granulomatosas micobacterianas en nervios periféricos de pacientes con lepra. El defecto era rellenado con un autoinjerto de músculo congelado y descongelado, co-alineados axialmente, producido por la escisión de una porción del vasto externo (donde las fibras se encuentran en haces paralelos); la congelación era instantánea con el aerosol de diclorodifluorometano (- 30 °C), y la descongelación en agua destilada estéril. A los 50 días, el injerto mostraba sólo un pequeño número, de diámetro escaso, de finos axones dispuestos en minifascículos, entre los que destacaban axones en regeneración en el segmento distal del nervio. A los 150 días, muestra un gran número de minifascículos, que contienen axones de diferente diámetro, mielinizados en su mayoría. Hay una gran cantidad de colágeno entre los fascículos. El cabo distal, pasados los 150 días, objetiva repoblación con fibras regeneradas, con diámetro grande y pequeño, con característica mielinización, aunque los autores describen cómo la apariencia macroscópica del nervio simulaba un tejido vacío e inflamado. Las células de Schwann estaban en íntima relación con los axones. Lograron una pronta recuperación de las lesiones sensitivas secundarias a la lepra, en relación a otros métodos de reparación nerviosa utilizados por estos mismos autores previamente. Las úlceras tróficas que desarrollaban los animales de experimentación, se curaban espontáneamente, lo que constituía un indicador muy útil de recuperación sensitiva.

Los injertos musculares acelulares demostraron ser eficaces en la reparación de pequeños defectos en nervios digitales, pero no en la reparación de las lesiones mayores de 5 cm de los nervios periféricos mixtos (*Calder & Norris, 1993*), un hallazgo, que fue coherente con el informe emitido por *Hems & Glasby, en 1991*, sobre la ineficiencia de los injertos musculares en defectos de 10 cm en el conejo, hasta la fecha de dicha publicación.

*Brunelli & Battiston (1993)* desarrollaron una investigación experimental en ratas con un injerto de vena (que proporciona una guía para la regeneración de nervios) llena de músculo esquelético fresco (para evitar el colapso de la vena y apoyar la regeneración del axón), con resultados similares a los injertos de nervio tradicionales. La regeneración nerviosa a través de 1 y 2 cm de injertos de vena/músculo se comparó con injertos nerviosos similares largos con tradicionales injertos musculares frescos, y con los injertos de venas vacías. La regeneración se evaluó clínica e histológicamente (evaluación cualitativa y cuantitativa) en los troncos nerviosos a nivel del injerto y distal a éste. Los injertos de vena más músculo fueron superiores a los injertos de vena y a los

de músculo fresco tanto funcional como histológicamente. Los resultados funcionales fueron similares a los encontrados en los injertos de nervio tradicionales, pero el número axones fue superior en las venas llenas de músculo. Esto sugiere que la vena llena de músculo podría servir como un conducto de injerto para la reparación de lesiones de nervios periféricos y podrían dar mejores resultados que el injerto tradicional de nervio.

*DeFranzo et al., en 1994* examinaron el uso del procedimiento de congelación-descongelación del músculo como material de injerto de nervio en ratas Sprague-Dawley, analizando histológicamente la densidad de axones y su buena mielinización. Los animales fueron divididos en tres grupos: en el Grupo 1 (n = 4), el nervio ciático se disecó, cerrando la incisión inmediatamente; en el Grupo 2 (n = 4), se seccionó un segmento de 5 mm del nervio y se reemplazó inmediatamente; en el Grupo 3 (n = 50), se retiró un segmento de 5 mm de nervio, puenteando el defecto con un injerto muscular (2 x 2 x 5 mm) de glúteo, congelado en nitrógeno líquido, y descongelado en agua estéril. El injerto muscular autólogo, congelado-descongelado, mostraba una separación precisa del sarcoplasma de la membrana basal. En la rata, los macrófagos se movían rápidamente en el sarcoplasma desnaturalizado y al séptimo día, el injerto ya estaba prácticamente limpio. Las membranas basales no son destruidas por el proceso de congelación y descongelación, y el pequeño grado de perturbación de las mismas, dejaba una disposición en paralelo de tubos abiertos, lo suficientemente grandes para el paso de uno o más axones de regeneración. También proporcionaban un paso abierto para la migración de células de Schwann y otros factores químicos neurotrópicos.

El examen histológico del corte central del injerto de músculo al año mostraba recuentos de axones mielinizados de 6125 +/- 390, y un promedio de diámetro del axón mielinizado de 2.7 micras, 65% de lo normal. La arquitectura mostraba una marcada compartimentación y muchos fascículos pequeños. Parecería que la estructura del injerto tratado mediante la congelación-descongelación, dirigiese la regeneración de los axones en los compartimentos previos de la fibra muscular. Aunque los fascículos eran más pequeños, la disposición fascicular estaba bien cuidada. El espesor de la vaina de mielina tenía de promedio un 81% del espesor de la mielina en el nervio proximal y distal al injerto muscular.

El nervio ciático 3 mm distal al injerto, al año, mostró un recuento de axones mielinizados de 6095+/-415, y con tamaño medio de axón de 2,7 micras. Había menos compartimentación y una disposición fascicular más normal. Las células de Schwann parece que migraban desde el nervio proximal al distal del injerto muscular, siendo visibles en el microscopio electrónico. Sin embargo, en los defectos nerviosos más largos, la migración de las células de Schwann y la mielinización resultante podrían llegar hasta un límite.



Figura 1. 24 **Procedimiento de congelación-descongelación del músculo como injerto.**

Microscopía electrónica de transmisión del tronco del nervio distal al año (x1520). Las Células de Schwann parece que migraban desde el nervio proximal al distal del injerto muscular. **DeFranzo AJ, Morykwas MJ, LaRosse JR, Jennings DA, Challa V, Argenta LC.** Autologous denatured muscle as a nerve graft. *J Reconstr Microsurg.* 1994;10(3):145-9; discussion 149-51.

*Whitworth et al., en 1995* presentaron una técnica simple para la incorporación de un depósito de células de Schwann y otros componentes esenciales, en un conducto de nervio; con un marcado efecto sobre la regeneración axonal en defectos de 5 cm del nervio ciático del conejo, reparándolos con un injerto de 2-3 mm de longitud de nervio autólogo fresco intercalado entre 1 cm de injertos musculares. Un año más tarde, este mismo equipo de trabajo, *Whitworth et al.,* publicaron otro artículo cuyo objetivo era ver si la regeneración axonal se podría mejorar mediante la desnaturalización de los injertos musculares utilizando otros métodos de desnaturalización diferentes a la

congelación-descongelación. Una desventaja importante de esta técnica es que causaba contracción considerable del músculo y podría resultar en la fractura o rotura del bloque; su uso requiere de un bloque de músculo dos veces y media mayor que el defecto de nervio, y por lo tanto era más difícil asegurar la congelación completa y la desnaturalización del bloque de músculo al aumentar sus dimensiones. Describen otros métodos que debían ser simples, reproducibles, fácilmente aplicables en un quirófano y evitando los problemas de la contracción muscular o la rotura. Los bloques musculares fueron desnaturalizados por calor en microondas para producir un choque térmico de 60-70 °C o se calentaron en agua destilada a 60 °C para producir choque térmico y osmótico combinado sobre la proteína muscular. El músculo así tratado, sufrió sólo una reducción del 11% de la longitud, sin observarse reducción en agua destilada. La tasa de regeneración axonal, como se mide con antisueros para CGRP y 43-GAP, fue más rápida en los injertos musculares de microondas en comparación con los congelados-descongelados. Los injertos de nervios ofrecieron la tasa más rápida de regeneración de todos los grupos, probablemente debido a que contenían un depósito de células de Schwann dentro de los tubos de la lámina basal y la coincidencia del diámetro del injerto con el nervio cortado. Los injertos musculares de microondas lograron la penetración más rápida y de mayor volumen de células de Schwann desde el muñón proximal, dentro de los grupos de injerto muscular. En el día 60, los injertos musculares de microondas tenían una mayor cantidad de inmunotinción para los antisueros S-100, trazador de la repoblación axonal de este tipo de injerto. Estos resultados indicaban que el calentamiento por microondas era una técnica adecuada para la desnaturalización del músculo en la preparación para su uso en la reparación de la lesión no crítica de nervio periférico.

En la Universidad de Valladolid, *Martín Ferrero et al., en 1995* utilizaron músculo esquelético desnaturalizado por criocongelación, obteniendo buenos resultados en cuanto a regeneración funcional e histológica. Su experimentación se materializó en tres grupos de trabajo: A) nervio oligofascicular (diez ratas en las que se extirparon 15 mm del nervio tibial y se reparó con un injerto de músculo estriado desnaturalizado); B) nervio polifascicular (diez ratas en las que se extirparon 15 mm del nervio ciático e interposición de injerto de músculo estriado desnaturalizado); C) sin injerto (diez ratas en las que se extirpó un defecto de 15 mm en el nervio tibial sin reparar mediante injerto). Se sacrificaron cinco ratas de cada grupo a los 3 meses, y las otras cinco al año.

El injerto muscular se extrajo del glúteo mayor (20 x 3 x 3 mm), sumergiéndolo en nitrógeno líquido hasta establecer el equilibrio térmico, para luego descongelarlo en agua destilada y así provocar la ruptura celular por ósmosis y conservar el endomisio. Al analizar los resultados funcionales, se observa que el grupo A de nervio oligofascicular, lograba una marcha normal, sin trastornos tróficos de la extremidad y con un discreto alargamiento de la huella plantar; en el grupo B de nervio polifascicular, la recuperación funcional completa no se lograba en todos los animales, apareciendo trastornos tróficos severos así como alteraciones de la marcha y de la huella plantar; en el grupo C, sin injerto muscular, se observó un patrón típico de parálisis del tibial, sin detectar alteraciones tróficas.

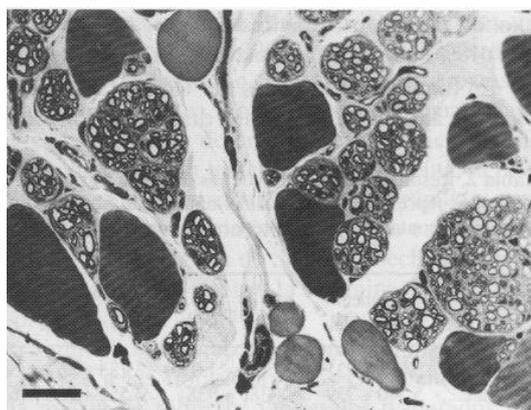


Figura 1. 25 **Paso de axones a través del injerto de músculo desnaturalizado.**

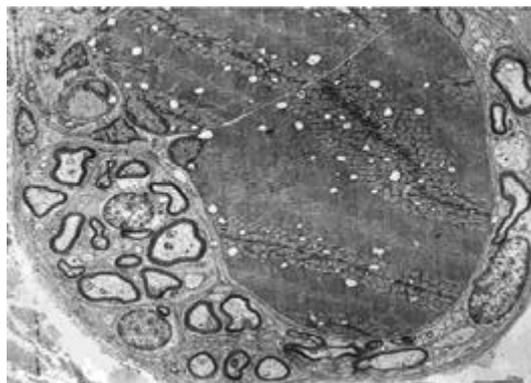
Sección transversal de un injerto de 3 meses de evolución donde se observan algunos axones mielínicos alojados dentro del endomisio y algunas fibras musculares que se mantienen íntegras tras 1 minuto de inmersión dentro del nitrógeno (Azul de toluidina; barra de escala: 25µm). **Martín Ferrero MA**, Agudo Bernal J, Vaquero Puerta C, García Cantera M, Sánchez Martín MM. Autoinjerto de músculo estriado desnaturalizado en las pérdidas de sustancia del nervio periférico. Estudio experimental. *Revista de Ortopedia y Traumatología*, 40: 77-83, 1996.

En cuanto a los resultados histológicos, se cuantificó el paso de una gran cantidad de axones mielínicos a través del injerto, hasta el segmento distal, siendo más abundante y regular en los animales del grupo A que se sacrificaron al año. El tejido del injerto nervioso, aunque se asemejaba bastante al nervio normal, se encontraba más compartimentalizado, con muchos fascículos pequeños; el diámetro medio del axón y el

grosor de la mielina fueron ligeramente inferiores a los valores del nervio contralateral sano. En los diez casos del grupo C, se descubrió un neuroglioma proximal y un glioma distal, con degeneración walleriana y sin ningún axón presente en el cabo distal.

*Battiston et al., en 2000* describen la reparación nerviosa con injertos de vena rellena de músculo en un grupo de casos clínicos, no experimentales. Presentan 21 lesiones en 20 pacientes (10 nervios sensitivos, 21 mixtos), con pérdidas de sustancia en el nervio periférico entre 0.5 y 6 mm, con seguimiento de cinco años. Concluyen que esta técnica de reparación nerviosa puede suponer una alternativa eficaz a los injertos de nervio autólogo tradicionales. El uso de vena rellena por músculo esquelético fresco posee dos limitaciones a su aplicación clínica: la vena tubulizada tiene tendencia al colapso en defectos de longitudes superiores a 1-2 cm, donde parecen perderse los axones dentro del injerto muscular. Pero, superando este problema, proponen que esta técnica superaría la limitación de otras tubulaciones para longitudes superiores a 6 cm. Otras ventajas serían: todo el material del injerto (muscular y venoso) es disecado fácilmente del área lesionada, sin necesidad de completar nuevas incisiones en otras regiones corporales; se evita el daño de un nervio sano donante; y ofrece a los axones la posibilidad de la orientación correcta dentro del tubo en función de las señales quimiotácticas que provienen del cabo nervioso distal.

Unos meses más tarde, los mismos autores publicaron otro artículo en el que se detallan los resultados de un estudio experimental en ratas que habían llevado a cabo con el objetivo de investigar, mediante examen al microscopio óptico y electrónico, las características morfológicas de la reparación de los nervios por medio de la técnica de injerto combinado músculo-vena a través de defectos de hasta 3 cm, tanto en las fases de regeneración temprana como tardía, en un total de 12 ratas Wistar macho adultas. A los 6 meses de la intervención, el injerto mostró una alternancia normal de las fibras nerviosas mielinizadas con algunas fibras musculares.



**Figura 1. 26 La reparación nerviosa con injertos de vena rellena de músculo.**

Nervio ciático de rata reparado mediante un injerto combinado de músculo y vena. Punto medio del injerto, 6 meses postoperatorios. Imagen de microscopía electrónica mostrando las fibras musculares alrededor de un manguito de fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas (x3,400; escala 5  $\mu$ m).

**Battiston B, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Guglielmone R.** Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*. 2000;20(1):37-41.

Las fibras nerviosas se organizan en minifascículos de dimensiones diferentes. Aunque unas pocas fibras nerviosas aisladas fueron detectadas dentro o inmediatamente fuera de la pared de la vena, no había ninguna señal de pérdida axonal importante. Los muñones distales del nervio eran ricos en ambas fibras nerviosas mielínicas y amielínicas en todos los animales sacrificados 6 meses después de la cirugía. El número total de fibras nerviosas mielinizadas fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en los extremos de nervio distal del injerto (media =  $10.367 \pm 1.271$ ) que en el grupo control (media =  $7.992 \pm 392$ ). La densidad de las fibras de nervio por milímetro cuadrado también fue significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) en los nervios injertados (media =  $18.305 \pm 2.230$ ) que en los nervios ciáticos de control (media =  $10.013 \pm 1.151$ ). Por el contrario, el diámetro medio de las fibras nerviosas mielinizadas en nervios regenerados (media  $4,97 \pm 0,37 \mu$ m) fue significativamente menor ( $P < 0,01$ ) que en los nervios de control (media =  $10,33 \pm 0,50 \mu$ m). En las primeras fases de la regeneración (a los 14 días después de la operación), estaban presentes en el injerto, numerosos fascículos de regeneración de las fibras nerviosas en diferentes etapas de la mielinización. Por otra parte, un hecho interesante fue la presencia de axones aislados (aparentemente sin células de Schwann) en contacto directo con la lámina basal del músculo. En algunos otros casos, fueron aisladas células de Schwann rodeando uno o más axones en la

lámina basal de las fibras musculares. Finalmente, las células aisladas que comparten las características morfológicas de las células de Schwann se detectaron debajo de la lámina basal del músculo; este hallazgo podría ser considerado tentativamente como la migración de las células de Schwann sin relación con la regeneración de los axones.

*Oliveira et al., en 2004* emplearon el modelo del nervio ciático de la rata para demostrar que no existían diferencias significativas en la morfología y la función de la regeneración con injerto de músculo esquelético desnaturalizado y el nervio convencional, para reparar una lesión segmentaria de 5 mm. El experimento se llevó a cabo en 34 ratas Wistar machos, divididas en cuatro grupos de acuerdo con el procedimiento quirúrgico. En el grupo 1 (simulación), se expone el nervio ciático, devolviéndolo a su lecho original. En el grupo 2 (injerto de nervio convencional), se resecó un segmento de 5 mm de longitud del nervio ciático y de inmediato se suturó en su lugar. En el grupo 3 (injerto muscular desnaturalizado), fue resecado un segmento de 5 mm de longitud del nervio; se disecó un vientre muscular del serrato anterior (requería una incisión adicional, pero sin interferir para la deambulación, a diferencia del glúteo mayor), que se congeló con un aerosol (preferido en lugar de nitrógeno líquido, porque este último produce un choque térmico severo, interrumpiendo las fibras musculares, perdiendo la morfología de tubo continuo del sarcolema); el fragmento congelado se sumergió en agua destilada estéril posteriormente, previo a suturarlo en el defecto del nervio, en la localización del nervio original. En el grupo 4 (resección segmentaria del nervio), se resecó un segmento del nervio ciático, dejando el defecto sin reparar. Los animales fueron sacrificados el día 120 postoperatorio.

El análisis de la huella durante la marcha era aparentemente normal, con los dedos del pie completamente extendidos, en torno al cuarto día postoperatorio en el grupo 1. Los animales de los grupos 2-4 mostraban los dedos de la pata en aducción y en equino, mostrando una completa incapacidad para permanecer sobre la pata operada durante varios días. Los casos de los grupos 2 y 3 recuperaron gradualmente una marcha casi normal, con una carga parcial en la pata trasera, aunque su aspecto no cambió a lo largo del período de observación. Los animales del grupo 4 nunca recuperaron la capacidad de soportar su peso apoyando la pata operada. Ningún animal de ninguno de los grupos desarrolló contractura de los dedos en flexión. El análisis estadístico de SFI mostró que el día 15 la media postoperatoria fue significativamente diferente entre el grupo 1 y los Grupos 2-4 ( $P \leq 0,001$ ), pero no entre los grupos 2, 3 y 4. En el día 60, la

diferencia siguió siendo significativa entre los grupos 1 y los grupos 2-4, y se hizo significativa entre 2 y 3, y el grupo 4. En el día 105, las diferencias entre el grupo 1 y los grupos 2-4 aún eran significativas como también lo eran entre los grupos 2 y 3 con el 4, pero no entre el 2 y el 3: la recuperación de la marcha era prácticamente idéntica en los grupos 2 y 3 lo que demostraba la utilidad funcional del injerto muscular.

El estudio histológico reflejó una morfología interna completamente normal en el día postoperatorio 105 en el grupo 1, con las fibras mielinizadas típicas de varios diámetros, distribuidas entre dos a cuatro fascículos grandes. En los grupos 2 y 3, el aspecto histológico fue el de un proceso de regeneración continuo, con predominio de fibras mielinizadas de pequeño diámetro con una vaina de mielina proporcionalmente delgada, organizadas en fascículos de pequeño diámetro, con escaso número de fibras con signos de atrofia axonal.

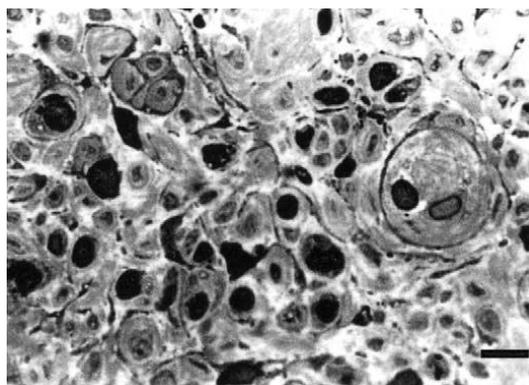


Figura 1. 27 **Comparación de la equivalencia de los injertos musculares y nerviosos.**

Resultado histológico con imagen típica de degeneración Walleriana: ausencia completa de fibras nerviosas y fibrosis reemplazando la estructura nerviosa normal, en el grupo 4 (objetivo 100x; 1% azul de toluidina; escala 10  $\mu$ m). Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, DelBel EA. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect. An experimental study using the sciatic nerve of rats as model. *J Neurosci Methods*. 2004;15;133(1-2):19-26.

En el grupo 4, el aspecto era de degeneración walleriana típica, con pérdida axonal avanzada, ausencia completa de vaina de mielina y ocasionales vacuolas grandes en el endoneuro y macrófagos fagocitando mielina degenerada. Se completó así la demostración que *Oliveira et al.* planteaban que tanto los injertos de músculo como los de nervio producen resultados morfológicos y funcionales equivalentes para un defecto similar.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos planteamos comparar diferentes métodos de desnaturalización de músculo estriado como preparación para injerto en defectos nerviosos. *Hall* examinó los elementos celulares y acelulares que facilitan la regeneración axonal y la utilización de injertos musculares acelulares en la reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico (*Hall S, 1997*).

Llegaron a la conclusión de que había una distancia límite a partir de la cual los axones dejan de crecer en ausencia de un muñón distal de nervio vital. No había ninguna razón a priori para creer que los injertos acelulares muy largos debían superar la regeneración axonal, de hecho la evidencia experimental disponible sugería que era poco probable que estos injertos tuvieran éxito simplemente debido a su longitud. Una vez que los axones habían pasado la línea de sutura proximal, su crecimiento posterior parece ser críticamente dependiente de la longitud del defecto, de un suministro adecuado de células acompañantes, y de la vascularización del mismo. La mayoría de los estudios habían encontrado que esta distancia era del orden de 5 cm, incluso en los animales más grandes y, probablemente, 2 cm en roedores. Una manera de aumentar la longitud del injerto es adoptar una táctica, y usar injertos mixtos tipo “sandwich”, en los que un pequeño segmento de nervio vital se coloca dentro de un conducto acelular largo con la esperanza de que el nervio pueda proporcionar un depósito de células no neuronales o una fuente de factores neurotróficos para el crecimiento de los axones.

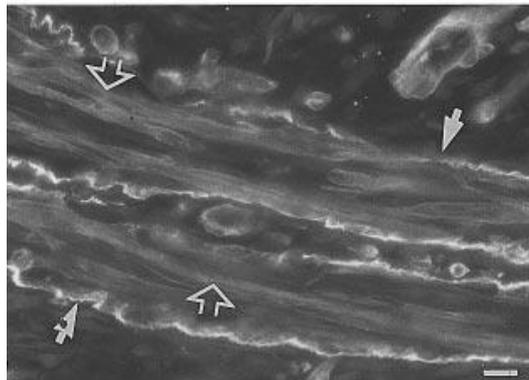


Figura 1. 28 Injertos tipo “sándwich”.

Sección longitudinal del autoinjerto de músculo congelado-descongelado, 3 semanas después de su implantación. La sección fue doblemente marcada con anticuerpos antilaminina. Las células laminina+ (silueta de flecha) descansan dentro de los tubos del sarcolema laminina+ de la lámina basal (flechas sólidas). En secciones adyacentes, estas células fueron marcadas con S-100, trazador de las células de Schwann. El perfil laminina+ adicional fuera de los tubos del sarcolema, es endotelio de la lámina basal.

Sección incluida en polyester, escala 10  $\mu\text{m}$ . **Hall S.** Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 1997;190 ( Pt 1):57-71.

Siguiendo este protocolo, los nervios se habían combinado con el músculo acelular, logrando una regeneración axonal a través de injertos de 1.5 cm tipo sándwich de músculo y nervio, mejorados en comparación con los injertos musculares congelados-descongelados. Era un modelo interesante, no sólo porque se presenta una oportunidad de comparar la excrecencia celular del axón asociado desde el muñón proximal del nervio con las excrecencias del muñón distal, sino también para examinar la interacción de las células derivadas del cabo distal con los axones de la lámina basal del sarcolema. Se realizó un estudio detallado ultraestructural e inmunohistoquímico de regeneración axonal a través de injertos tipo sándwich nervio-músculo, de 1 ó 2 cm, en la rata. A las dos semanas, los tubos de la lámina basal dentro del injerto contenían células derivadas de ambos, del muñón distal y del injerto de nervio. En las semanas siguientes, los brotes de axones pioneros encontraban el sustrato ideal sobre el que podrían seguir creciendo, tubos de lámina basal ya sembrados con células derivadas del muñón distal.

Sin embargo, aunque el concepto se basa en sólidos principios teóricos, estos autores explicaron cómo su aplicación no resultaba tan atractiva desde el punto de vista clínico. Los injertos tipo "sándwich" llevaban más tiempo para su preparación que los injertos de nervio, ya sea congelados-descongelados o injertos musculares, (y era por lo tanto probable que añadiesen complicaciones a lo que ya podía ser una cirugía compleja) y, quizás más importante, también contenían varias líneas de sutura, cada una de las cuales era un obstáculo adicional para el crecimiento axonal.

*Lundborg, Dahlin et al., en 2001* demostraron por tinción inmunohistoquímica para los neurofilamentos y la proteína S-100, que los axones y las células de Schwann crecían más rápidamente en los injertos musculares descelularizados químicamente que en el proceso de desnaturalización por congelación-descongelación.

Se han investigado también otras sustancias que podrían favorecer la regeneración del tejido nervioso, tales como factores de crecimiento neurogénico (NGF), epidérmico (EGF) y derivado de plaquetas (PDGF), con diferentes resultados.

*Welch et al.* en 1997 demuestran que la administración combinada de PDGF e IGF-I no aumenta la regeneración del nervio periférico 6 semanas después de la cirugía.

*Yu et al.*, en 2009 observaron histológicamente el efecto del NGF, revelando un diámetro axonal, número axones y grosor de la mielina mejor con NGF en nervios reparados mediante un injerto acelular enriquecido, en comparación con el injerto acelular solo y el injerto acelular con cola de fibrina. El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue el primero en ser reconocido por su efecto estimulante sobre el crecimiento de las fibras nerviosas. Sin embargo, el NGF está limitado por sus condiciones fisiológicas. Para proteger la bioactividad del NGF, se han desarrollado microesferas poliméricas para su encapsulación y localización, que luego se fijaron alrededor de un injerto de nervio acelular con cola de fibrina para portar el NGF bioactivo, factor que se extrajo de los ganglios de la raíz dorsal del embrión de pollo. Los nervios ciáticos fueron extirpados de las ratas Sprague-Dawley sacrificadas, tratados con detergentes químicos para convertirlos en aloinjertos acelulares.

Un total de 52 ratas Wistar machos adultos fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (n = 13 cada uno) para el tratamiento de: autoinjerto, injertos acelulares tratados con NGF, sólo injertos acelulares, e injertos acelulares con cola de fibrina. Las ventajas del uso de injertos de nervios fueron que: la descelularización química de los aloinjertos nerviosos reducía en gran medida la respuesta inmunológica celular y humoral, resultando relativamente no antigénico; la estructura física del nervio acelular simulaba la arquitectura del nervio nativo con una serie de canales alineados longitudinalmente, finos diámetros y estructuras de interconexión; y la tercera ventaja, el nervio acelular contenía la matriz extracelular del nervio periférico, necesaria para la regeneración del nervio funcional.

El nervio ciático de los animales de trabajo se seccionó 5 mm distal a la escotadura ciática. Para el autoinjerto, se resecaron 10 mm de nervio ciático, reimplantados a continuación. Para el grupo tratado con NGF, 1 ml de cola de fibrina con 10 mg NGF micro-encapsulado se inyectó alrededor del injerto de nervio acelular. Alrededor de 3 o 4 semanas después de la cirugía, las patas operadas de los grupos injertados mostraban atrofia muscular. Cerca de las 12 semanas después de la cirugía, el gastrocnemio y el sóleo estaban restaurados parcialmente, así como la función motora de dichas extremidades. En la semana 16 después de la cirugía, el recuento medio de

axones y el grosor de la mielina fueron significativamente mayores en la reparación de los nervios con injerto acelular enriquecido con NGF, que con el injerto acelular solo y con el tratamiento con cola de fibrina. El diámetro medio de la fibra fue significativamente mayor en la reparación de nervios con NGF, así como la longitud de regeneración axonal.

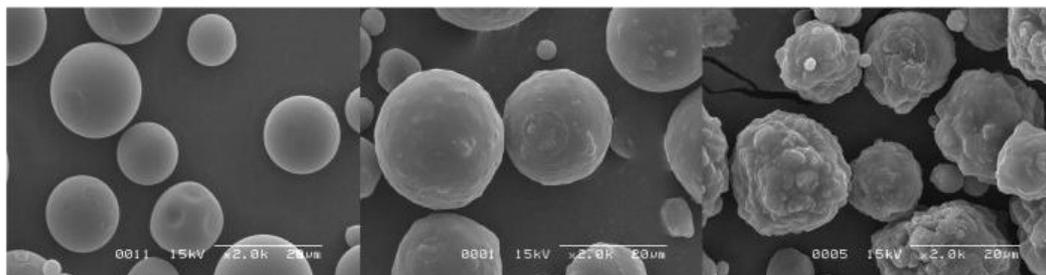


Figura 1. 29 **Microesferas poliméricas para su el NGF.**

La liberación controlada de factores de crecimiento mediante microesferas puede mejorar y acelerar la regeneración axonal. Microscopía electrónica de barrido de gelatina pura (A), gelatina-10% de fosfato de calcio (B) y gelatina-40% de micropartículas de fosfato de calcio (C). Poseen propiedades bioactivas calcificantes similares al polvo de fosfato de calcio y disminución de las tasas de liberación en comparación con micropartículas de gelatina pura. **Vo TN, Kasper FK, Mikos AG.** . Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1292-309.

Así, estos autores concluyen que los injertos de nervios cargados con factores neurotróficos mejoran la regeneración del nervio periférico a corto plazo, potenciando la bioactividad del NGF al protegerlo en las microesferas, logrando su liberación lenta. La cola de fibrina también fue utilizada como un vehículo para factores neurotróficos para mejorar la regeneración de nervios. Sin embargo, los resultados fueron inferiores en injertos nerviosos acelulares tratados con NGF que en injertos de nervio autólogo, los por su contenido en células de Schwann y otros componentes celulares necesarios para la regeneración nerviosa.

## 12.- IGF-1

El factor de crecimiento insulínico tipo 1, también conocido como somatomedina C, o IGF-1 (del inglés: insulin-like growth factor-1) es una proteína que en humanos es codificada por el gen IGF1. Se le ha definido como "factor de sulfatación" y sus efectos fueron denominados "actividad insulínica no suprimible" en los años 1970.

El IGF-1 es una hormona similar en estructura molecular a la insulina. Juega un papel importante en el crecimiento infantil (los mayores niveles se producen en la pubertad, los menores en la infancia y la vejez), y en el adulto continúa teniendo efectos anabolizantes.

El IGF-1 consiste en 70 aminoácidos en una sola cadena con tres puentes disulfuro intramoleculares; su peso molecular es de 7649 daltons.

### **Síntesis y circulación**

El IGF-1 es una proteína liberada por muchos tejidos y afecta prácticamente a casi todas las células del cuerpo. Los principales órganos sintetizadores del IGF-1 es el hígado, aunque también se produce a nivel local en la placenta, el corazón, el pulmón, el riñón, el páncreas, el bazo, el intestino delgado, los testículos, los ovarios, el intestino grueso, el cerebro, la médula ósea y la hipófisis. La producción es estimulada por la hormona del crecimiento (GH) y puede ser retrasada por la desnutrición, la falta de sensibilidad a la hormona del crecimiento, la falta de receptores de hormona del crecimiento, o fallos en la ruta de señalización post-receptores (segundo mensajero) de GH. Aproximadamente el 98% del IGF-1 siempre está unido a una de 6 proteínas fijadoras (IGF-BP). El IGFBP3, la proteína más abundante, representa el 80% de todas

las uniones del IGF. El IGF-1 se une al IGFBP-3 en una proporción molar 1:1. Esta proteína forma un complejo ternario de 140.000 daltons con el IGF-1 y con una subunidad ácida-lábil.

En experimentos con ratas, la cantidad de IGF-1 mRNA en el hígado fue positivamente asociada con la caseína dietética y negativamente asociada con una dieta libre de proteínas.

Recientemente, fue desarrollado un sistema eficiente de expresión de plantas para producir IGF-I humana biológicamente activa recombinante (rhIGF-I) en granos de arroz transgénicos.

Los seres humanos producen aproximadamente 30 mg de IGF-1 al día hasta los 30 años de edad y desde este momento la producción decrece con la edad.

### **Mecanismo de acción**

Su acción principal es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1, abreviado como IGF1R, presente en muchos tipos de tejidos. En la unión al IGF1R, un receptor tirosín-quinasa, inicia la señalización intracelular; el IGF-1 es uno de los activadores naturales más potentes de la transducción de señal PKB, un estimulador del crecimiento y proliferación celular, y un potente inhibidor de la muerte celular programada.

El IGF-1 es un mediador principal de los efectos de la hormona del crecimiento (GH). La hormona del crecimiento es producida en la adenohipófisis y liberada al torrente sanguíneo, estimula al hígado para producir IGF-1. El IGF-1 luego acelera el crecimiento del cuerpo de forma sistémica, y tiene efectos promotores del crecimiento en casi todas las células del cuerpo, especialmente el músculo esquelético, cartílago, hueso, hígado, nervios, piel, células hematopoyéticas, y pulmón. Además de los efectos similares a la insulina, el IGF-1 también puede regular el desarrollo y crecimiento celular, especialmente en las células nerviosas, como también la síntesis de DNA celular.

Por lo tanto, la deficiencia ya sea de hormona del crecimiento o IGF-1, resultaría en una estatura disminuida. Los niños deficientes de GH reciben GH recombinante para

incrementar su tamaño. Los humanos con deficiencia de IGF-1, clasificados como síndrome de Laron, o enanismo de Laron, son tratados con IGF-1 recombinante. En el ganado bovino, el IGF-1 circulante está relacionado con el desempeño reproductivo.

## **Receptores**

El IGF-1 se une a al menos a dos receptores de la membrana celular: el receptor de IGF-1 (IGF1R), y el receptor de insulina. El IGF-1 tiene una alta afinidad por el receptor de IGF-1, y una baja afinidad por el receptor de insulina. Estos receptores son tirosín-quinasa (señalizan causando la adición de una molécula de fosfato en ciertas tirosinas). El IGF-1 activa el receptor insulínico aproximadamente a una potencia 0.1x veces que la insulina.

El IGF-1 es producido durante toda la vida. Los mayores niveles se producen durante el crecimiento puberal, los menores en la infancia y la vejez.

Otras IGF-BPs (proteínas fijadoras/transportadoras) son inhibitorias. Por ejemplo, ambas IGFBP-2 y IGFBP-5 se unen al IGF-1 con una afinidad mayor que la que une al IGF-1 con su receptor. Por lo tanto, si se incrementan los niveles séricos de estas dos IGF-BPs resultaría en una disminución en la actividad del IGF-1.

## **Contribución al envejecimiento**

Sabemos que la señalización a través de la ruta de receptores de insulina/IGF-1 es un contribuyente significativo en el proceso de envejecimiento biológico en muchos organismos. Esta línea de investigación adquirió importancia con el trabajo de Cynthia Kenyon, quien mostró que las mutaciones en el gen *daf-2* podría duplicar la vida de una lombriz *Caenorhabditis elegans* (Kenyon *et al.*, 2003). El gen *daf-2* codifica los receptores de insulina/IGF-1 de la lombriz.

La señalización insulina/IGF-1 es conservada desde las lombrices a los humanos. Según estudios posteriores al trabajo de Kenyon, las mutaciones que reducen la señalización insulina/IGF-1 han demostrado desacelerar el proceso degenerativo del

envejecimiento y extender la vida de una amplia gama de organismos, incluyendo *Drosophila melanogaster*, ratones, y posiblemente humanos.

La reducción de la señalización IGF-1 también está pensada para contribuir a los efectos "anti-envejecimiento" de la restricción calórica.

## **Factores que influyen sobre los niveles en circulación**

### *Modelo 3D del IGF-1*

Los factores que son conocidos por causar variaciones en los niveles de hormona del crecimiento (GH) y IGF-1 en circulación incluyen: genética, la hora del día, la edad, sexo, ejercicio, niveles de estrés, niveles de nutrición e índice de masa corporal (IMC), estado de salud, raza, estado de estrógenos, e ingesta de xenobióticos. La inclusión de ingesta de xenobióticos como factor que influye en el estado de GH-IGF circulante resalta el hecho que el eje GH-IGF es un potencial objetivo de ciertos químicos perturbadores endocrinos.

### *Enfermedades de deficiencia y resistencia*

Se han descrito enfermedades raras por fallos en la producción o respuesta al IGF-I, que resultan en una alteración específica del crecimiento. Uno de estos trastornos, el síndrome de Laron, no responde en absoluto al tratamiento con hormona del crecimiento debido a una falta de receptores de GH. La FDA ha agrupado estas enfermedades en un trastorno llamado deficiencia primaria de IGF (IGFD) severa. Los pacientes afectados presentan niveles de normales a elevados de GH, una altura por debajo de -3 desviaciones estándar (DS), y niveles de IGF por debajo de -3 DS. La deficiencia primaria de IGF severa incluye pacientes con mutaciones en el receptor de GH, mutaciones post-receptor o mutaciones de IGF. Como resultado, los pacientes no responden al tratamiento con GH.

La ruta de señalización del IGF parece jugar un papel importante en el cáncer. Varios estudios han demostrado que niveles altos de IGF aumentan el riesgo de cáncer.

Estudios hechos en células de cáncer de pulmón muestran que los medicamentos que inhiben esta señalización podrían ser en el futuro una potente arma terapéutica contra el cáncer.

**Utilidades clínicas como prueba diagnóstica**

Rangos de referencia para IGF-1 (en ng/ml)

<b>EDAD</b>	<b>MUJER</b>		<b>HOMBRE</b>	
	<b>P 2,5</b>	<b>P 97,5</b>	<b>P 2,5</b>	<b>P 97,5</b>
20	111	423	156	385
25	102	360	119	343
30	94	309	97	306
35	86	271	84	275
40	79	246	76	251
45	73	232	71	233
50	68	228	66	221
55	64	231	61	214
60	61	237	55	211
65	59	241	49	209
70	57	237	46	207
75	55	219	48	202

Tabla 1. 2 Rangos de referencia para IGF-1 (en ng/ml), de utilidad clínica como prueba diagnóstica.

Los niveles de IGF-I se pueden medir en sangre, con un rango de normalidad de 10 a 1000 ng/ml. Como los niveles no fluctúan mucho a lo largo del día para cada persona, se utilizan en pruebas de screening para detectar la deficiencia y el exceso de GH.

La interpretación de los niveles de IGF-I es complicada, dada la amplitud del rango de normalidad, y sus variaciones por edad, sexo y estado puberal. Clínicamente, las alteraciones significativas pueden estar enmascaradas por dicha amplitud de rango. Suele resultar más útil la determinación secuencial de los niveles, especialmente en determinadas patologías hipofisarias, desnutrición y problemas del crecimiento.

### **Como agente terapéutico**

La mecasemina (nombre comercial Increlex<sup>®</sup>) es un análogo sintético del IGF-1 que está aprobado para el tratamiento de la falta de crecimiento. El IGF-1 ha sido fabricado recombinantemente a gran escala utilizando la levadura de la bacteria *Escherichia coli*.

Se han realizado ensayos clínicos para evaluar la posible eficacia del IGF-I recombinante en una multitud de patologías: problemas del crecimiento, diabetes mellitus tipos 1 y 2, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA, también conocido como "enfermedad de Lou Gehrig"), quemados severos, y distrofia muscular miotónica. Los ensayos muestran gran eficacia en la diabetes mellitus, en cuanto a la reducción de los niveles de Hg A1C, así como el consumo diario de insulina. Sin embargo, la empresa patrocinadora del ensayo (Genentech), interrumpió el ensayo debido a la exacerbación de la retinopatía diabética en ciertos pacientes. En cuanto a su uso para la ELA, los laboratorios Cephalon y Chiron llevaron a cabo dos ensayos: uno demostró su eficacia terapéutica y el resultado del segundo era ambiguo, por lo que su uso no fue aprobado por la FDA.

Sin embargo, debido a los esfuerzos del laboratorio Tercica, en agosto de 2005 la FDA aprobó el uso de un tipo de IGF-I recombinante, Increlex<sup>®</sup>, como terapia sustitutiva para pacientes con un déficit severo de IGF-I, tras un ensayo con 71 pacientes. En diciembre del mismo año, la FDA aprobó InPlex<sup>®</sup> (del laboratorio Insmmed), un complejo IGF-I/IGF BP-3. Este fármaco se inyecta en una sola dosis diaria,

frente a las dos necesarias para Increlex<sup>®</sup>, por lo que los efectos secundarios son menores para una misma eficacia.

Insmed fue acusado de infringir la licencia de patente de Tercica, por lo que fue llevado a los tribunales con la intención de que prohibieran la venta de InPlex<sup>®</sup>. En consecuencia, Increlex<sup>®</sup> es actualmente el único fármaco derivado de IGF-I en el mercado estadounidense y europeo.

En un ensayo clínico de un compuesto en investigación llamado MK-677, que eleva el IGF-1 de los pacientes, no resultó en una mejora de los síntomas del Alzheimer. Otro ensayo demostró que el IGF-1 de Cephalon no retrasa la progresión de la debilidad en pacientes con ELA. Estudios previos de menor duración tuvieron resultados conflictivos.

El IGFBP-3 es un transportador de IGF-1, el IGF-1 se une al IGFBP-3 creando un complejo cuyo peso molecular combinado y afinidad de unión le permite al factor de crecimiento tener una vida media incrementada en suero. Sin su unión con el IGFBP-3, el IGF-1 es rápidamente eliminado a través del riñón, debido a su bajo peso molecular. Al unirse al IGFBP-3, el IGF-1 evade la eliminación renal. También, debido que el IGFBP-3 tiene una afinidad menor con el IGF-1 que el IGF-1 tiene con su receptor, el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFR), su unión con el IGFBP-3 no interfiere con su función. Por estas razones, una combinación IGF-1/IGFBP-3 fue aprobada para el tratamiento humano.

El IGF-1 también ha sido demostrado de ser efectivo en modelos animales de accidentes cerebrovasculares cuando este es combinado con eritropoyetina. Se encontraron mejoras conductuales y celulares.

## **Mecasermín**

### *Farmacocinética*

Los niveles plasmáticos máximos de insulina como factor de crecimiento-1 (IGF-I) pueden aumentarse hasta en 35 veces lo normal siendo seguros, mediante la administración de somatomedina-1 binding protein-3. Varias dosis IV de rinfabate en el rango de 60-600 mg / kg produjeron un valor de Cmax de 7000 ng / ml de rhIGF-1 en sujetos sanos, voluntarios.

Los parámetros farmacocinéticos de Mecasermín fueron evaluados en cuatro pacientes con síndrome de insensibilidad a la hormona de crecimiento (GHIS) en comparación con el estándar de rhIGF-I. Mecasermín rinfabate se administra como una sola inyección SC en dosis de 0,5 y 1,0 mg / kg después del desayuno durante 7 días con un intervalo de 3 días entre la dosificación. Una dosis única de Mecasermín rinfabate (1,0 mg / kg) aporta la misma cantidad que dos inyecciones diarias de la fórmula estándar de rhIGF-I (AUC<sub>24</sub> valores de 10 860 dosis vs de 10 160 microgramos x h / L, respectivamente). Mecasermín rinfabate alcanzó sus concentraciones plasmáticas máximas a las 15-19h, en comparación con las 8 horas de la formulación estándar.

En la fase I y II de los estudios en 33 voluntarios sanos y 38 pacientes con diabetes tipo 1, respectivamente, los pacientes diabéticos tenían valores mayores de aclaramiento, pero inferiores de formación de IGF-I endógeno, volumen de distribución y tasas de absorción, en comparación con voluntarios sanos. Hubo una menor tasa de aclaramiento de IGF-I y un menor volumen de distribución en pacientes diabéticos hembra. La variabilidad inter e intraindividual de la farmacocinética de la IGF-I fueron de aproximadamente 40% y 20%. En sujetos diabéticos y sanos, la tasa de formación endógena de IGF-I disminuía con la edad.

### *Efectos adversos*

En voluntarios sanos, Mecasermín rinfabate 1200 mg / kg IV ha causado efectos adversos leves y reversibles. Las dosis de  $\leq 600$  mg / kg fueron bien toleradas. De acuerdo con los resultados de una fase II, placebo-control, doble ciego en mujeres de

edad avanzada con fractura de cadera y osteoporosis reciente, Mecasermín rinfabate 0.5-1 mg / kg / día fue bien tolerado con un perfil de tolerancia similar al placebo. En un estudio clínico de fase II con Mecasermín en los niños con síndrome de insensibilidad a la hormona del crecimiento (GHIS), no se informaron eventos adversos.

## **Farmacodinamia**

### *Diabetes*

En 12 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 que reciben Mecasermín (2 mg / kg SC infusión durante 4 semanas), el requisito medio diaria de insulina disminuyó un 49% y los niveles medios de glucosa un 23% en comparación con la terapia convencional. En pacientes que recibieron Mecasermín, el colesterol total y los niveles de hormona de crecimiento se redujeron en un 12% y 77%, respectivamente.

En un estudio doble ciego, controlado con placebo, con rango de dosis de estudio en seis pacientes adolescentes con diabetes tipo 1, la terapia de insulina, a dosis únicas de Mecasermín (0,1 a 0,8 mg / kg / día, inyección subcutánea durante 2 días) restauró los niveles en sangre de IGF-1 y aumentó la sensibilidad a la insulina dosis-dependiente. Se observó una supresión significativa de la liberación de la hormona del crecimiento durante la noche.

Mecasermín 0,8 mg / kg / día redujo significativamente la necesidad de insulina durante la noche en comparación con placebo (0,17 frente a 0,32 mU / kg peso corporal / min) en 18 pacientes adolescentes y adultos jóvenes con diabetes tipo 1. En un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, cruzado, los requerimientos de insulina durante la noche fueron marcados de manera significativa por la dosis de Mecasermín y por los niveles basales de IGF-I. La sensibilidad a la insulina se correlaciona inversamente con los requerimientos de insulina durante la noche y los niveles hormonales durante los picos de crecimiento.

En un estudio clínico de fase II, Mecasermín (0,125 a 2 mg / kg una vez al día durante 8 días) mejoró los parámetros glucémicos en 37 pacientes con diabetes tipo 2 recibiendo su régimen de insulina regular. Todas las dosis de Mecasermín produjeron mejoras en la sensibilidad a la insulina y en los niveles de glucosa en sangre en ayunas

al final del estudio. Los cambios más pronunciados se produjeron con la dosis de 2 mg / kg, con una reducción en el requerimiento diario de insulina y glucosa en sangre de un 20,2% y 40,4%, respectivamente. Los cambios correspondientes en el grupo de placebo fueron -1,9% y -11%, respectivamente.

### *Trastornos músculo-esqueléticos*

En un estudio doble ciego, controlado con placebo, las infusiones continuas subcutáneas de Mecasermin más de 7 días en 12 mujeres de entre 55-70 años produjeron una elevación de aproximadamente el 50% en el nivel del péptido procolágeno C, que es un marcador de formación de hueso y tejido conectivo.

## **IGF-1 EN LA REGENERACIÓN NERVIOSA**

El desarrollo científico histórico ha concedido un papel no descubierto previamente a los factores de crecimiento insulínicos en la regeneración del nervio periférico. Las observaciones previas indicaban cómo la reparación nerviosa se veía estimulada por factores solubles liberados desde los nervios degenerados y los órganos diana denervados. El descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF), y la formulación de la teoría neurotrófica, refuerzan la creencia de que la difusión de factores solubles desde los tejidos que pierden la inervación concede a éstos un papel como factores neurotróficos.

Forssman fue el primero en postular el papel de los factores tróficos en la regeneración nerviosa (*Forssman J, 1898*). Más tarde, Ramón y Cajal observaron que los axones en regeneración preferentemente crecían hacia el cabo distal del nervio

seccionado (*Ramón y Cajal, 1928*). Esto indicaba que una sustancia soluble que pudiese estimular y dirigir la regeneración podría ser dirigida desde los nervios degenerados (*Politis et al., 1982; Williams et al., 1984; Mackinnon et al., 1987*), y la cantidad liberada aumenta tras el daño nervioso (*Windebank & Blexrud, 1986*).

La hipótesis de que los IGF juegan un papel en el circuito de reparación neural (*Ishii et al., 1985*), recibió un importante apoyo cuando se demostró la expresión temporal del gen del IGF-2 en el músculo estrechamente relacionado con el desarrollo de la unión neuromuscular (*Ishii et al., 1989*). El RNA mensajero del IGF-2 está presente el día 14 del desarrollo embrionario en los esbozos de las extremidades para la formación de la primera sinapsis el día 16, en ratas (*Kelly & Zacks, 1969*). Se postula que el aumento prenatal del mRNA del IGF-2 contribuye a la acumulación de sinapsis polineuronales, las cuales se desarrollaron a partir del nacimiento (*Dennis et al. 1981*).

La expresión de los genes del IGF-1 y del IGF-2 (*Ishii et al., 1989*) aumenta en los músculos de las ratas adultas después de la denervación. El contenido de mRNA de IGF vuelve a niveles basales si la regeneración de las sinapsis funcionales se completa después de la lesión nerviosa, permaneciendo elevado si la reparación no se logra. Estas observaciones muestran que la expresión del gen de IGF está por debajo del feedback de inhibición en el músculo adulto, y que el aumento en el contenido del mRNA se correlaciona con un cambio en el estadio biomecánico del músculo tras la denervación.

No está aclarado aún si el IGF actúa directamente sobre los axones, o indirectamente a través de las células de Schwann y otras células, durante el proceso de regeneración del nervio periférico. La infusión de IGF puede aumentar la incorporación de Timidina en las células de Schwann (*Sjöberg et al., 1988*). Sin embargo, la presencia de células de Schwann no es necesaria para la estimulación del IGF sobre la neurita en crecimiento, en neuronas de nervios periféricos cultivadas (*Recio-Pinto et al., 1986*), y los receptores para IGF están localizados en los puntos de crecimiento y a lo largo del eje de los axones (*Caroni & Grandes, 1990*).

La dependencia de la regeneración axonal motora y sensorial en IGF endógeno en los nervios (bajo regulación del RNAm de IGF en los nervios lesionados) y la observación de que la inmunorreactividad a IGF-1 se incrementa en las células de Schwann, hacen cierta la hipótesis de que los nervios poseen niveles de IGF-1 derivado de factores neurotróficos que ayudan a regular la regeneración nerviosa.

La infusión local de IGF-I ha demostrado aumentar la distancia de la regeneración de los axones sensitivos en nervios ciáticos de rata lesionados (*Kanje et al., 1989; Sjöberg & Kanje, 1989*). Observaron que la infusión de IGF-II podría aumentar la distancia de la regeneración axonal motora en nervios ciáticos. Un suero anti-IGF, que reconoce tanto el IGF-I e IGF-II, causó una disminución sostenida de la tasa de regeneración de los axones sensoriales, lo que demuestra que la actividad de IGF endógeno en los nervios se requiere constantemente para mantener la tasa de regeneración espontánea.

Los autores especulan que las altas concentraciones de IGF dentro de los nervios lesionados pueden estimular la germinación axonal y garantizar la ramificación durante la regeneración. La posterior baja regulación de los contenidos de IGF puede permitir la retracción de la proyección incorrecta de las ramas colaterales (*Apel et al., 2010*).

## *HIPÓTESIS DE TRABAJO*

---



La hipótesis nula ( $H_0$ ) es demostrar que no existen diferencias estadísticamente significativas en la reparación de un defecto crítico del nervio periférico provocado en el nervio ciático, mediante un injerto de músculo estriado alogénico descelularizado, enriquecido con factores de crecimiento tipo IGF-1 (Animales del Grupo “Casos”), vs abstención en el uso de factores de crecimiento dentro del mismo tipo de injerto muscular, en defecto similar provocado en el mismo nervio (Animales del Grupo “Controles”).

La hipótesis alternativa ( $H_1$ ) es demostrar que sí existen diferencias.

La variable cualitativa “reparación nerviosa” se analiza mediante criterios funcionales e histológicos, y se compara mediante un análisis estadístico.



## ***OBJETIVOS***

---



Este trabajo tiene como objetivo permitir una evaluación crítica de los problemas fundamentales subyacentes y los síntomas clínicos de la lesión del nervio periférico. El modelo de nervio ciático de la rata se utiliza para proporcionar técnicas experimentales cuantificables para evaluar procesos fisiológicos y fisiopatológicos implicados en la lesión del nervio periférico. Todos los experimentos y los modelos diseñados para esta tesis se concentran en el sitio del nervio periférico que es susceptible de lesión.

## 1.- OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de la tesis es estudiar la capacidad de regeneración del nervio periférico en lesiones no reparables espontáneamente, mediante el uso de injertos de músculo alogénico descelularizado, con o sin la aplicación de un concentrado comercializado de factor de crecimiento IGF-1 sobre dicho injerto. Se investiga el papel del IGF-1 como promotor de la regeneración axonal.

## **2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- 1.- Conocer la capacidad de reparación de las lesiones críticas (sin regeneración espontánea) del nervio ciático en ratas, mediante un injerto de músculo descelularizado.
- 2.- Intentar potenciar la regeneración de las lesiones críticas del nervio periférico mediante la aplicación de un concentrado de factores de crecimiento tipo insulínico.
- 3.- Análisis del método biológico para la descelularización del músculo estriado.
- 4.- Completar un estudio funcional e histológico de los nervios tratados.
- 5.- Comparar la evolución de las lesiones del nervio ciático tratadas con y sin aporte de concentrado de IGF-1 en dos grupos de 10 animales cada uno.
- 6.- Discutir su viabilidad en la práctica clínica en humanos.

## ***OBJECTIVES***

---



This research aims to enable a more critical assessment of the fundamental problems underlying the clinical symptoms of peripheral nerve injury. Rat sciatic nerve model is used to provide quantifiable experimental techniques for assessing physiological and pathophysiological processes involved in peripheral nerve injury. All experiments and models designed for this study are concentrated on peripheral nerve which is susceptible to injury.

## **1.- MAIN OBJETIVE**

The main goal of this thesis consists of studying the ability of peripheral nerve regeneration in severely damaged sciatic nerves using allogeneic acellular muscle grafts, with or without the application of a concentrated growth factor IGF-1 to promote axonal regeneration.

## **2.- SECONDARY OBJECTIVES**

1. - Know the repair capacity of critical injuries (no spontaneous regeneration) of the sciatic nerve in rats, using an acellular muscle graft.
2. - Attempt to enhance the regeneration of peripheral nerve over a critical lesion by applying a concentrate of insulin-like growth factor 1 (IGF-1).
3. - Analysis of biological method for decellularization of striated muscle.
4. - Complete a functional and histological study of treated nerves.
5. - Compare the recovery of sciatic nerve injuries treated with and without the addition of IGF-1 concentrate in two groups of 10 animals each.
6. - Discuss its viability in human clinical practice.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

---



**1.- TIPO DE ENSAYO**

**2.- ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN**

**3.- ESTABULARIO Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO**

**4.- INSTALACIONES**

- QUIRÓFANO EXPERIMENTAL
- LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
- MATERIAL QUIRÚRGICO
  - 5. Instrumental macroquirúrgico
  - 6. Material de microcirugía
  - 7. IGF-1
  - 8. Material complementario

**5.- PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

**6.- DISEÑO DEL ESTUDIO**

**7.- DISEÑO DEL DEFECTO NERVIOSO**

**8.- OBTENCIÓN DE INJERTOS MUSCULARES**

**9.- MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DESCELULARIZACIÓN**

**10.- CUIDADOS PERIOPERATORIOS**

- ANESTESIA DE LOS ANIMALES
- COLOCACIÓN DEL ANIMAL
- ASEPSIA

**11.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

**12.- CUIDADOS POSTOPERATORIOS**

**13.- MÉTODO DE ESTUDIO FUNCIONAL**

**14.- CRONOLOGÍA**

**15.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES**

**16.- EXTRACCIÓN Y TALLAJE DE LAS PIEZAS**

**17.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE NERVIO CIÁTICO. ESTUDIO HISTOLÓGICO A MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL Y ELECTRÓNICO**

- PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN
- PROCEDIMIENTO DE INCLUSIÓN
- PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN
  - 4. Hematoxilina eosina
  - 5. Tricrómico de Masson
  - 6. Azul de toluidina

**18.- CONTAJE DE AXONES**

**19.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

## 1.- TIPO DE ENSAYO

Se trata de un Ensayo Clínico Controlado, nivel I de evidencia científica.

El concepto de Medicina Basada en la Evidencia (MBE) fue desarrollado por un grupo de internistas y epidemiólogos clínicos, liderados por Gordon Guyatt, de la Escuela de Medicina de la Universidad McMaster de Canadá (*Guyatt et al., 1992*). En palabras de David Sackett, “la MBE es la utilización consciente, explícita y juiciosa de la mejor evidencia clínica disponible para tomar decisiones sobre el cuidado de los pacientes individuales” (*Sackett et al., 1996*). El objetivo de la MBE es disponer de la mejor información científica disponible, la evidencia, para aplicarla a la práctica clínica (*Guerra Romero L, 1996*).

Según el rigor científico del diseño de los estudios pueden construirse escalas de clasificación jerárquica de la evidencia, a partir de las cuales pueden establecerse recomendaciones para la elección de un procedimiento médico o intervención sanitaria (*Jovell & Navarro-Rubio, 1995; Guyatt et al., 1995*). Todas las escalas de clasificación son muy similares, aunque existen sutiles diferencias. La primera de ellas fue realizada en 1979 por la Canadian Task Force on the Periodic Health Examination ([www.ctfphc.org](http://www.ctfphc.org)) para la evaluación de medidas preventivas (*Spitzer et al., 1979*), y adaptada en 1984 por la U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF). En su tercera edición, publicada recientemente (*Harris et al., 2001*) y que puede consultarse en la web de la Agency for Healthcare Research and Quality ([www.ahrq.gov/clinic/uspstfix.htm](http://www.ahrq.gov/clinic/uspstfix.htm)), se evalúa la calidad de la evidencia de una forma más elaborada que no sólo tiene en cuenta el tipo de diseño de los estudios (tabla 1). Los grados de recomendación se establecen a partir de la calidad de la evidencia y del beneficio neto (beneficios menos perjuicios) de la medida evaluada (tablas 2 y 3). Además, en ella se realizan análisis de coste-efectividad (*Saha & Bindman, 2001*).

Tabla 1. Jerarquía de los estudios por el tipo de diseño (USPSTF) (7)

Nivel de evidencia	Tipo de estudio
I	Al menos un ensayo clínico controlado y aleatorizado diseñado de forma apropiada.
II-1	Ensayos clínicos controlados bien diseñados, pero no aleatorizados.
II-2	Estudios de cohortes o de casos-controles bien diseñados, preferentemente multicéntricos.
II-3	Múltiples series comparadas en el tiempo con o sin intervención, y resultados sorprendentes en experiencias no controladas.
III	Opiniones basadas en experiencias clínicas, estudios descriptivos, observaciones clínicas o informes de comités de expertos.

Tabla 2. 1 Jerarquía de los estudios por el tipo de diseño (USPSTF).

Si clasificamos el estudio sólo en función del diseño realizado, este proyecto sería un Nivel I de evidencia porque es un estudio experimental controlado aleatorizado.

Tabla 2. Establecimiento de las recomendaciones (USPSTF) (7)

Calidad de la evidencia	Beneficio neto sustancial	Beneficio neto moderado	Beneficio neto pequeño	Beneficio neto nulo o negativo
Buena	A	B	C	D
Moderada	B	B	C	D
Mala	E	E	E	E

Tabla 2. 2 Establecimiento de las recomendaciones (USPSTF)

Tabla 3. Significado de los grados de recomendación (USPSTF) (7)

Grado de recomendación	Significado
A	Extremadamente recomendable (buena evidencia de que la medida es eficaz, y los beneficios superan ampliamente a los perjuicios).
B	Recomendable (al menos moderada evidencia de que la medida es eficaz, y los beneficios superan a los perjuicios).
C	Ni recomendable ni desaconsejable (al menos moderada evidencia de que la medida es eficaz, pero los beneficios son muy similares a los perjuicios y no puede justificarse una recomendación general).
D	Desaconsejable (al menos moderada evidencia de que la medida es ineficaz o de que los perjuicios superan a los beneficios).
I	Evidencia insuficiente, de mala calidad o contradictoria, y el balance entre beneficios y perjuicios no puede ser determinado.

Tabla 2. 3 Significado de los grados de recomendación.

Este estudio puede ser clasificado con una recomendación moderada, porque presenta al menos moderada evidencia de que sus medidas son eficaces y los beneficios superan a los perjuicios.

La utilizada por el Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) también ha sido revisada recientemente (*Harbour & Miller, 2001*) (tablas 4-5).

Tabla 4. Niveles de evidencia (SIGN) (9)

Nivel de evidencia	Tipo de estudio
1++	Metaanálisis de gran calidad, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados o ensayos clínicos aleatorizados con muy bajo riesgo de sesgos.
1+	Metaanálisis bien realizados, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados o ensayos clínicos aleatorizados con bajo riesgo de sesgos.
1-	Metaanálisis, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados o ensayos clínicos aleatorizados con alto riesgo de sesgos.
2++	Revisiones sistemáticas de alta calidad de estudios de cohortes o de casos-controles, o Estudios de cohortes o de casos-controles de alta calidad, con muy bajo riesgo de confusión, sesgos o azar y una alta probabilidad de que la relación sea causal.
2+	Estudios de cohortes o de casos-controles bien realizados, con bajo riesgo de confusión, sesgos o azar y una moderada probabilidad de que la relación sea causal.
2-	Estudios de cohortes o de casos-controles con alto riesgo de confusión, sesgos o azar y una significativa probabilidad de que la relación no sea causal.
3	Estudios no analíticos (observaciones clínicas y series de casos).
4	Opiniones de expertos.

Tabla 2. 4 Niveles de evidencia (SIGN).

Según el Scottish Intercollegiate Guidelines Network, su nivel de evidencia sería un 2++, porque es un estudio de casos-controles de alta calidad, con muy bajo riesgo de confusión, sesgo o azar, y una alta probabilidad de que la relación sea causal.

Tabla 5. Grados de recomendación (SIGN) (9)

Grado de recomendación	Nivel de evidencia
A	Al menos un metaanálisis, revisión sistemática o ensayo clínico aleatorizado calificado como 1++ y directamente aplicable a la población objeto, o Una revisión sistemática de ensayos clínicos aleatorizados o un cuerpo de evidencia consistente principalmente en estudios calificados como 1+ directamente aplicables a la población objeto y que demuestren globalmente consistencia de los resultados.
B	Un cuerpo de evidencia que incluya estudios calificados como 2++ directamente aplicables a la población objeto y que demuestren globalmente consistencia de los resultados, o Extrapolación de estudios calificados como 1++ o 1+.
C	Un cuerpo de evidencia que incluya estudios calificados como 2+ directamente aplicables a la población objeto y que demuestren globalmente consistencia de los resultados, o Extrapolación de estudios calificados como 2++.
D	Niveles de evidencia 3 o 4, o Extrapolación de estudios calificados como 2+.

Tabla 2. 5 Grados de recomendación (SIGN).

Según el Scottish Intercollegiate Guidelines Network, el grado de recomendación del estudio sería B, porque incluye un estudio 2++, aplicable a la población.

La propuesta por el Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM) de Oxford, tiene en cuenta no sólo las intervenciones terapéuticas y preventivas (tablas 6, 7 y 8), sino también aquellas ligadas al diagnóstico, pronóstico, factores de riesgo y evaluación económica.

Tabla 6. Niveles de evidencia (CEBM)

Nivel de evidencia	Tipo de estudio
1a	Revisión sistemática de ensayos clínicos aleatorizados, con homogeneidad.
1b	Ensayo clínico aleatorizado con intervalo de confianza estrecho.
1c	Práctica clínica ("todos o ninguno") (*)
2a	Revisión sistemática de estudios de cohortes, con homogeneidad.
2b	Estudio de cohortes o ensayo clínico aleatorizado de baja calidad (**)
2c	"Outcomes research" (***), estudios ecológicos.
3a	Revisión sistemática de estudios caso-control, con homogeneidad.
3b	Estudio caso-control.
4	Serie de casos o estudios de cohortes y caso-control de baja calidad (****)
5	Opinión de expertos sin valoración crítica explícita, o basados en la fisiología, "bench research" o "first principles" (*****)

Tabla 2. 6 Niveles de evidencia (CEBM).

Según el Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM) de Oxford, este estudio correspondería a un nivel de evidencia 1b, un ensayo aleatorizado con un intervalo de confianza estrecho.

Se debe añadir un signo menos (-) para indicar que el nivel de evidencia no es concluyente si:

- Ensayo clínico aleatorizado con intervalo de confianza amplio y no estadísticamente significativo.
- Revisión sistemática con heterogeneidad estadísticamente significativa.

(\*) Cuando todos los pacientes mueren antes de que un determinado tratamiento esté disponible, y con él algunos pacientes sobreviven, o bien cuando algunos pacientes morían antes de su disponibilidad, y con él no muere ninguno.

(\*\*) Por ejemplo, con seguimiento inferior al 80%.

(\*\*\*) El término "outcomes research" hace referencia a estudios de cohortes de pacientes con el mismo diagnóstico en los que se relacionan los eventos que suceden con las medidas terapéuticas que reciben.

(\*\*\*\*) Estudio de cohorte: sin clara definición de los grupos comparados y/o sin medición objetiva de las exposiciones y eventos (preferentemente ciega) y/o sin identificar o controlar adecuadamente variables de confusión conocidas y/o sin seguimiento completo y suficientemente prolongado. Estudio caso-control: sin clara definición de los grupos comparados y/o sin medición objetiva de las exposiciones y eventos (preferentemente ciega) y/o sin identificar o controlar adecuadamente variables de confusión conocidas.

(\*\*\*\*\*) El término first principles hace referencia a la adopción de determinada práctica clínica basada en principios fisiopatológicos.

Tabla 7. Grados de recomendación (CEBM)

Grado de recomendación	Nivel de evidencia
A	Estudios de nivel 1.
B	Estudios de nivel 2-3, o extrapolación de estudios de nivel 1.
C	Estudios de nivel 4, o extrapolación de estudios de nivel 2-3.
D	Estudios de nivel 5, o estudios no concluyentes de cualquier nivel.

Tabla 2. 7 Grados de recomendación (CEBM)

*La extrapolación se aplica cuando nuestro escenario clínico tiene diferencias importantes respecto a la situación original del estudio.*

Tabla 8. Significado de los grados de recomendación

Grado de recomendación	Significado
A	Extremadamente recomendable.
B	Recomendación favorable.
C	Recomendación favorable, pero no concluyente.
D	No se recomienda ni se desaprueba.

Tabla 2. 8 Significado de los grados de recomendación.

Si la experimentación cumple con un nivel de evidencia 1b según el Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM) de Oxford, corresponde a un grado de recomendación A.

Hay que destacar el esquema de gradación propuesto por la Agència d'Avaluació de Tecnologia Mèdica (AATM) de la Generalitat de Catalunya (*Jovell & Navarro-Rubio, 1995*). Esta clasificación tiene en cuenta además del diseño de los estudios una valoración específica de su calidad (tabla 9).

Tabla 9. Niveles de calidad de la evidencia científica (AATM) (4)

Nivel	Fuerza de la evidencia	Tipo de diseño	Condiciones de rigurosidad científica
I	Adecuada	Metaanálisis de ECA	Análisis de datos individuales de los pacientes No heterogeneidad Diferentes técnicas de análisis Metarregresión Megaanálisis Calidad de los estudios
II	Adecuada	ECA de muestra grande	Evaluación del poder estadístico Multicéntrico Calidad del estudio
III	Buena a regular	ECA de muestra pequeña	Evaluación del poder estadístico Calidad del estudio
IV	Buena a regular	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles coincidentes en el tiempo Multicéntrico Calidad del estudio
V	Regular	Ensayo retrospectivo controlado no aleatorizado	Controles históricos Calidad del estudio
VI	Regular	Estudios de cohorte	Multicéntrico Apareamiento Calidad del estudio
VII	Regular	Estudios de casos y controles	Multicéntrico Calidad del estudio
VIII	Pobre	Series clínicas no controladas Estudios descriptivos: Vigilancia epidemiológica Encuestas Registros Bases de datos Comités de expertos Conferencias de consenso	Multicéntrico
IX	Pobre	Anécdotas o casos únicos (ECA: ensayo controlado aleatorizado)	

Tabla 2. 9 Niveles de calidad de la evidencia científica (AATM).

Según la gradación propuesto por la Agència d'Avaluació de Tecnologia Mèdica (AATM) de la Generalitat de Catalunya, el estudio sería un nivel III de evidencia científica, principalmente por el tamaño pequeño de muestra, con una fuerza de evidencia de buena a regular.

## 2.- ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Para ello, empleamos ratas de la Raza Wistar Han, machos todas, de 10-12 semanas de vida en el momento del inicio de la experimentación. La rata Wistar es una de las líneas albinas de la rata parda, de crecimiento más lento que la Sprague-Dawley, la otra línea más empleada en biomedicina.

Todos los animales han sido suministrados por la Granja de San Bernardo (Tulebras, Navarra) y se han mantenido en las condiciones habituales en el animalario del Departamento de Medicina y Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Los animales, todos de peso medio al inicio de la experimentación de 315 g para hacer homogéneos los grupos, fueron observados durante los días previos a la intervención y seleccionados solamente aquellos libres de enfermedades como diarrea, parasitación externa, conjuntivitis, caída de pelo o rinitis. Durante este periodo tuvieron una dieta ad libitum.

Se ha suministrado una dieta de mantenimiento Rata-Ratón Lética<sup>®</sup> tipo IPM-R20 cuyo análisis químico básico es el siguiente:

- Humedad máxima 9.00%
- Proteína bruta 17.00%
- Lisina, mínimo 0.70%
- Metionina+Cisteína, mínimo 0.50%
- Grasa bruta, mínimo 3.00%
- Fibra bruta, máximo 5.000/o
- Cenizas, máximo 5.00
- Calcio, mínimo 0.80%

- Fósforo, mínimo 0.655
- Cloruros, mínimo 0.60%
- M.E.L.N. 57%

Todo ello supone una energía metabolizable de 2950 Kcal/Kg. Los animales han tenido libre disposición de pienso y abundante agua potable a su alcance, administrada en biberones de 250 ml utilizando un separador entre éstos y el pienso.

Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según las líneas establecidas en la directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de las Comunidades Europeas (2010/63/UE) y de la legislación española (RD 1201/2005 y Ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

### 3.- ESTABULARIO Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO

Se han utilizado en todos los casos jaulas individuales de Makrolón<sup>®</sup>, Policarbonato, Tecniplast tipo 2C, transparentes, con techo de reja metálica que incluyen un compartimento donde se coloca la comida y el biberón de agua. Las dimensiones de la jaula son de 260 x 200 mm de medida interna de la cubeta con 120 mm de altura (50 mm de cama con viruta) y área de base de 410 cm<sup>2</sup>.

Como cama o lecho se ha empleado viruta para animales de laboratorio Ultrasorb Panlab<sup>®</sup>, carente de polvo, colorantes, insecticidas, fungicidas y sin productos químicos.

En todos los casos se han observado las directrices europeas relativas a enjaulado de roedores de laboratorio nº 86/109 de la CEE del 2 de Noviembre de 1986, y las normativas del gobierno español (R.D 223/1988, BOE nº67 de 18-03-1988), tanto en lo que se refiere a la superficie mínima del suelo de la jaula, como en relación al peso de la rata, humedad y temperatura de la habitación (*Arias et al., 1988; Vaquero et al., 1993*).

Los animales se alojaron en una habitación con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas (8:00 am hasta 08:00 pm). La temperatura de la habitación se mantuvo constante a 23°C y la humedad relativa al 47%.

La habitación disponía de aire acondicionado y se impidió el paso a personas no autorizadas para evitar el incremento del estrés en los animales.

## **4.- INSTALACIONES**

Se han utilizado las instalaciones del Departamento de Medicina y Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, así como el quirófano de cirugía experimental y los laboratorios del Departamento de Biología Celular e Histología, donde se han realizado las técnicas de perfusión intracardiaca, las tinciones, cortes y estudio de las muestras histológicas.

### **QUIRÓFANO EXPERIMENTAL**

Se dispuso de quirófano para cirugía experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, equipado básicamente con:

- Mesa quirúrgica.
- Lámpara móvil.
- Campana de anestesia de éter para pequeños animales.
- Microscopio quirúrgico.
- Televisor para ampliar la imagen del microscopio.
- Aire acondicionado.
- Máquina rasuradora.
- Báscula.

### **LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

La colaboración de dicho departamento ha sido decisiva, no sólo para el desarrollo de la experimentación y posterior estudio de los resultados, sino también para su colaboración con la aportación de sus instalaciones, que cuentan con:

- Arcón de congelación. Temperatura controlada entre -70 °C y -82 °C. Revco Última II; Asheville, NC, USA.
- Balanza Kern EG 600-2M. Kern & Sohn GmbH; Balingen, Alemania.
- Balanza de precisión Sartorius-Werke 2402; Göttingen, Alemania.
- Esterilizador/autoclave Raypa 75 L. R. Espinar, S.L., Terrasa, España.
- Microscopios biológicos, quirúrgico y electrónico (a especificar más adelante).
- Microtomo de rotación. Microm HM. Microm International GmbH, Walldorf, Alemania.
- phmetro Radiometer PHM82; Copenhague, Dinamarca.
- Pipetas de precisión con rango entre 1000-0.1 µl Eppendorf Research, Alemania.
- Procesador de tejidos biológicos Leica TP1020. Leica Microsystems, GmgH, Alemania.

## **MATERIAL QUIRÚRGICO**

### **1.- Instrumental macroquirúrgico**

Se ha utilizado material macroquirúrgico, aunque delicado, durante la disección de la piel y músculo hasta llegar al nervio ciático de la rata. El conjunto utilizado se compone de:

- Mango de bisturí metálico de diversos tamaños.
- Hojas de bisturí de diferentes numeraciones.
- Porta-agujas de Mayo.
- Tijera quirúrgica de Mayo recta y curva.
- Tijera de disección curva.
- Pinza de disección de Adson con y sin dientes.

- Pinzas hemostáticas finas tipo 'mosquito' (Hartman) curvas.
- Separadores manuales pequeños de Farabeuf.

## 2.- Material de microcirugía

### ❖ MEDIOS DE MAGNIFICACIÓN:

Se han utilizado como medios de magnificación quirúrgica:

#### A) *Microscopio quirúrgico:*

Se ha empleado para las técnicas de microcirugía nerviosa el microscopio operatorio de baja magnificación Optomic OP-C12 (Optomic Spain, S.A., Madrid, España), cuyas características son:

- Cabezal estereoscópico con focalización micrométrica
- Binocular recto o inclinado a 45° según configuración.
- Sistema de iluminación de luz fría coaxial a través del objetivo.
- Doble lámpara halógena refrigerada de 150 W.
- Conducción de luz por cable de fibra óptica.
- Oculares de "gran campo" 16x.
- Tambor cambiador de aumentos de 3 posiciones Sistema Galileo.
- Objetivo estándar de 200 mm (opcional 250 mm, 300 mm, 400 mm).

#### B) *Microscopio biológico:*

Microscopio biológico Zeiss Axiophot equipado para microscopía de campo claro, campo oscuro, Nomarski y epifluorescencia con objetivos PlanApo 1.25x y UPlanFl 4x, 10x, 20x, 40x y 100x y sistema de captura de imágenes Zeiss MRW. Carl Zeiss Co., Leipzig, Alemania.

Microscopio biológico Leica DM6000 equipado para microscopía de campo claro, campo oscuro, contraste diferencial y epifluorescencia con objetivos PlanApo 1.25x y PlanFluo 5x, 10x, 20x, 40x, 63x y 100x y sistema de captura de imágenes Leica DFC310FX. Leica Microsystems, GmgH, Alemania.

C) *Microscopio electrónico:*

Microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem-1200 EX II de los Servicios Centrales de la Universidad de Valladolid. Jeol LTd., Japón.

D) *Gafas lupa:*

De 3,5 aumentos, disponibles para la disección inicial hasta llegar al nervio ciático de la rata.

❖ *SUTURAS:*

Se han utilizado varios tipos de sutura:

- Sutura de Nylon monofilamento de 7/0 cara cortante y doble aguja.
- Sutura de polipropileno tipo Vicryl<sup>®</sup>blue con aguja curva de bisel triangular.
- Sutura de seda trenzada de 3/0 con aguja TB/15 (Marín<sup>®</sup>, Lorca, España), con aguja curva C-10 de (Ethicon<sup>®</sup>, Inc.) de 5-0 y 6-0.
- Sutura trenzada recubierta de poliglactina, Vicryl<sup>®</sup>rapid de 4/0 con aguja curva de bisel triangular, absorbible en 42 días y fuerza de tensión tisular de 12 días.

❖ *INSTRUMENTAL MICROQUIRÚRGICO:*

Se ha utilizado instrumental microquirúrgico de acero inoxidable, de la casa Chifa<sup>®</sup>, mate para evitar reflejos, compuesto de:

- Porta-aguja de Barraquer recto y curvo sin cierre, con mecanismo de resorte para evitar maniobras bruscas con mango plano.
- Tijeras de Wescott para disección fina (curvas y romas) y para corte (rectas y puntiagudas).
- Pinzas rectas y curvas tipo relojero denominadas pinzas Dumont.
- Clamps vasculares utilizados en nuestro caso para clampaje de la arteria poplítea que hemos disecado a la hora de la extracción del nervio para tener mayor

longitud de resección.

### **3.- IGF-1 Mecasermina**

❖ INCRELEX® 10 mg/ml solución inyectable.

❖ COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA:

Cada mililitro contiene 10 mg de mecaseermina.

Cada vial contiene 40 mg de mecaseermina.

La mecaseermina es un factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) humano producido en células de *Escherichia coli* por tecnología ADN recombinante.

Excipientes:

Un mililitro contiene 9 mg de alcohol bencílico. Los demás componentes son cloruro sódico, polisorbato 20, ácido acético glacial, acetato sódico y agua para preparaciones inyectables.

❖ FORMA FARMACÉUTICA:

Solución inyectable.

Solución acuosa, transparente e incolora.

### **4.- Material complementario**

❖ ANESTÉSICOS:

-Inhalatorios: Se han utilizado para la inducción anestésica, éter dietílico que es un líquido incoloro, irritante, volátil, inflamable y explosivo que se descompone por la luz,

el aire y el calor, por lo que debe mantenerse en recipiente opaco.

-Inyectables: Se utilizaron combinaciones con los siguientes agentes según los casos:

- Ketamina clorhidrato . Imalgène® 500, Merial S.A., Lyon, Francia.
- Xilacina clorhidrato 2%. Rompun®, Bayer Health Care, Kiel, Alemania.

❖ *ANTISÉPTICOS:*

Se han utilizado dos tipos de antisépticos habituales en cirugía de diferente composición química, que son la clorhexidina (Hibitane®, Zeneca Mexicana, S.A. de C.V. DIVISION FARMA) y un yodóforo (Betadine® MEDA PHARMA, S.A.).

❖ *RASURADORA:*

Para rasurar a la rata se ha empleado la rasuradora denominada Detachable Blade Small Animal Clipper Oster Golden A 5 modelo 5-55 H, con potencia de 35 Watt y frecuencia de 50 Hz.

❖ *BÁSCULA:*

La báscula utilizada es la denominada Lética® digital, modelo LE-2000. Y la balanza de precisión Sartorius-Werke 2402 (ya nombrada en el material del laboratorio del departamento de Biología Celular e Histología).

❖ *MATERIAL ICONOGRÁFICO:*

Para la fotografía macroscópica se ha utilizado una máquina fotográfica Canon® EOS 60D, con sensor CMOS APS-C de 18 MP, LCD de 7,7 cm (3") con formato 3:2 y ángulo variable, vídeos Full HD, disparos a 5,3 fps (máximo de 58 imágenes JPEG),

sistema AF con 9 puntos de enfoque tipo cruz y medición de iFCL con sensor de doble capa de 63 zonas.

❖ *TALLADORA:*

Para realizar los cortes finos y semifinos se hautilizado el microtomo de rotación del laboratorio del departamento de Biología Celular e Histología, Microm HM 340 E.

❖ ANÁLISIS DE IMAGEN

Para realizar el contaje axonal, está disponible el sistema de análisis de imagen con el software MI, 4ADV de C.I.D, pero no ha sido utilizado en nuestro estudio.

2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	2.10
Especie	Estudios de biología fundamental	Investigación y desarrollo de productos e instrumentos de medicina, odontología y veterinaria (excluida la evaluación de la seguridad-toxicología y de otros tipos-, que figura en la columna 2.6)	Producción y control de calidad de productos e instrumentos de medicina y odontología	Producción y control de calidad de productos e instrumentos de veterinaria	Evaluaciones de la seguridad (toxicología y otros tipos, incluida la evaluación de la seguridad de productos e instrumentos de medicina, odontología y veterinaria)	Diagnóstico de enfermedades	Educación y formación	Otros	Total
2.a Ratones	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.b Ratas	<b>12</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>12</b>
2.c Cobayas	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.d Hámsters	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.e Otros roedores	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.f Conejos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.g Gatos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.h Perros	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.i Hurones	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.j Otros carnívoros	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.k Caballos, asnos e híbridos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.l Cerdos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.m Cabras	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.n Ovejas	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.o Vacas	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.p Prosimios	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.q Platirrinios	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.r Catarrinos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.s Monos antropomorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.t Otros mamíferos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.u Codornices	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.v Otras aves	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.w Reptiles	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.x Anfibios	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.y Peces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.z TOTAL	<b>12</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>12</b>

Tabla 2. 10 Número de animales utilizados en experimentos para fines concretos, por especies.

## 5.- PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

REGISTRO ENTRADA

FECHA: 20/06/2011

Nº REGISTRO APROBACIÓN CEEBA

FECHA: 22/06/2011

1. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN O DOCENCIA
  - 1.1. TÍTULO: "USO DE FACTORES DE CRECIMIENTO (NEUREGULINAS) EN LAS LESIONES CRÍTICAS DEL NERVI PERIFÉRICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL".
  - 1.2. INVESTIGADOR PRINCIPAL: *Dr. Miguel Ángel Martín Ferrero.*
  - 1.3. CONVOCATORIA PÚBLICA – PRIVADA
  
2. FECHA PREVISTA INICIO: *Junio 2011* DURACIÓN: *2 años.*
  
3. PROCEDIMIENTOS INCLUIDOS DENTRO DEL PROYECTO -  
ENUMERAR

### **PROCEDIMIENTO:**

- 3.1. *Cirugía consistente en sección de aproximadamente 1cm-1'5cm de nervio Ciático mayor por abordaje posteroexterno de la extremidad inferior, que se sustituye inmediatamente y en la misma intervención por un injerto tallado de músculo Glúteo mayor del mismo animal, cubriéndolo con factores de crecimiento IGF-1. Todo ello se realiza en condiciones de antisepsia y con material quirúrgico estéril.*
- 3.2. *Se sacrifica el animal mediante inyección intracardíaca de Pentobarbital sódico, tras 90 días de seguimiento. Autopsia con sección de la zona injertada así como aproximadamente 2 cm de nervio tanto en cabo proximal como en el distal de los mismos animales, que a continuación es fijada para estudio histológico e inmunohistoquímico.*

4. PROTOCOLO DEL PROCEDIMIENTO (Detallar por cada uno de ellos)

Nuevo

Continuación del protocolo N°

Enmienda del protocolo N°

4.1. OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO (Resumidamente):

*El objetivo del proyecto es estudiar la capacidad de regeneración del nervio periférico en lesiones no reparables mediante el uso de injertos musculares desnaturalizados y aporte de factores de crecimiento. Se trata de un estudio experimental en animales, ratas Wistar, en 12 individuos. El método diseñado dispone de tres fases.*

*Fase 1: Tras la anestesia del animal crearemos una lesión no reparable, de 10-15 mm de longitud, en el nervio ciático de una de las patas traseras de los 12 animales. Dicho defecto será cubierto mediante un injerto muscular obtenido del músculo glúteo mayor y tratado mediante calor con microondas, cubriéndolo con factores de crecimiento tipo IGF-1. Los nervios ciáticos contralaterales actuarán como controles.*

*Fase 2: Transcurridos 3 meses desde la fase 1, los animales, tras vivir en su ambiente normal, serán objeto de un análisis funcional, y finalmente serán sacrificados para exéresis de los nervios ciáticos y la realización de análisis histológico e inmunohistoquímico de los mismos.*

*Fase 3: Comparación de los resultados en casos y controles y comparación con los resultados obtenidos en un estudio experimental previo en el que se utilizaron injertos musculares desnaturalizados sin aporte de factores.*

4.2. JUSTIFICACIÓN DE LA NECESIDAD DE UTILIZAR ANIMALES:

*Tras estudiar y valorar la existencia de métodos alternativos para estudiar la regeneración nerviosa, no se ha identificado la existencia de un método o protocolo alternativo para obtener las conclusiones del estudio propuesto sin el uso de animales, o que permita la reducción del número de animales o logre un menor sufrimiento de los animales. No existe otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener el resultado perseguido sin implicar la necesidad de animales.*

*La rata supone una fuente de tejido nervioso mamífero de idéntica carga genética. Además, es de fácil manejo, permitiendo que sea bien estudiada. El nervio ciático muestra una capacidad de regeneración que es equivalente en ratas y en primates subhumanos. Se trata de un modelo ampliamente utilizado para evaluar la función nerviosa tanto sensitiva como motora en un mismo tiempo.*

- 4.3. ESPECIE ANIMAL: **Rata.**
- 4.4. RAZA, CEPA (En ratones utilizar nomenclatura oficial: **Wistar Han**)
- 4.5. EDAD (o peso): **250 – 300 gr.** SEXO: **Machos**
- 4.6. N°ANIMALES (no intervalo): **20** N° Grupos: **1** N° Animales/Grupo: **10**
- 4.7. PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES: **Animalario de la Universidad de Valladolid.**
- 4.8. CRONOGRAMA:  
**1ª cirugía: 28/06/2010**  
**Última cirugía: 15/07/2010**
- 4.9. Restricciones o modificaciones de alimento, bebida o condiciones de alojamiento:  
*Alojamiento en jaulas individuales hasta recuperación quirúrgica, posteriormente se alojarán en cubetas tipo III con enriquecimiento ambiental, con agua y alimento ad libitum, en el Animalario de la Universidad de Valladolid. La única restricción es el alojamiento individual, que durará la fase postquirúrgica de 10 días. Si no hay inconvenientes durante esta fase, para satisfacer mejor sus necesidades etológicas, los animales se alojarán por parejas, observándose durante otros 5 días la no existencia de peleas entre ellos.*
- 4.10. Protocolos Anestesia, Analgesia, Administración de Sustancias, Extracción de fluidos (Vías, dosis, volúmenes, fármacos...):  
*Anestesia preoperatoria: Ketamina (75 mg/kg) más Xylacina (10 mg/kg), mezclado en una misma jeringuilla y con aguja hipodérmica de 23 G se administrará por vía intraperitoneal, en volúmenes siempre inferiores a 10ml/kg. (Imalgene® 1000 y Rompún®)*  
  
*Analgesia postoperatoria: Dalsy® (Ibuprofeno 20 mg/ml) a dosis de 10 ml por cada litro de agua de bebida (200 mg ibuprofeno/litro de agua de bebida).*

*Antibioterapia postoperatoria: Calimicina® LA (Oxitetraciclina) a dosis de 60 mg por cada kg de peso cada 72 horas, en inyección subcutánea interescapular, con tratamiento antibiótico durante una semana.*

## 5. FIN DEL PROCEDIMIENTO

### 5.1. CRITERIOS DE PUNTO FINAL :

- *Todos los procedimientos se llevarán a cabo bajo anestesia general según la técnica descrita previamente.*
- *Una vez realizada la primera cirugía y todavía con el animal anestesiado, se colocará un collar isabelino para evitar, en la medida de lo posible, procesos de autofagia por parte de los animales dada la pérdida de percepción sensitivo-motora de la extremidad intervenida (sección del nervio ciático).*
- *Durante el tiempo que se mantenga a los animales con vida se realizarán controles semanales en el Animalario de la Universidad de Valladolid, revisando:*
  - *Collar isabelino: si fuera demasiado grande, se lo podrían quitar; si fuera demasiado pequeño, podría producir heridas en el cuello de los animales. Se ajustará el tamaño del collar en cada momento según el crecimiento del animal, y en caso de que se produjeran heridas por roce, se realizarán curas secas con betadine y se retirará el collar, vigilando estrechamente los fenómenos de autofagia descritos.*
  - *Revisión de posibles úlceras por presión en la extremidad intervenida (parálisis flácida) y curas si fueran necesarias.*
  - *Búsqueda de signos que indiquen estrés o sufrimiento en los animales, tales como depósitos de porfirina alrededor de los ojos y nariz. En tales casos se aumentará la analgesia y se tratarán heridas y úlceras exhaustivamente.*
  - *Búsqueda y tratamiento de posibles efectos adversos de medicación.*
- **CINCO TIPOS DE PUNTO FINAL. Se sacrificará al animal:**
  - *Cuando el animal no va a proporcionar más información científica útil por estar muy afectado fisiológicamente.*
  - *Cuando el animal no va a proporcionar información científicamente útil por estar perturbado psicológicamente*

*(angustia extrema que afecte a su estado mental y por tanto a su estado metabólico).*

- *Cuando el sufrimiento causado a los animales durante el estudio es más alto de lo previsto y la relación coste beneficio se pierde.*
- *Cuando el nivel de sufrimiento sea excesivamente alto ("daño severo y angustia severa").*
- *Cuando un alto grado de sufrimiento pueda estar justificado, pero no haya necesidad de causarlo, porque pueda predecirse el punto final científico de modo previo, a un nivel pre-letal o de pre-dolor (punto final sustitutivo). Deben establecerse previamente los signos clínicos que nos indiquen el punto pre-letal para indicar un punto final humanitario.*

5.2. EL ANIMAL SE MANTENDRÁ CON VIDA: **3 meses.**

5.3. EL ANIMAL SE UTILIZARÁ EN OTRO PROCEDIMIENTO: **NO.**

5.4. EUTANASIA. MÉTODO. PRODUCTO. VÍA. DOSIS: *Inyección intracardíaca de Pentobarbital sódico (200 mg/kg) tras la extracción de la muestra de nervio ciático incluido el injerto, previa administración de anestesia intraperitoneal como la descrita previamente.*

6. PERSONAL RESPONSABLE DISEÑO EXPERIMENTAL

Nombre                      Apellidos                      Categoría según Anexo I Rd 1201/2005

A                      B                      **C**                      D

**Dr. Manuel José Gayoso Rodríguez**

7. PERSONAL RESPONSABLE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS MIEMBROS DEL EQUIPO INVESTIGADOR

Nombre                      Apellidos                      Categoría según Anexo I Rd 1201/2005

A                      **B**                      C                      D

**Dr. Manuel Garrosa García**

**Otros miembros:**

**Dr. D. Miguel Ángel Martín Ferrero**

**Dra. Dña. Belén García Medrano**

**Dra. Dña. Patricia Barrio Sanz**

8. *INSTALACIONES*

**ANIMALARIO UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. CEA: ES  
471860000033**

9. *NECESIDAD DE AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA DE LA  
AUTORIDAD COMPETENTE PARA REALIZAR EL PROCEDIMIENTO  
PROPUESTO:*

9.1. *Utilización de las especies: Rata, Ratón, Conejo, Cobayo, Hámster  
dorado, Codorniz, Primates no humanos, Perro o Gato que no hayan  
nacido o sido criados en centros oficialmente reconocidos.*

*No*

*Sí*            *Proveedor:*

9.2. *Utilización de especies diferentes a las anteriores que no procedan de  
un Centro de Cría o Suministro de Animales de Laboratorio.*

*No*

*Sí*            *Proveedor*

9.3. *Utilización de animales salvajes, capturados en la naturaleza, animales  
protegidos o en peligro de extinción*

*No*

*Sí*

9.4. *Ejecución total o parcial de los procedimientos fuera de los Centros  
Usuarios.*

*No*

*Sí*

9.5. *Liberación de los animales durante el procedimiento experimental:*

No

Sí

9.6. *Está contraindicado o es incompatible con el procedimiento experimental el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos destinados a eliminar el dolor, sufrimiento o angustia*

No

Sí

9.7. *Al finalizar el procedimiento con animales capturados en la naturaleza, está previsto devolverlos a su medio original.*

No

Sí

9.8. *Está previsto que el procedimiento provoque en el animal un dolor grave y prolongado*

No

Sí

9.9. *Está prevista la utilización de animales previamente sometidos a otro procedimiento experimental en el que han sufrido sufrimiento grave o prolongado.*

No

Sí

9.10. *Ejecución de procedimientos con fines docentes en centros de enseñanza no superior.*

No

Sí

*El investigador responsable DECLARA:*

1. *Que tiene los conocimientos que le competen sobre la legislación vigente en investigación animal.*
2. *Que es consciente de que no puede iniciarse el procedimiento hasta que se cumplan los requisitos que establece la Legislación Vigente:*
  - 2.1. *Informe Positivo del CEEBA sobre el procedimiento propuesto*
  - 2.2. *Notificación o Autorización de la Autoridad Competente, en los casos que señala la legislación vigente.*
3. *Que la notificación o autorización es por un espacio máximo de 3 años a partir del informe favorable emitido por el CEEBA o de la comunicación o autorización de la Autoridad Competente en caso de que fuera necesaria.*
4. *Que cualquier modificación relevante del procedimiento será necesario comunicarlo al CEEBA y a la Autoridad Competente. En los casos de procedimientos con Autorización Previa y Expresa será necesario solicitar una nueva Autorización. SE consideran modificaciones relevantes:*
  - 4.1. *Aumento del número de especies protegidas o aumento significativo del número de animales de especies no protegidas.*
  - 4.2. *Utilización de nuevas especies protegidas.*
  - 4.3. *Aumento del dolor o sufrimiento.*
  - 4.4. *Cambios de lugar de realización del procedimiento.*
  - 4.5. *Que se den nuevas circunstancias que requieran Autorización Previa.*
5. *Que el personal implicado en el procedimiento tienen los conocimientos necesarios según marca la legislación vigente, o están bajo supervisión directa de alguien que sí dispone de dichos conocimientos y titulación exigida.*
6. *Que las fechas aprobadas en los procedimientos no son vinculantes. La fecha de inicio quedará pendiente de la disponibilidad del Servicio del Animalario. Antes del inicio deberá coordinarse con el Animalario y fijar una fecha de inicio.*
7. *Que deberá llevarse un registro de las incidencias observadas con los animales.*

*Fecha y Firma del Investigador Responsable. (Dr. Martín Ferrero)*



Universidad de Valladolid

Animalario Uva

JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN  
DELEGACIÓN T. EN VALLADOLID  
SERVICIO DE GANADERÍA Y B.S.  
ENTRADA Nº 2011170007803  
27/06/2011 13:18:11

Conforme a lo dispuesto en el Anexo XII del Rcd 1201/2005 adjunto la Documentación para la Notificación de Procedimientos.

- 1.- Memoria descriptiva del procedimiento
- 2.- Informe del Comité Ético del centro.

Ruego si procede sea notificada la Resolución a:

Att. Sr. Director del Animalario  
Edificio Ciencias de la Salud  
C/Ramón y Cajal sn  
47005 VALLADOLID

Fdo. El investigador responsable

JEFA DE SERVICIO DE ORDENACIÓN Y ESTRUCTURA SANITARIA GANADERA  
DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA  
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA



Ángel José Álvarez Barrio  
C/Ramón y Cajal s/n.  
EDIF. CIENCIAS DE LA SALUD, 7ª  
47005 VALLADOLID.

Figura 2. 1 Permiso para la adquisición de animales de experimentación.  
Documento solicitado desde la Consejería de Agricultura y Ganadería.



INFORME

*D. Ángel José Álvarez Barcia, Secretario del Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid,*

*CERTIFICA: Que ha sido presentado para su evaluación por dicho Comité el siguiente Proyecto de Investigación/Docencia:*

*Título: USO DE FACTORES DE CRECIMIENTO (NEUREGULINAS) EN LAS LESIONES CRÍTICAS DEL NERVIJO PERIFÉRICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL*

*IP: Miguel Ángel Martín Ferrero*

*Dep/na: Cirugía y Traumatología*

Nº Reg: 50

*Y que una vez evaluado ha resuelto informar favorablemente la realización de dicho proyecto.*

*Lo que se firma a petición del Investigador Principal*

Valladolid, a 22/06/2011

Figura 2. 2 Certificado de la acreditación del veterinario de la Universidad de Valladolid. Documento cumplimentado por D. Ángel José Álvarez Barcia.

## **6.- DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se seleccionaron 20 ratas, machos de raza Wistar Han, ratas albinas de pesos comprendidos entre 290-385 g, en los que se descartó dificultad para la deambulaci3n o disimetría entre las patas.

Las diez primeras se convertirían en controles, en los que se practicó una secci3n del nervio ciático, con defecto residual crítico de 15 mm que se repararía en el mismo acto quirúrgico, mediante un injerto muscular acelular alogénico, extraído previamente de una rata Wistar sacrificada como donante, y tratado mediante un estricto protocolo bioquímico para su descelularizaci3n.

Las otras diez completaron todo el protocolo, ańadiendo al injerto de músculo acelular, el aporte local de factores de crecimiento tipo insulínico, dentro del injerto, sellando las suturas con fibrina.

Se evalúa su estado postoperatorio general y funcional durante 90 días; entonces, serán sacrificadas para analizar las consecuencias histológicas en el nervio ciático, y obtener las conclusiones correspondientes a todo el proceso de experimentaci3n.

## 7.- DISEÑO DEL DEFECTO NERVIOSO

Creamos un defecto crítico que calculamos en 15 mm aproximadamente en el nervio ciático e intentamos puentearlo con un injerto de músculo.

Las secciones del nervio ciático se realizarán en todos los casos en un punto situado a una distancia de 90 mm respecto de la punta del tercer dedo de la pata, a fin de asegurar en todos los animales una distancia equivalente para la regeneración axonal; a nivel distal, el defecto de 15 mm coincidirá unos mm antes de la bifurcación en sus dos ramas principales.



**Figura 2. 3 Diseño del defecto nervioso.**

Diseño del defecto nervioso. A) Detalle de la disección del nervio ciático de rata Wistar antes de su sección. Se visualiza el tronco del nervio. B) Imagen fotográfica de una del control número 4 mientras se completaba la disección hasta el alcanzar el nervio ciático de la extremidad derecha, previa a su sección.

## 8.- OBTENCIÓN DE INJERTOS MUSCULARES

A partir de dos ratas donantes, se obtienen los injertos musculares para todos los animales a estudiar posteriormente. Estos bloques musculares completarán el proceso de descelularización seleccionado previamente al inicio de la experimentación fundamental.

Se sacrificaron los dos especímenes según la pauta de finalización del proceso acordado de acuerdo a la Ley de Regularización del uso de animales de experimentación (Exposición en el apartado de "Sacrificio de los animales").

Por abordaje posterolateral, se expone el glúteo medio de ambas patas traseras de las dos ratas donantes. Éste acto quirúrgico permite la fácil extracción de los injertos y la práctica del abordaje del nervio ciático, para mejorar la técnica en el animal de experimentación y resolver dudas antes de repetir dicho abordaje en los animales que completarán el seguimiento.

Se extrajeron sendos bloques musculares de músculo glúteo medio de ambas extremidades. Especial detalle se prestó a la sección de los injertos siguiendo el eje longitudinal del músculo, para no interrumpir la estructura histológica de las fibras musculares.

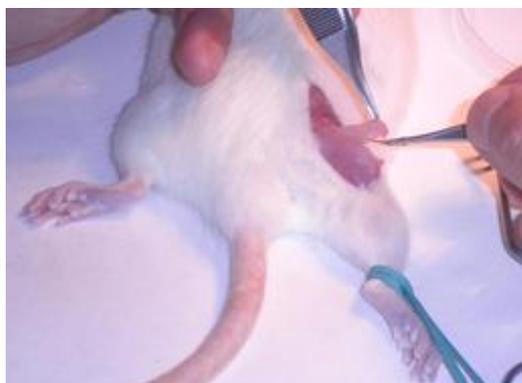


Figura 2. 4 **Obtención de injertos musculares.**

Imagen fotográfica de la extracción de injertos de músculo glúteo medio para su tratamiento de descelularización y posterior cobertura del defecto nervioso en el nervio ciático de las ratas.

## 9.- MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DESCELULARIZACIÓN

Se reservaron dos injertos para analizar el proceso de extracción celular seleccionado. La obtención de injertos acelulares precisó inicialmente la selección del protocolo de descelularización. Así, tras revisar la literatura y la experiencia previa del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Valladolid, decidimos seguir la pauta publicada por Baptista en 2009, en la Sociedad Inglesa de Medicina y Biología (*Baptista et al. 2009*).

Éste consiste en 7 h en agua destilada, que hay que cambiar tres veces cada 2-3 h; una noche, en un detergente de tritón y 24 h en desoxicolato; se lavan en un tampón y se repite todo el proceso; se pasan finalmente a otro tampón y se conservan a 4°C, una vez talladas las piezas:

- ❖ Tritón® X-100. #BDH-Prolabo, Briare. Francia.
- ❖ Desoxicolato sódico 5 g/l, Merck, Darmstadt, Alemania.
- ❖ Tampón fosfato 0.4M, pH 7.4 a 25°C. (Se prepara mezclando 10.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 56 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 1 l de  $\text{H}_2\text{O}$  y ajustando el pH a 7.4).

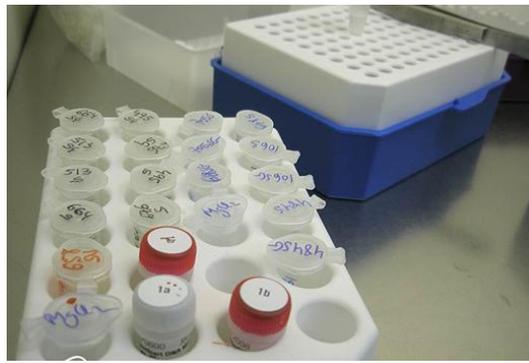


Figura 2. 5 **Método biológico para la descelularización.**

Tubos de ensayo con piezas musculares de futuros injertos acelulares, durante su proceso bioquímico de descelularización, en su segunda fase de tampón fosfato.

## **10.- CUIDADOS PERIOPERATORIOS**

### **ANESTESIA DE LOS ANIMALES**

Iniciamos el protocolo quirúrgico, practicando anestesia intraperitoneal preoperatoria, con ketamina (75 mg/kg) más xylacina (10 mg/kg), (Imalgene<sup>®</sup> 1000 y Rompún<sup>®</sup>), según el peso de cada animal.

Para realizar la punción, se emplea la sensibilidad de esta especie animal a la luz. Se sostiene la rata por la cola, elevándola fuera de la jaula y enfrentándola a un tubo abierto de polietileno transparente, introducido en un túnel oscuro. El animal, atraído por la oscuridad del túnel, se introduce en el cilindro. Se cierra el mismo. A través de las hendiduras del cilindro y sacándolo del túnel, se puede pinchar en el peritoneo de la rata, sin riesgo de mordedura. Si bien, por más seguridad, se emplea un guante protector. Este sistema permite que una sola persona pueda coger el animal y pincharlo sin riesgo.

Para infiltrar el anestésico, se emplea una aguja y una jeringa de insulina. La perfusión del anestésico ha de ser lenta.

Posteriormente, se deja tranquilo el animal, hasta que se observan signos de inducción anestésica. Se extrae la rata del cilindro de polietileno.

## **COLOCACIÓN DEL ANIMAL**

Una vez comprobado que el animal no presenta respuesta a estímulos táctiles ni nociceptivos, se procede a su colocación sobre la mesa quirúrgica sobre una plancha de corcho, en decúbito prono con las extremidades dorsales en semiflexión y abducción, postura en la que el nervio ciático se encuentra sin tensión y fácilmente accesible. Se fija el animal con gomas elásticas abrazando las extremidades, sobre una placa de corcho en posición de decúbito prono, con la pata a operar estirada, formando un ángulo de 45° respecto al eje longitudinal del cuerpo.

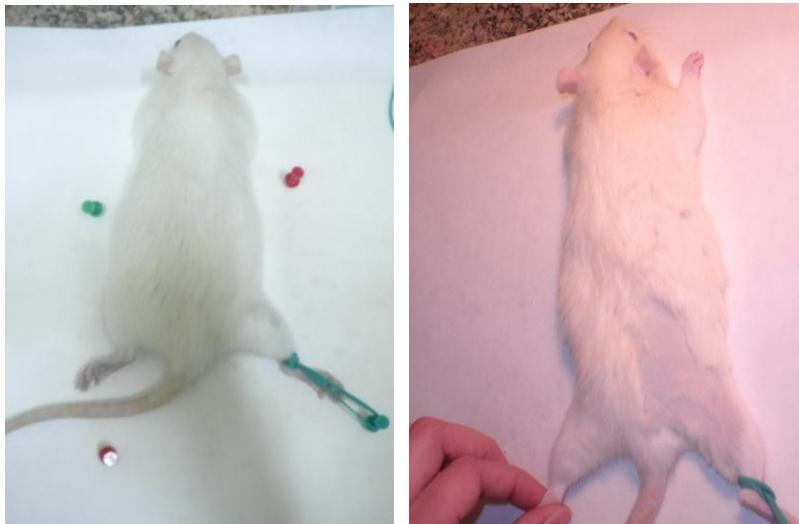


Figura 2. 6 **Colocación del animal.**

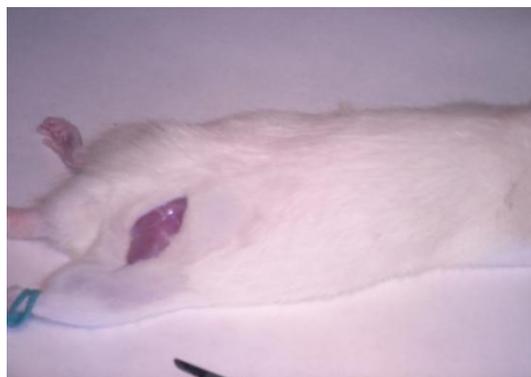
- A) Colocación de la rata en decúbito prono sobre la mesa tras ser anestesiada vía intraperitoneal. B) Rasuración de la extremidad seleccionada previa al abordaje póstero-lateral.

## **ASEPSIA**

Para establecer unas condiciones de asepsia mínimas del campo quirúrgico se procede a su rasurado que se realiza en seco en la región dorsal del miembro inferior, desde la línea media hasta más abajo de la articulación de la rodilla. Cranealmente, el límite se establece en la cresta ilíaca del mismo lado. A continuación se procede a la limpieza de la zona con un vaporizador de Clorhexidrina, Hibitane<sup>®</sup>. Por último se aseptiza el campo rasurado con Betadine<sup>®</sup>.

## 1 1.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Con el animal anestesiado y correctamente posicionado en la mesa, se inicia el procedimiento mediante abordaje póstero-lateral de cadera, con extensión del mismo hacia proximal y distal, parcialmente. Se incide la piel con bisturí en la parte dorsal de la pata trasera de la rata mediante una incisión de unos 3 cm que sigue la línea que se dibuja desde medio centímetro anterior de la raíz de la cola hasta la articulación fémorotibial. Este abordaje respeta la integridad de los paquetes musculares y vasculo-nerviosos, con lo que conseguimos evitar la aparición de hemorragias en el campo quirúrgico.



**Figura 2. 7 Abordaje quirúrgico.**

Abordaje póstero-lateral en la pata trasera de la rata, con extensión proximal hacia la línea media lumbosacra, para poder visualizar durante la disección, el tronco del nervio ciático en su recorrido hacia la extremidad.

Se diseca la piel y el tejido celular subcutáneo hasta llegar a la aponeurosis del plano muscular, sobre la que se aborda en la unión entre los músculos abductor cruris craneal y bíceps femoral, sin seccionar ninguno de ellos limitándose a disecarlos y alejarlos de la línea media con un separador automático. Conviene evitar la confusión

con la unión entre el bíceps y semitendinoso, pu nto por el que también es posible llegar al nervio pero con un abordaje técnicamente más exigente y sangrante al existir mayor cantidad de vasos que discurren por esta región.

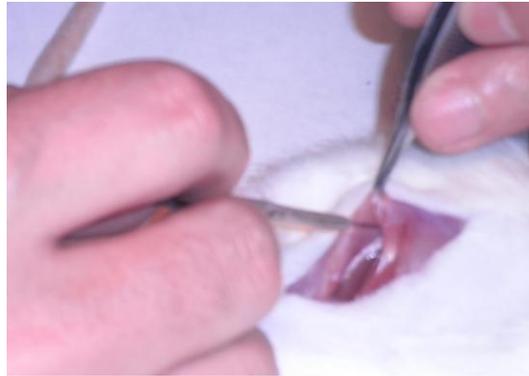


Figura 2. 8 **Procedimiento quirúrgico.**

Dissección de la musculatura de la raíz de la extremidad para exposición del tronco ciático.

De esta manera se alcanza el nervio ciático. Hasta aquí la técnica quirúrgica se ha realizado con gafas lupa de 3 aumentos. A partir de este momento se utilizará el microscopio quirúrgico para conseguir una disección lo más precisa y menos traumática posible del nervio y tejidos adyacentes.

El nervio ciático se expone desde su salida por debajo del músculo piramidal hasta un nivel lo más distal posible para visualizar siempre la bifurcación en sus ramas terminales, tibial y peronea. En esta fase aún no hemos actuado sobre el nervio directamente. Se procede ahora a la disección roma del nervio ciático separándolo de las estructuras circundantes a las que se une por un tejido conjuntivo laxo, hasta que este queda totalmente liberado y expuesto.

A continuación se procede a la sección del nervio, para lo cual se realizan dos cortes limpios para evitar la aparición de cabos insatisfechos, exactamente bajo el músculo piramidal y en el extremo opuesto antes de su bifurcación.

Se genera un defecto de 15 mm, colocando a modo de puente, el bloque muscular acelular con dos puntos de Prolene 7/0 en cada extremo del mismo, a nivel de epineuro-epimisio.

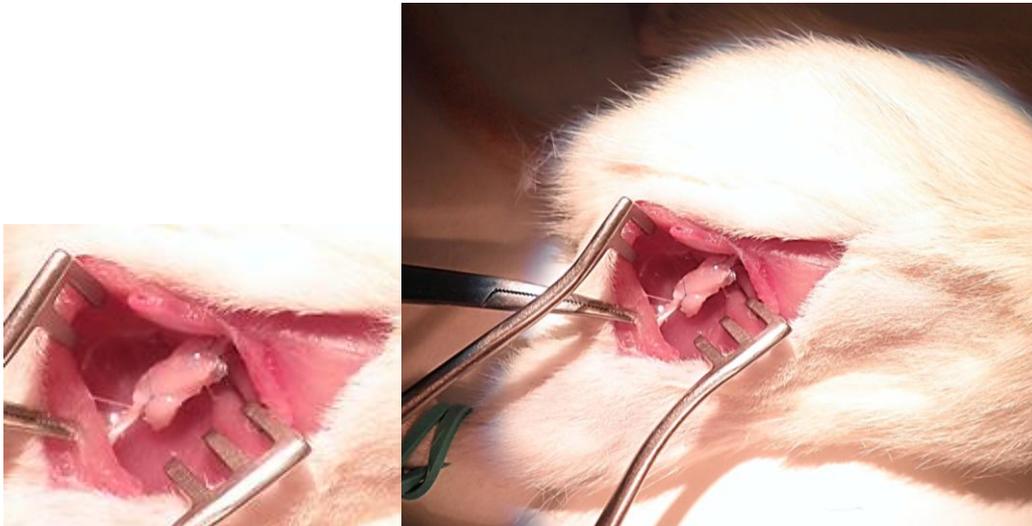


Figura 2. 9 **Sutura del injerto.**

A) Detalle de la sutura del injerto de músculo acelular en el defecto del nervio ciático, con puntos de Prolene 7/0. B) Imagen fotográfica de dicha sutura, ampliando campo para visualizar su localización en el animal.

Se cierra la herida por planos, con sutura reabsorbible en piel. Se aplica povidona yodada sobre la sutura. Así finaliza el procedimiento quirúrgico de los 10 animales del grupo control.

### **Grupo de casos**

En el segundo grupo de 10 ratas, antes del cierre de la herida quirúrgica, se inyectan 2 cc de Increlex<sup>®</sup> (10 mg/ml de mecasemina, en solución inyectable), dentro del injerto muscular ya suturado, aportando factores promotores de la regeneración tipo IGF-1. Se sellan las suturas con fibrina (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter, Valencia, España).

Se cierra la herida igualmente por planos, con sutura reabsorbible en piel y se cura la herida con povidona yodada (Betadine<sup>®</sup>).

## 12.- CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Las ratas se despiertan de la anestesia a los 20 min de finalizar la cirugía, ya introducidas en su jaula definitiva, junto a otra rata en las mismas circunstancias, debido a sus características de animal gregáreo.

Portan al despertar un collarete isabelino para evitar la autofagia de la extremidad.



Figura 2. 10 **Cuidados postoperatorios.**

Animal de experimentación durante una de sus curas de los primeros días postoperatorios. Se recambia collarete por apertura, rotura o lesión de partes blandas; se pincha la segunda dosis del antibiótico; y se curan las heridas. Cuando precisaron cambio de collarete, los animales recibieron anestesia inhalatoria con éter por la agresividad de dichos animales en las primera horas.

Se administraron antibióticos: calimicina<sup>®</sup> LA (Oxitetraciclina) a dosis de 60 mg por cada kg de peso a repetir a las 72 h, en inyección subcutánea interescapular, según pauta veterinaria. Y analgesia: ibuprofeno 20 mg/ml (Dalsy<sup>®</sup>, Abbott, Madrid) a dosis de 10 ml por cada litro de agua de bebida (200 mg ibuprofeno/litro de agua de bebida).

Las curas de la herida quirúrgica fueron vigiladas hasta el cierre de las mismas.

Todas las jaulas son marcadas con un cartel distintivo con el número de jaula, número de animal, nombre del investigador principal y fecha de la cirugía.

DEPARTAMENTO: HISTOLOGIA  
JAULA N°: BELEN-1  
IP: \_\_\_\_\_ USUARIO: Belén G. Medrano  
TNO: 3078 ESPECIE: Rata CEPA: \_\_\_\_\_  
N°: 1 FECHA NAC: \_\_\_\_\_  
Animalario  
PROCEDIMIENTO REALIZADO: Injerto en N. Ciego  
FECHA DE ENTRADA: 12-7-11 FECHA DE SALIDA PREVISTA: \_\_\_\_\_  
OBSERVACIONES: Biberón con Ibuprofeno  
FICHA DE IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES EXPERIMENTALES

Figura 2. 11 **Marcaje de las jaulas.**

Letrero identificador de cada una de las jaulas con el nombre del propietario de los animales, número de animales, fecha de la cirugía.

## 13.- MÉTODO DE ESTUDIO FUNCIONAL

Las ratas son pesadas y filmadas cada dos semanas para grabar los progresos en la deambulaci3n. La recuperaci3n de la funci3n motora se analiza mediante el patr3n de marcha.

### **Índice Funcional Ciático**

El Índice Funcional Ciático (SFI) es un parámetro útil para evaluar el progreso durante la deambulaci3n: empleamos un t3nel de madera para que fuese recorrido por cada rata, dejando marcada su huella en un papel de 0.15 mm de grosor, tras pasar por un filtro de tinta.



Figura 2. 12 **Métodología de la prueba del SFI.**

A) Estructura de madera y cart3n para el análisis de la huella plantar de la rata. T3nel construido con apertura superior que permite el seguimiento del animal, y final del camino oscuro para la atracci3n de la rata por su sensibilidad a la luz. Al iniciar el trayecto, el animal pasa por un filtro de tinta que tiñe sus huellas y permite el tatuaje de sus pasos en el papel absorbente que cubre el t3nel hacia el final oscuro. B) Rata marcando sus huellas en el papel del t3nel, tras atravesar el filtro de tinta, avanzando hacia el fondo oscuro, y observada desde la parte superior.

Los valores conseguidos a partir de las huellas se aplicaron en la fórmula propuesta por Bain (*Bain et al., 1989*); los resultados conseguidos expresan la pérdida funcional en términos de porcentaje: el valor 0 es el que representa la función normal o ausencia de disfunción, y el valor -100 es el que representa la pérdida total de la función.

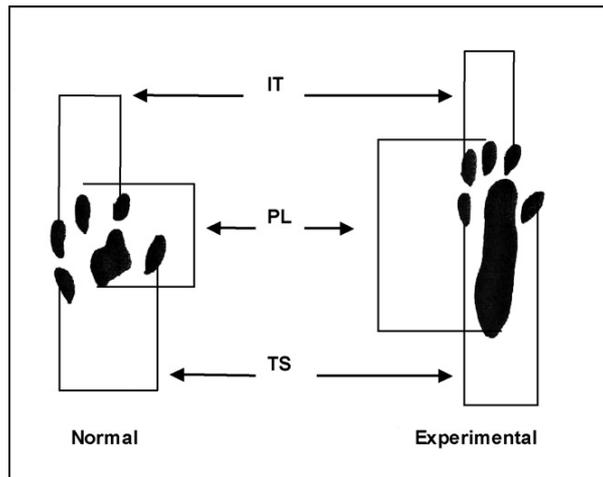


Figura 2. 13 **Prueba del Índice Funcional Ciático.**

Registro de las huellas plantares de uno de los animales, rescatado del túnel tras ser atravesado por una de las ratas con sus patas manchadas en tinta. Permite analizar el Índice Funcional Ciático.

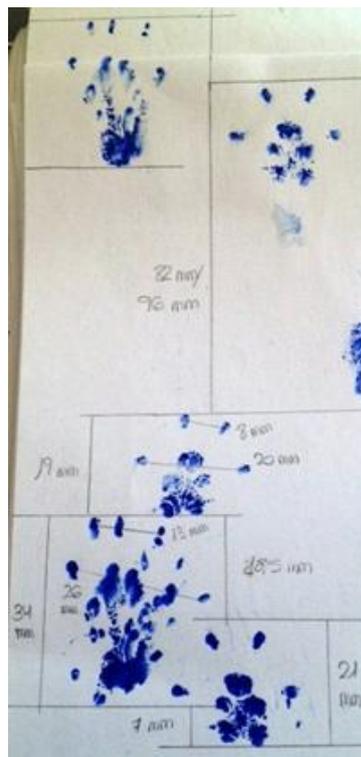
*De Medinaceli et al. en 1982*, describieron las siguientes distancias de las patas experimental (E) y normal (N): distancia de la pisada (PL) –entre la extremidad del tercer dedo y el calcáneo–; anchura de la pisada (TS) –entre el primer y el quinto dedo–, y la anchura intermedia de la pisada (ITS) –entre el segundo y el cuarto dedo–, para describir el SFI según la fórmula:

$$SFI = -38,3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109,5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13,3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8,8$$



**Figura 2. 14 Esquema de las mediciones del SFI.**

Comparación del esquema de la huella plantar de una extremidad del animal de experimentación sano y otra tras la sección del nervio ciático. Se observan las mediciones a tener en cuenta para analizar el Índice Funcional Ciático: experimental (E) y normal (N): distancia de la pisada (PL) –entre la extremidad del tercer dedo y el calcáneo–; anchura de la pisada (TS) –entre el primer y el quinto dedo–, y la anchura intermedia de la pisada (ITS) –entre el segundo y el cuarto dedo–.



**Figura 2. 15 Estudio de la huella plantar.**

Cálculo del SFI según la fórmula de Bain et al., 1989 (Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 129-38.). Se calculan la distancia de la pisada (PL) –entre la extremidad del tercer dedo y el calcáneo–; anchura de la pisada (TS) –entre el primer y el quinto dedo–, y la anchura intermedia de la pisada (ITS) –entre el segundo y el cuarto dedo–.

El “Grasping Test” consiste en elevar la rata desde el rabo, permitiendo que se agarre con las patas delanteras a la rejilla; podrán hacerlo si controlan la motilidad de las patas traseras. Se acepta como válido la pinza con cuatro dedos y el codo en extensión. Además, nos permite visualizar si le falta algún dedo en la pata operada y si es capaz de estirarlos (*Bertelli & Mira, 1995; Tos et al., 2009*). Constituye una prueba eficaz para la evaluación cuantitativa de la recuperación de la función motora (*Papalia et al., 2003*).



Figura 2. 16 “Grasping Test”.

A) Dos secuencias del proceso del “Grasping Test” desarrollado por uno de los animales, en el que analizar su capacidad de agarrarse a la rejilla. B) Elevación de la rata desde la cola, para observar la existencia de lesiones en el extremo de la pata y para describir su capacidad de separar y estirar los dedos de la pata operada.

Para el estudio funcional, también se completó, posterior al sacrificio y tallaje de las piezas, durante la lectura de los cortes microscópicos, el conteo de los axones mielinizados, valorando la media de las preparaciones según la localización del corte y la opción terapéutica elegida para cada animal.

## 14.- CRONOLOGÍA

Para establecer el tiempo de duración del experimento en orden a obtener regeneración nerviosa, se ha decidido emplear 12 semanas para valorar el progresivo crecimiento de fibras, teniendo en cuenta, según estudios previos de diversos autores, (*Ishida et al, 2004; Kuroki and Ikuta, 1995; Mackinnon et al, 2013*), que antes de este tiempo la regeneración es mínima.

## 15.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Las ratas fueron sacrificadas a los 90-100 días postquirúrgicos, con pesos que rondaban los 450-500 g de media.

Para el sacrificio, recibieron una inyección intracardíaca de pentobarbital sódico (200 mg/kg), tras ser anestesiadas igual que en el procedimiento quirúrgico de la cirugía inicial. A continuación se procedió a la toracotomía de los animales para descubrir el corazón. Con el fin de evitar la coagulación sanguínea se inyectó intra-ventricularmente 1 ml de heparina sódica (1% p/v).

Posteriormente se realizó una incisión en la cavidad ventricular izquierda a través de la cual se introdujo una cánula hasta la embocadura de la arteria aorta (perfusión vía aorta ascendente). A continuación se procedió durante unos minutos, al lavado con suero salino (CINa 9%) del sistema cardiovascular para eliminar los elementos sanguíneos tras seccionar la aurícula derecha y facilitar así la posterior circulación del líquido fijador, evitando siempre la interrupción en el flujo de perfusión.



Figura 2. 17 **Sacrificio de los animales.**

Tras la inducción anestésico, se realiza una toracotomía para perfundir al animal vía intracardíaca, con pentobarbital sódico, para su sacrificio.

Tras el lavado vascular y vía aorta ascendente, se procedió a dar paso a 500 ml de una solución fijadora, durante 40 minutos aproximadamente. La mezcla aldehídica fijadora estaba compuesta por 4% (p/v) de paraformaldehido, 0.1% de glutaraldehído en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4), (*Karnovsky MJ, 1965*), con el fin de compatibilizar una óptima preservación morfológica con la conservación de las propiedades antigénicas, químicas y/o funcionales de las moléculas a detectar.

La solución Karnovsky consta de:

solución A: Tampón cacodilato 0.2M.

solución B: paraformaldehído 10 % (p/v).

## 16.- EXTRACCIÓN Y TALLAJE DE LAS PIEZAS

Se repitió el abordaje de la cirugía, disecando el segmento de nervio ciático que incluía el injerto muscular, realizándose en un segundo tiempo una postfijación de las muestras durante 4 h a 40°C, para evitar la retracción celular, en una solución de paraformaldehído (4% p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH= 7.4).



Figura 2. 18 **Extracción de las piezas.**

Tras el sacrificio y fijación del animal, se repite el abordaje inicial para la extracción de la pieza histológica que incluya el cabo proximal, injerto y cabo distal del nervio ciático intervenido.

Para completar este estudio, las piezas explantadas se tallaron. La disección se completó con la mayor precaución posible, para no interrumpir las conexiones del injerto con los tejidos adyacentes.



Figura 2. 19 **Tallaje de las piezas.**

Las piezas que se explantan hay que diseccionarlas con detalle para separarlas de los tejidos adyacentes, evitando superar los límites del injerto inicial, muchas veces difícil de distinguir macroscópicamente.

Y se cortaron en siete fragmentos, todos diferentes entre ellos en sección de corte y tamaño, pero iguales en todas las piezas, dedicando las pares a inclusión en resina (tinción con azul de toluidina) y los impares para inclusión en parafina y tinción de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

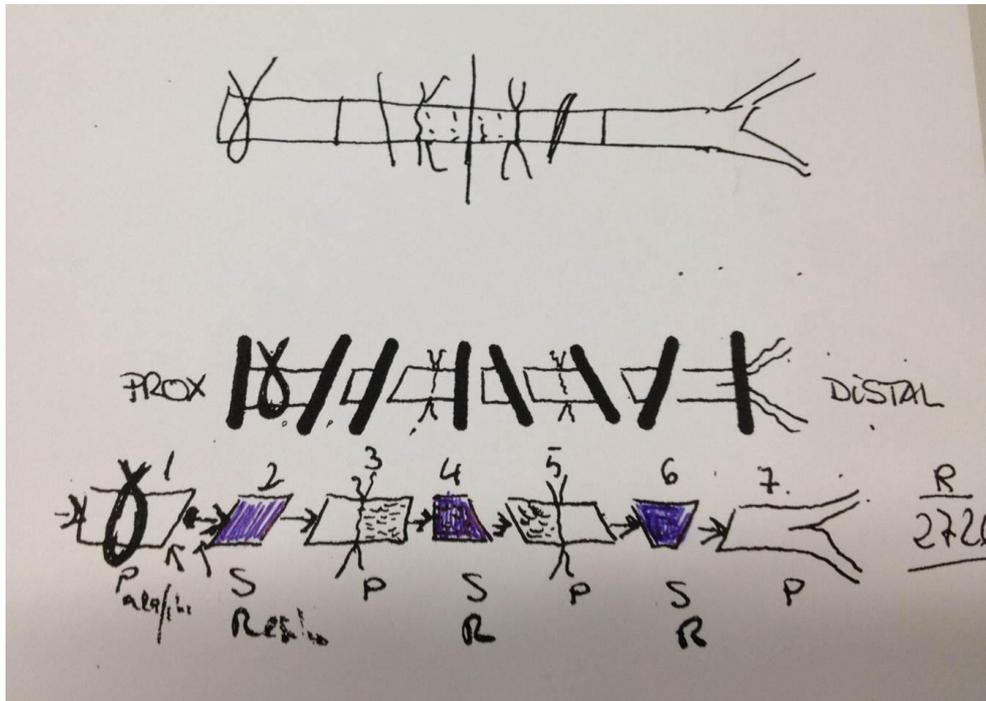


Figura 2. 20 **Esquema de las secciones de cada pieza.**

Esquema del protocolo de tallaje de cada pieza histológica. El lazo a la izquierda significa el Vicryl® anudado para marcar el cabo proximal tras diseccionar la pieza. Los hilos en medio de la pieza son las suturas proximales y distales del injerto, dejando a los lados los cabos del nervio ciático. División en 7 segmentos, todos ellos diferentes entre sí para poder reconocerlos. Los impares de mayor tamaño se destinan a la inclusión en parafina y los más pequeños, para cortes semifinos e inclusión en resina.



**Figura 2. 21 Pieza ya tallada.**

Ejemplo de pieza ya tallada en los 7 segmentos para inclusión posterior, corte y estudio histológico. El Vicryl<sup>®</sup> marca el cabo proximal. Se observan las suturas de Prolene<sup>®</sup>, que marcan los límites del injerto.

## 17.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE NERVIJO CIÁTICO. ESTUDIO HISTOLÓGICO A MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL Y ELECTRÓNICO

El análisis morfológico es el método más común para el estudio de la regeneración del nervio periférico (*Castro et al., 2008; Vleggeert-Lankamp CL, 2007*). De hecho, aunque en la evaluación funcional la perspectiva clínica es el elemento clave para la valoración del sistema nervioso, la investigación de la morfología del nervio nos puede dar información importante sobre diversos aspectos de los procesos de regeneración (*Hall S, 2005; Geuna et al., 2009*) que se relaciona con la función nerviosa (*Kanaya et al., 1996*).

### MICROSCOPIA DE LUZ

#### **1.- Procedimientos de fijación**

Aunque pueden ser utilizados los diferentes tipos de fijadores para la histología del nervio periférico, incluyendo el fijador de Carnoy y la fijación de líquido de Bouin, se utiliza paraformaldehído al 4% (Fluka, Buchs, Suiza) en PBS (tampón fosfato salino) durante 24 horas a 4°C.

❖ *Paraformaldehído tamponado:*

Está compuesto de 4% (p/v) paraformaldehído despolimerizado tamponado a pH 7.4. Para 1 l de solución, se mezclan 40 g de paraformaldehído con unos 400 ml de H<sub>2</sub>Odd, calentándolo hasta 60°C. Se añade 1 ml de NaOH 1 N. La mezcla se vuelve transparente una vez polimerizado el paraformaldehído. Se enfría rápidamente y se filtra. Se añaden 250 ml de tampón fosfato 0.4 M, pH 7.4 y ajustamos el volumen hasta 1 l con H<sub>2</sub>Odd.

❖ *Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 a 25°C:*

Para obtener 1 l, se mezclan los siguientes componentes: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH a 7.4 a 25°C con NaOH 1 N y el volumen a 1 l con H<sub>2</sub>Odd.

Esta fijación se sigue de un lavado en 0,2% de glicina en PBS. Para obtener una buena calidad histológica, no se requiere perfusión y es suficiente para fijar las piezas nerviosas, su inmersión en la solución de fijación. Durante los primeros segundos de la fijación, el segmento de nervio tiene que ser mantenido recto en una pequeña gota de fijador con el fin de facilitar la orientación de la pieza y su corte.

## **2.- Procedimientos de inclusión**

Los dos procedimientos más comunes de inclusión para microscopía de luz son parafina o resina. Las dos técnicas tienen ventajas y desventajas, y que pueden ser, alternativamente, elegidos en función del tipo de análisis que se debe hacer. La inclusión en parafina proporciona un soporte fuerte para el tejido y, en general, garantiza una mejor histología en comparación con la crio-incrustación. Pero la principal limitación de parafina es que los sitios antigénicos están menos expuestos reduciendo la eficiencia de un análisis inmunohistoquímico; por otra parte, el riesgo de autofluorescencia del tejido es mayor. Para superar la limitación de este último, antes de la inmunomarcación, las secciones se pueden procesar con los métodos que facilitan la

unión antígeno-anticuerpo, incluyendo: (a) tres ciclos de microondas de 5 min en una solución de EDTA (100 mM), (b) incubación en NH<sub>4</sub>Cl para 10 min.

Nosotros hemos elegido la inclusión en parafina para el estudio de nuestras muestras impares y resina para las pares.

❖ *Protocolo de inclusión en parafina:*

Las muestras se someten a un procedimiento de deshidratación en etanol de gradación creciente (del 50% al 100%). La deshidratación se sigue por un paso de diafanización en xilol. Las muestras se mantienen a continuación en parafina líquida (Parafina tipo 6. #8336E Richard-Allan Scientific, Kalamazoo MI, EEUU) a 62 °C durante la noche y, a continuación, pasan a un segundo pasaje en parafina líquida a 62 °C antes de la polimerización a temperatura ambiente. Las secciones nerviosas se cortan por lo general en un rango de espesor de 5 µm. Antes de la tinción, los portaobjetos necesitan ser desparafinados.

❖ *Protocolo de inclusión en resina:*

Los segmentos pares se procesaron para la obtención de cortes semifinos. Con ese objetivo, necesitaron una fijación en resinas (Resina Spurr. #S024/D TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Reino Unido). Los pasos que se siguen son fijación de las muestras, por inmersión o perfusión, deshidratación, líquido intermediario, infiltración y polimerización en el medio de inclusión.

El procedimiento estándar de inclusión en resinas es similar al descrito para la parafina con algunas modificaciones. Las soluciones fijadoras suelen contener glutaraldehído y es necesaria una postfijación posterior en tetróxido de osmio. Las resinas más comúnmente usadas para la inclusión no son hidrosolubles, por lo que tenemos que sustituir el agua del tejido por un solvente orgánico que sea miscible con la resina. Para ello se deshidrata el tejido mediante incubaciones sucesivas en gradaciones crecientes de etanol o acetona, esta última es frecuentemente usada. Como líquido intermediario entre la acetona pura o etanol de 100° y las resinas, se suele utilizar el óxido de propileno. El endurecimiento del medio de inclusión no es por enfriamiento

sino por polimerización, normalmente a 60 °C, como la resinas tipo epoxy, que son las más utilizadas, porque son las que aportan una mayor homogeneidad en la polimerización y más facilidad a la hora de obtener secciones regulares.

### 3.- Procedimientos de tinción

#### ❖ *Tinción de hematoxilina y eosina:*

La hematoxilina y eosina es la tinción más utilizada para la observación de la histología e histopatología en el microscopio de luz. La hematoxilina tiñe los núcleos en azul mientras que la eosina es detectable como una mancha rosada en el citoplasma celular.

Los portaobjetos se sumergen en hematoxilina al 0.1% durante 10 min; se lavan en agua corriente durante 15 min, para luego sumergirlos en eosina al 0,1% durante 5 min; por último, se lavan en agua destilada. Las secciones son finalmente deshidratadas en etanol y se montan en DPX. Aunque muy popular, se debe enfatizar que la hematoxilina y eosina no es un método adecuado para la tinción de tejido nervioso debido a que las vainas de mielina no se tiñen y son por lo tanto, difíciles de detectarse.

#### ❖ *Tinción de tricrómico de Masson:*

La calidad de la histología de las secciones nerviosas teñidas con tricrómico de Masson es mayor en comparación con la hematoxilina y eosina porque pone de manifiesto también el tejido conectivo. Sin embargo, a menos que se complete la postfijación con tetróxido de osmio, las vainas de mielina no se tiñen con este método tampoco.

Para la tinción de tricrómico de Masson, en nuestro laboratorio usamos Amasone tricrómico con azul anilina. Sin lavado, los portaobjetos se drenan y se incuban con diez gotas de solución de ácido pícrico alcohólica durante 4 min. Después

de lavar en agua destilada, las secciones se tiñen con diez gotas de ácido fucsina durante 4 min y se lavan de nuevo en agua destilada. Más adelante, se añaden diez gotas de la solución de ácido fosfomolibdico a la sección de 10 min. Sin lavado, las diapositivas se drenan y 10 gotas de azul de anilina se añaden a la sección durante 5 min. Finalmente, después de un lavado en agua destilada, se procede a la rápida deshidratación con etanol. Los portaobjetos se montan en DPX.

❖ *Tinción de azul de toluidina de secciones de escaso calibre e inclusión en resina*

La mejor calidad para el análisis de los nervios de la microscopía de luz se puede obtener después de la inclusión de resina y tinción con azul de toluidina. Con este procedimiento, la mayoría de los axones mielinizados pueden ser claramente identificados y se delimitan las vainas de mielina debido a la tinción de lípidos con tetróxido de osmio. Las secciones delgadas de las muestras nerviosas se cortan por lo general en un rango de espesor de 1  $\mu\text{m}$  con el ultramicrotomo y se tiñen con azul de toluidina (al 1% en solución de tetraborato sódico al 1%) de 30 a 45 s.

## **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

### **1.- Procedimientos de fijación**

Fijamos las piezas nerviosas por inmersión de 24 horas en fijador de Palay a 4°C. Previamente, se purifican en tampón fosfato de Sörensen 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, en agitación moderada y a temperatura ambiente. Estos bloques de tejido se incluyen en resina Spurr (#S024/D TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Reino Unido). Durante los primeros segundos de la fijación, el segmento de nervio tiene que ser mantenido recto en una pequeña gota de fijador con el fin de facilitar la orientación de la muestra y su corte.

❖ *Fijador de Palay para microscopía electrónica:*

Está compuesto por 1% (p/v) paraformaldehído y 1% (p/v) glutaraldehído tamponados a pH 7.4. Para 1 l de solución, se mezclan 40 g de paraformaldehído con unos 400-450 ml de H<sub>2</sub>O, calentando hasta 60°C. Se añade 1 ml de NaOH 1N. La mezcla se vuelve trasparente una vez despolimerizado el paraformaldehído. Se enfría rápidamente y se filtra. Se añaden 4 ml de CaCl<sub>2</sub> al 0.5% y 40 ml de glutaraldehído al 25%. Añadimos 250 ml de tampón fosfato 0.4 M, pH 7.4 y ajustamos el volumen hasta 1 l con H<sub>2</sub>O destilada.

❖ *Tampón fosfato Sörensen:*

Se hace con 56 g de 3-hidrato di-hidrógeno fosfato de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O) y 10,6 g de 1-hidrato di-hidrógeno de fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O) en 1 l de agua destilada.

Justo antes de la inclusión, los nervios se lavan durante pocos minutos en la solución de almacenamiento y luego se sumergen durante 2 h en tetróxido de osmio OsO<sub>4</sub> al 1% en la misma solución tampón, en agitación continua y a temperatura ambiente.

## **2.- Procedimientos de inclusión**

Los especímenes son cuidadosamente deshidratados en pasos en etanol del 30% al 100% con al menos cinco pasos de 5 min cada uno. Después de dos pasajes de 7 minutos cada uno en óxido de propileno y 2 h en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resinas Spurr, las muestras se incluyen en la mezcla de resinas. Para el paso final, se añade un plastificante a la resina con el fin de promover la polimerización de la mezcla de inclusión, durante 12 horas a 60°C.

### 3.- Corte y tinción

En nuestro laboratorio, las secciones finas de piezas nerviosas se cortan por lo general en un rango de espesor de 50-70 nm con el ultramicrotomo. Las secciones se recogen y se colocan en rejillas de cobre electrolítico de 3 mm de diámetro y 200-300 mallas, sin ningún recubrimiento de soporte.

Para microscopio electrónico de transmisión, las redes se tiñen con acetato de uranilo durante 30 minutos y una solución de citrato de plomo durante 5 minutos. Para finalizar, se lavaron las rejillas 10 veces en H<sub>2</sub>Odd y se dejaron secar sobre un papel secante.

La solución de citrato de plomo se confecciona disolviendo 1.33 g de nitrato de plomo en 30 ml de H<sub>2</sub>Odd utilizando el sonicador. Se añaden luego 1.76 g de tri-sodio citrato dihidrato y se mantienen en el baño del sonicador hasta su completa disolución. Se añaden 8 ml de NaOH 1 N agitando suavemente. La solución debe ser completamente transparente. Se completa el volumen hasta 50 ml con H<sub>2</sub>Odd.

En el nervio, el análisis de microscopía electrónica de transmisión permite investigar diversas características ultraestructurales, incluyendo la organización de mielina y los axones mielinizados.

Para procesamiento en microscopio electrónico se seleccionaron sólo muestras específicas, de las que se querían obtener más detalles morfológicos e histológicos.

## 18.- CONTAJE DE AXONES

El número de axones es equivalente al número de fibras nerviosas. No se valoraron éstas directamente ante la imposibilidad de segmentarlas de forma individual por el contacto íntimo entre la mayoría de ellas. Con todas las funciones descritas se elaboró un "macro" o conjunto de funciones preprogramadas.

Como la mayoría de los autores, realizamos mediciones sólo en las secciones de cada nervio, que seleccionamos porque a priori pueden ofrecer más información. Así, se escogen los segmentos 2 (cabo proximal), 4 (injerto) y 6 (cabo distal); coinciden con las tres secciones de cortes semifinos e inclusión en resina para tinción en azul de toluidina.

Se valoró un mínimo de 100.000 g cuadradas de nervio ciático por sección, mediante el estudio de sucesivas imágenes. El proceso de análisis de imagen se completó con el cálculo del número de fibras nerviosas por 100 ii cuadradas de nervio ciático, de la siguiente manera:

- Se realizó una foto de 5x con el microscopio de luz, para calcular la superficie de nervio de cada sección y animal, con la ayuda del programa para Windows Image<sup>®</sup>, y el programa para AutoCAD 3D<sup>®</sup> para Macintosh.
- Luego, se rastreó cada preparación con el aumento de 100, captando fotos sucesivas de cada una de las regiones de la sección nerviosa en concreto.
- Se seleccionaron de éstas, diez imágenes al azar.
- Se cuantificaron los axones de esas diez imágenes.
- Se calculó el cómputo total de axones y la densidad de los mismos, extrapolando la suma de los axones contados en los diez campos, con el número de campos por 100 aumentos de esa preparación, al haberla medido previamente en 5 aumentos.

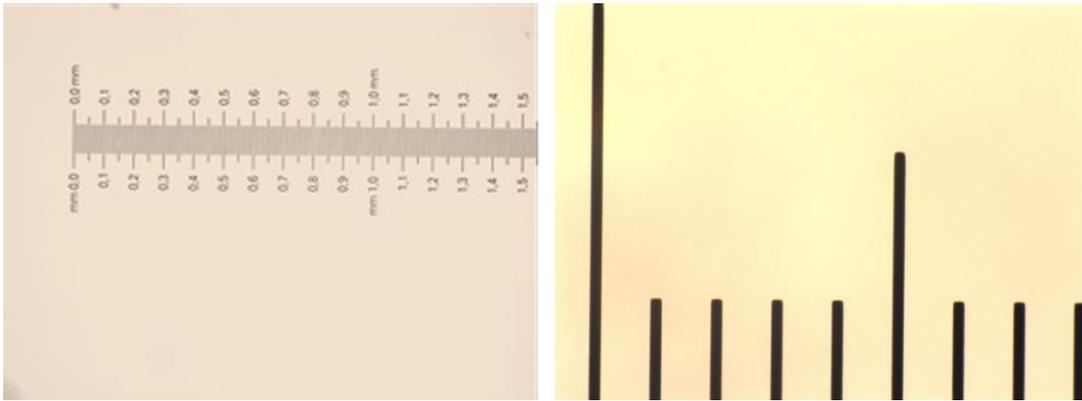


Figura 2. 22 **Reglas métricas para imágenes microscópicas 5x y 100x.** Reglas 5x y 100x para microscopía de luz convencional. Empleadas para la medición de las preparaciones de las dimensiones correspondientes, en el proceso de conteaje de axones.

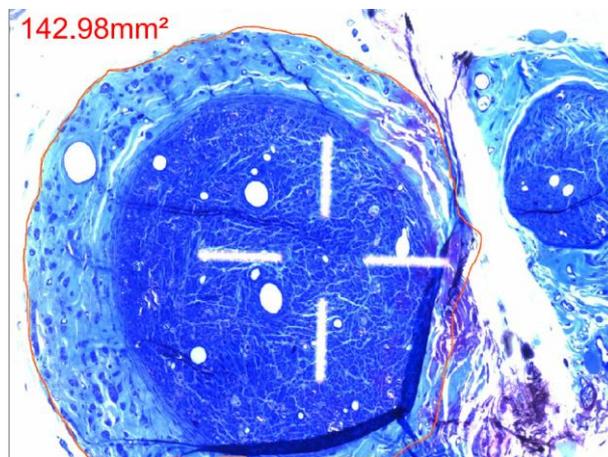


Figura 2. 23 **Medición 5x.**

Con el programa AutoCAD 3D<sup>®</sup> para Macintosh, se realiza la medición del área del nervio en cada sección 5x. A partir del área, sabemos cuántos campos 100x tendremos. Si calculamos la media de 10 campos al azar, podremos deducir el número total de axones. Con esos dos resultados, calculamos la densidad axonal.

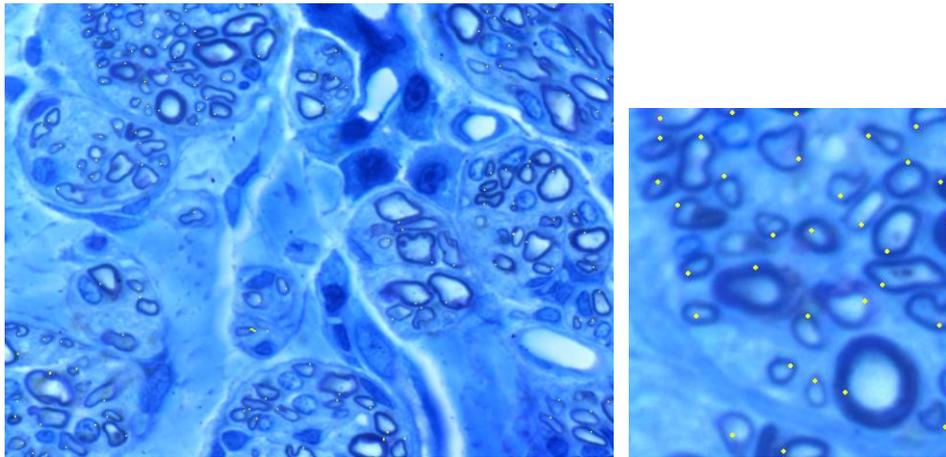


Figura 2. 24 **Contaje axonal.**

Contaje manual de los axones presentes en 10 campos 100x de cada sección para extrapolar los resultados y obtener, con el área de sección 5x, el número total de axones.

## 19.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas en cada uno de los grupos de estudio se presentan con la media y la desviación típica en el caso de seguir una distribución normal y con la mediana y la amplitud intercuartil en aquellos casos en los cuales la distribución no se ajusta a la normalidad.

Las variables cualitativas se presentan según su distribución de frecuencias. Mediante el test Chi-cuadrado de Pearson, se ha analizado la asociación de las variables cualitativas. En el caso de que el número de celdas con valores esperados menores de 5 sea mayor de un 20%, se utilizará el test exacto de Fisher o el test Razón de verosimilitud para variables con más de dos categorías.

Las comparaciones de los valores cuantitativos se ha realizado mediante la prueba T de Student o la prueba no paramétrica U de Mann Whitney según el caso.

Los datos han sido analizados con el programa estadístico SPSS versión 20.0 para Windows. Aquellos valores de  $p < 0,05$  han sido considerados estadísticamente significativos.

El método científico estadístico hace posible el valorar y medir aquello que aparentemente no tiene medida, la variabilidad biológica, ya que no basta con la descripción cualitativa de unas observaciones.

En Medicina como en cualquier otra rama de la Ciencia no se concibe que se puedan llevar a cabo investigaciones cuyos resultados no puedan ser expresados en forma numérica, precisándose datos concretos. No obstante, infinidad de veces las variables que se tienen que analizar en la práctica de la investigación son esencialmente de tipo cualitativo. El test más comúnmente utilizado para este tipo de análisis es el test de Chi-Cuadrado.

En algunos casos las variables cualitativas presentan una especie de ordenación, variables ordinales, que permiten el poder asignarle una serie de valores cuantitativos arbitrarios. El investigador siempre tiende hacia este tipo de ordenación ya que es sabido que los métodos estadísticos de valoración cuantitativa son más fiables que los que se basan en una ordenación cualitativa.

Como investigador, analizando la investigación, desarrollaría de modo numérico su criterio cualitativo clasificatorio. El método es válido en general, aunque presenta cierta arbitrariedad en cuanto a la asignación de los valores. La experiencia indica, sin embargo, que pequeñas diferencias entre diferentes sistemas de clasificación, rara vez dan lugar a conclusiones dispares. Creemos que queda bastante justificada la validez de la transformación en datos numéricos de las observaciones en nuestra serie experimental. El siguiente paso es encontrar el estadístico de contraste que nos proporcione una mayor información en el análisis de nuestros resultados.

En este estudio se ha optado tras un análisis preliminar de los resultados, por un test no-paramétrico (Test de Mann-Whitney). Este tipo de test, al no depender de la distribución de la variable, no precisa la condición previa de normalidad de las poblaciones, a diferencia de los tests paramétricos, como la t de Student que si exigen para su aplicación una distribución normal de la población. Como en nuestros datos numéricos la variable es de tipo discreto (ya que sólo puede tener valores de 1, 2, 3, 4...) no es posible siempre el poder efectuar una aproximación a la normal, ni aún tras una transformación logarítmica. No obstante, en aquellos casos que sobre nuestros datos no se pudo aplicar este tipo de test, se realizó el test de Chi-Cuadrado con corrección de Yates.

Por otra parte, dado que el número de casos analizados en cada grupo es menor de 30, se cumple otro requisito fundamental para la aplicación de estos tipos de tests y es que la población a analizar no sea muy grande.

## ***RESULTADOS***

---



### **1.- EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS ANIMALES**

- Pérdida de animales
- Peso
- Lateralidad
- Atrofia muscular
- Úlceras de decúbito
- Pérdidas digitales

### **2.- ESTUDIO DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL**

- Deambulaci3n
- Grasping test
- Índice Funcional Ciático

### **3.- ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS PIEZAS**

- Disecci3n
- Dimensiones
- Color

### **4.- ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS CORTES**

- Descripci3n por cortes
- Descripci3n por tinciones

### **5.- DATOS CUANTITATIVOS HISTOLÓGICOS**

- Número de axones
- Diámetro de los axones

### **6.- APORTACIÓN DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

A continuación, exponemos el análisis de los datos recogidos durante la experimentación. Para ello, ordenaremos los resultados según el parámetro objeto a analizar (clínica, funcionalidad, histología). Podríamos haber optado por la cronología como eje central de la presentación de los datos, pero quizá restaría importancia al estudio histológico, por la evolución tan llamativa del estudio clínico y funcional.

## 1.- EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS ANIMALES

### ❖ *PÉRDIDA DE ANIMALES*

. La muerte de animales de experimentación es uno de los riesgos más temidos en este tipo de estudios. De ahí, la colocación del collarete isabelino por el peligro de autofatiga de la extremidad intervenida al estímulo del olor o manchado, así como a la alteración de la sensibilidad de la zona. Pero, existe un segundo riesgo, que sería la presencia de otro animal en iguales condiciones estabulado con el primero. Las horas iniciales son decisivas, quizá más, el período inmediato durante la metabolización de la anestesia de sólo uno de los dos animales.

Durante nuestra experimentación, intentamos corregir alguno de estos factores con el collarete y controlando físicamente el postoperatorio inmediato, retirando dicha jaula de las otras.

A pesar de las medidas tomadas para tal fin, uno de los animales del grupo de casos, murió durante las primeras horas postoperatorias posiblemente atacada por la rata acompañante. Encontramos marcas de mordeduras en la zona quirúrgica y la herida abierta, desgarrados los puntos de sutura. El animal causante de tal daño, tenía retirado el collarate isabelino cuando se revisó la jaula a las 8 horas de la cirugía.

El animal fue retirado según orden veterinaria.

No hubo ninguna muerte en relación a sobredosis por anestesia, suceso que sí habíamos detectado en experimentaciones previas similares. Estas pérdidas podrían explicarse por excesiva dosis de anestésico y/o relajante inicial, o por la necesidad de repetir el proceso anestésico para completar la cirugía. Las dos situaciones fueron descritas en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo.

Debemos describir otro evento adverso sucedido con el grupo de casos, que supuso la pérdida de otro animal de experimentación en el día en el que iba a ser sacrificado, por la confusión de otro grupo de trabajo al coger uno de nuestros animales para iniciar su estudio.

El día 90 de la rata número 5 del grupo de casos, solicitada para realizar las pruebas de marcha y sacrificarla, visualizamos a nuestra llegada el animal anestesiado con una incisión reciente en la extremidad trasera derecha, de unos 3 cm de longitud, como un abordaje ampliado de cadera. En su misma jaula está el animal número 6, rodeando físicamente la nueva herida quirúrgica ya suturada.

Otro investigador que había solicitado varios ejemplares de la misma rata para experimentar abordajes del nervio ciático, había empleado nuestra quinta rata para dicho fin, sin percatarse de las secuelas físicas que dicho animal había desarrollado durante los 90 días post-sección e injerto del nervio ciático. Según dicho investigador, los cambios no se percibían (podría ser la misma falta de atención que le evitó descubrir el cartel de 10x5 cm que marcaba el proyecto al que estaba ligado dicho animal).

Pero lo cierto era que su peso, 575 g sugería la cría prolongada de la rata (normalmente los ejemplares que se reciben para experimentación animal rondan los

200-300 g a lo sumo), el pelo de la extremidad operada era ligeramente más corto (después de la primera rasuración perioperatoria), sí que es verdad que no había perdido ninguna uña de su pata trasera derecha, y mantenía la longitud de todos los dedos; pero, al rasurarla de nuevo, debería haber detectado la hipotrofia muscular.

Las pruebas de huella plantar a la marcha y el examen para comprobar la hiperextensión de los dedos al levantarla por la cola, no pudieron ser realizados por la nueva cirugía sufrida por la rata así como su estado actual anestesiado.

Se procede pues a la filmación del estado de sus dedos traseros derechos, íntegros, de conservada longitud, así como la persistencia de las uñas. Se completa la rasuración ya iniciada y se fotografía la diferencia de volumen muscular de ambas patas.

Se sacrifica la rata siguiendo el método habitual, saltándonos el paso previo de anestesarla. Se fija bien. A la disección de la pieza, están separados los planos (piel suturada con puntos reabsorbibles, sueltos). Se localiza fácil el ciático y se observa un corte limpio que se dirige hacia y hasta el injerto. Se extrae la pieza.



Figura 3. 1 **Pérdida de animales.**

A) Rata caso nº5 a nuestra llegada al laboratorio. Rasurada. Herida quirúrgica recién cerrada, sobre la previa de hacía 90 días. Integridad de los dedos de la pata operada, sin úlcera por presión, ligera atrofia de la musculatura. B) Detalle del abordaje previo al retirar los puntos de piel. Se observa la incisión directa hacia la región del injerto.

Se exponen a continuación las tablas de los datos de la pérdida de animales en el grupo de controles, en el de casos y la tabla de contingencia de comparación de ambos, con su p-valor.

**MUERTE<sup>a</sup>**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 0	10	100,0	100,0	100,0

a. Grupo = Control

**MUERTE<sup>b</sup>**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 0	8	80,0	80,0	80,0
1	2	20,0	20,0	100,0
Total	10	100,0	100,0	

b. Grupo = Rata

**Tabla 3. 1 Análisis descriptivo de los resultados de la pérdida de animales, de ambos grupos.**

GRUPO \* MUERTE, P-VALOR=0,524

**Tabla de contingencia**

			MUERTE		Total
			0	1	
Grupo	Control	Recuento	10	0	10
		% dentro de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
	Rata	Recuento	8	2	10
		% dentro de Grupo	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Recuento	18	2	20
		% dentro de Grupo	90,0%	10,0%	100,0%

**Tabla 3. 2 Análisis comparativo de los resultados de la pérdida de animales.**

❖ **PESO**

El grupo de controles presentaba al inicio de la experimentación un peso medio de 310 g, con un peso medio final de 560 g. El animal más pequeño pesaba inicialmente 298 g. El peso final alcanzado máximo fue de 580 g.

**Estadísticos<sup>a</sup>**

	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
PESO INICIO	10	0	310,60	310,00	11,908	298	325	299,00	322,50
PESO FINAL	10	0	561,40	560,00	13,278	543	580	551,00	572,50

a. Grupo = Control

**Tabla 3. 3 Análisis descriptivo de los resultados de la variable peso del grupo control.**

En cuanto al grupo de casos, y teniendo en cuenta el animal fallecido en el postoperatorio inmediato, presentaban un peso inicial medio de 321 g, mínimo de 290 g, máximo de 385 g. Al final de la experimentación, el peso medio era de 517 g, mínimo de 446 g, máximo de 608 g.

**Estadísticos<sup>b</sup>**

	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
PESO INICIO	10	0	321,50	310,00	35,202	290	385	293,75	342,50
PESO FINAL	9	1	517,56	513,00	53,135	446	608	473,00	560,00

b. Grupo = Rata

**Tabla 3. 4 Análisis descriptivo de los resultados de la variable peso del grupo de casos.**

La comparación de ambos grupos, mediante la prueba T para la igualdad de medias en muestras independientes, refleja que inicialmente todos los animales presentaban un peso muy similar, con un rango de confianza más amplio (2,02-85,67) en el peso final.

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba T para la igualdad de medias			
			95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
PESO INICIO	0,519	-10,90	-46,43	24,63
PESO FINAL	0,042	43,84	2,02	85,67

**Estadísticos de grupo**

	Grupo	N	Media	Desviación típ.
PESO INICIO	Control	10	310,60	11,91
	Rata	10	321,50	35,20
PESO FINAL	Control	10	561,40	13,28
	Rata	9	517,56	53,13

Tabla 3. 5 **Análisis comparativo de los resultados de la variable peso de ambos grupos.**

❖ **LATERALIDAD**

Estudiamos la influencia de la selección de la extremidad elegida en los resultados. Aunque inicialmente comenzamos operando patas traseras derechas, repitiendo el abordaje por perfeccionarlo y compararlo en los primeros animales, la realidad es que intentamos compensarlos para que no resultase un parámetro de sesgo.

Así, en el grupo de controles, finalmente, operamos 6 patas derechas y 4 izquierdas. En el grupo de casos, conseguimos una distribución simétrica, pero como falleció el caso 2 que era derecho, en la tabla de resultados, aparecen 5 casos izquierdos y 4 derechos.

**LATERALIDa**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Izquierda	4	40,0	40,0	40,0
	Derecha	6	60,0	60,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

a. Grupo = Control

**LATERALID<sup>b</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Izquierda	5	50,0	55,6	55,6
	Derecha	4	40,0	44,4	100,0
	Total	9	90,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	10,0		
Total		10	100,0		

b. Grupo = Rata

**Tabla 3. 6 Análisis descriptivo de los resultados de la variable lateralidad, de ambos grupos.**

La comparación de los datos de ambos grupos muestra, bajo un p-valor de 1, un resultado final comparable porque el 47.4% resultaron finalmente izquierdos y el 52.6% derechos.

GRUPO \* LATERALID, P-VALOR= 1,000

**Tabla de contingencia**

			LATERALID		Total
			Izquierda	Derecha	
Grupo	Control	Recuento	4	6	10
		% dentro de Grupo	40,0%	60,0%	100,0%
	Rata	Recuento	5	4	9
		% dentro de Grupo	55,6%	44,4%	100,0%
Total		Recuento	9	10	19
		% dentro de Grupo	47,4%	52,6%	100,0%

**Tabla 3. 7 Análisis comparativo de los resultados de la variable lateralidad.**

❖ **ATROFIA MUSCULAR**

Tras anestesiar las ratas previamente a su sacrificio y posterior fijación, colocamos los animales en una plataforma regular, estiramos las extremidades y observamos las patas, en búsqueda de signos de la rasuración previa del pelo de la extremidad operada, secuelas de la cicatriz quirúrgica, y contamos los dedos, su longitud, la ausencia de uñas, la presencia de úlceras de decúbito en las patas y la presencia de atrofia de la musculatura.

Ciertamente, en el 100% de las ratas, el pelo rasurado el día 0 para la cirugía inicial, había crecido el día 90, cubriendo la cicatriz de la herida quirúrgica. Ninguna de las heridas tuvo complicaciones de dehiscencia, infección o intolerancia a las suturas; aunque a modo preventivo, se curaron los primeros días con povidona yodada (Betadine®), mientras los animales conservaron el collarite isabelino.

De proximal a distal, lo primero es detectar el estado de la musculatura de la extremidad operada, tras 90 días de evolución de la sección del nervio ciático.

El 100% de las ratas del grupo control mostraban atrofia de la musculatura de visu. Este hallazgo queda más de manifiesto cuando volvemos a rasurar la extremidad para la extracción de la pieza histológica.

**ATROFIA<sup>a</sup>**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos SI	10	100,0	100,0	100,0

a. Grupo = Control

Tabla 3. 8 **Análisis comparativo de los resultados de la atrofia del grupo control.**



Figura 3. 2 **Atrofia muscular grupo control.**

Atrofia muscular de la extremidad inferior izquierda en rata del grupo control, en comparación con la pata contralateral.

En el grupo de animales con factores de crecimiento, la mayoría de las ratas (el 60% de ellas) mostraban signos de atrofia muscular al comparar el diámetro de la extremidad ya rasurada de nuevo, con la contralateral.

**ATROFIA<sup>b</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	3	30,0	33,3	33,3
	SI	6	60,0	66,7	100,0
	Total	9	90,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	10,0		
Total		10	100,0		

b. Grupo = Rata

Tabla 3. 9 **Análisis descriptivo de los resultados de la atrofia del grupo de casos.**



Figura 3. 3 **Atrofia muscular grupo de casos.**

La atrofia muscular de la extremidad operada en los casos es menor y podría en alguno de ellos pasar desapercibida en la visualización macroscópica.

La comparación de ambos grupos muestra, con un p-valor de 0.258, que más del 84% de los animales muestran signos objetivos y detectables a la exploración visual, de atrofia de la musculatura de la extremidad intervenida.

GRUPO \* ATROFIA, P-VALOR=0,258

Tabla de contingencia

			ATROFIA		Total
			NO	SI	
Grupo	Control	Recuento	0	10	10
		% dentro de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Rata	Recuento	3	6	9
		% dentro de Grupo	33,3%	66,7%	100,0%
Total		Recuento	3	16	19
		% dentro de Grupo	15,8%	84,2%	100,0%

Tabla 3. 10 Análisis comparativo de los resultados de la atrofia en ambos grupos.

### ❖ ÚLCERAS DE DECÚBITO

Continuando hacia distal, el siguiente parámetro clínico a describir es el hallazgo de úlceras de decúbito.

Al seccionar el nervio ciático, hemos visto cómo las ratas arrastraban la extremidad operada, lo que supone un apoyo constante de la pata por incapacidad motora para su movimiento activo durante la deambulación, con ausencia de sensibilidad a ese nivel.

Seis de los animales del grupo control desarrollaron una úlcera de decúbito a nivel del talón del pata operada, que precisaron curas con povidona yodada local (Betadine<sup>®</sup>) durante el postoperatorio inmediato. Se resolvieron fácilmente con las primeras curas. Los otros 4 controles sí que mostraron pérdida de sustancia importante como para continuar con las curas durante las siguientes semanas.

**ÚLCERAS<sup>a</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	6	60,0	60,0	60,0
	2	4	40,0	40,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

a. Grupo = Control

Tabla 3. 11 **Análisis descriptivo de los resultados de la variable úlceras del grupo control.**



Figura 3. 4 **Úlceras de decúbito grupo control.**

Úlcera de decúbito en la extremidad operada de uno de los controles. Se compara su escasa entidad con una úlcera de las que presentaron nuestros animales de investigaciones previas.

Sólo uno de los animales del grupo de casos presentó una úlcera de decúbito que precisó tratamiento tópico, pero que se resolvió fácilmente en la segunda semana.

**ÚLCERAS<sup>b</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	8	80,0	88,9	88,9
	1	1	10,0	11,1	100,0
	Total	9	90,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	10,0		
Total		10	100,0		

b. Grupo = Rata

Tabla 3. 12 **Análisis descriptivo de los resultados de la variable úlceras del grupo de casos.**



**Figura 3. 5 Úlceras de decúbito del grupo de casos.**

Únicas secuelas por presión detectadas en el grupo de casos; la primera de ellas sí que precisó curas como las úlceras por presión del grupo de controles, pero que se resolvió fácilmente.

Con un p-valor de 0,001, describimos en la tabla de contingencia el recuento de 42.1% de animales sin lesiones de decúbito en sus patas, 36.8% con úlceras de sencilla resolución y 21.1% (cuatro controles) con pérdida de sustancia severa en el talón. Finalmente, sólo en estos cuatro controles se reflejaban a los 90 días las secuelas de estas lesiones.

GRUPO \* ÚLCERAS, P-VALOR=0,001

**Tabla de contingencia**

			ÚLCERAS			Total
			0	1	2	
Grupo	Control	Recuento	0	6	4	10
		% dentro de Grupo	,0%	60,0%	40,0%	100,0%
	Rata	Recuento	8	1	0	9
		% dentro de Grupo	88,9%	11,1%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	7	4	19
		% dentro de Grupo	42,1%	36,8%	21,1%	100,0%

**Tabla 3. 13 Análisis comparativo de los resultados de la variable úlceras en ambos grupos.**

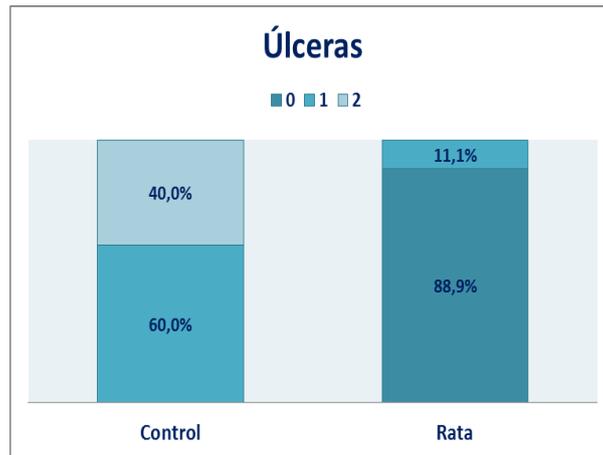


Figura 3. 6 **Representación gráfica de la distribución de las úlceras.**

### ❖ *PÉRDIDAS DIGITALES*

Más distalmente y alcanzando la exploración de los dedos de la pata operada, nos fijamos en su número, su longitud y la presencia o ausencia de fanegas.

El 20% de los controles no presentan alteración en ninguno de estos parámetros. El 20% han perdido uno de los dedos (una rata perdió su uña correspondiente y la otra dos). El 40% perdió dos dedos y sus uñas correspondientes, con el dedo adyacente más corto. Sólo dos casos presentaban una alteración severa de la pata, con la amputación de tres de los dedos; el resto de los dedos tenían una longitud normal.

**PÉRD DIGIT<sup>a</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	2	20,0	20,0	20,0
	1	2	20,0	20,0	40,0
	2	4	40,0	40,0	80,0
	3	2	20,0	20,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

a. Grupo = Control

Tabla 3. 14 **Análisis descriptivo de las pérdidas digitales del grupo control.**



Figura 3. 7 **Pérdida digital grupo control.**

Control n° 2 con pérdida de dos de los dedos de la pata trasera operada, a los 90 días postoperatorios.

En el grupo de casos, seis de ellos conservaban la morfología normal de la pata; aunque dos de ellos habían perdido alguna uña y tenían el dedo correspondiente más corto. Tres casos habían perdido un dedo y dos uñas, con el resto de los dedos de longitud normal.

**PÉRD DIGIT<sup>b</sup>**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	6	60,0	66,7	66,7
	1	3	30,0	33,3	100,0
	Total	9	90,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	10,0		
Total		10	100,0		

b. Grupo = Rata

Tabla 3. 15 **Análisis descriptivo de las pérdidas digitales del grupo de casos.**



Figura 3. 8 **Pérdida digital grupo de casos.**

Pérdida de las uñas de los dedos de la pata trasera operada del caso n° 3. Conserva todos los dedos, sin contractura en flexión.

La comparación de los dos grupos de trabajo resulta, con un p-valor de 0,046, más del 40% de los animales con sus dedos y fanegas conservados, a pesar de la lesión inicial del nervio ciático de dicha pata. Un 20% de ellos presentan severas secuelas de la extremidad distal intervenida, lo que segura alterará su patrón de deambulaci3n.

Tabla 3. 16 Análisis comparativo de la pérdida digital de ambos grupos.

GRUPO \* PÉRD DIGIT, P-VALOR=0,046

Tabla de contingencia

			PÉRD DIGIT				Total
			0	1	2	3	
Grupo	Control	Recuento	2	2	4	2	10
		% dentro de Grupo	20,0%	20,0%	40,0%	20,0%	100,0%
	Caso	Recuento	6	3	0	0	9
		% dentro de Grupo	66,7%	33,3%	,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	5	4	2	19
		% dentro de Grupo	42,1%	26,3%	21,,1%	10,5%	100,0%

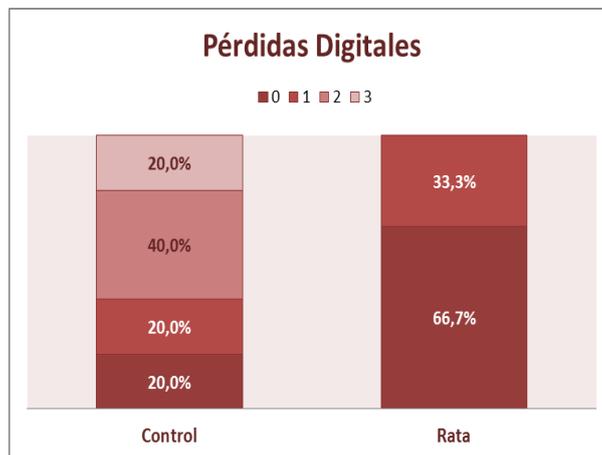


Figura 3. 9 Representación gráfica de la distribución de las pérdidas digitales.

## 2.- ESTUDIO DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL

### ❖ *DEAMBULACIÓN*

Los 19 animales fueron grabados mientras deambulaban preoperatoriamente, a los 7, 30 y 60 días; y los 18 sobrevivientes, a los 90 días postoperatorios.

La marcha del roedor en el periodo preoperatorio es armónica, acompasada y simétrica. Participan de ella las cuatro extremidades, gozando de un papel principal las dos patas traseras. No muestran marcha de Trendelemburg. Fácilmente, se apoyan sobre las dos extremidades inferiores, para alzar el cuerpo, durante un movimiento de búsqueda o para alcanzar algún objeto.

La secuencia de la marcha no tiene período de vuelo libre (las cuatro patas en el aire). Describen un balance diagonal con una pata delantera que acompaña a la pata trasera contralateral. Su movimiento es vacilante en turnos y pausas o trote. La principal fuente del roedor de la propulsión proviene de sus patas traseras. Durante la locomoción lenta, las extremidades anteriores se utilizan para poner en contacto y explorar el sustrato y las paredes.

Este patrón normal de deambulación de la rata, se pierde completamente tras la sección del nervio ciático. Durante el periodo postoperatorio inmediato, objetivado a la primera marcha analizada el día 7 postoperatorio, los animales arrastran plenamente la pata operada; recogen tras de sí restos de comida o virutas, tropezando con ello, por la ausencia no sólo de motilidad, sino también de sensibilidad. El apoyo de los dedos y el talón es lo que origina la aparición en este primer periodo de las úlceras de decúbito.

Quizá en este primer periodo sí presenten dolor, puesto que los animales están irritados e intentan morderse la extremidad. Están la mayor parte del tiempo, quietas en la jaula.



**Figura 3. 10 Deambulaci3n a los 7 d3as.**

Durante los primeros d3as postoperatorios, los animales se muestran menos activos y permanecen quietos en la jaula aunque se retire su tapa. Y sin embargo, se muestran m3s agresivos cuando se realizan las curas o los cambios de collarete isabelino (ya retirado el 7º d3a).

A los 30 d3as, las 3lceras de dec3bito de evoluci3n t3rpida se han transformado en p3rdidas digitales, evento especialmente detectado en el grupo control, donde los animales persisten con una marcha t3rpida, de apoyo casi exclusivo de tal3n y punta de los dedos, por la contractura desarrollada. Filmados quedan los reportajes de c3mo estos animales se sientan sobre su extremidad, porque la anestesia les hace olvidarla.



Figura 3. 11 **Deambulaci3n del grupo control a los 30 d3as.**

Serie de im3genes fotogr3ficas del grupo de controles a los 30 d3as postoperatorios. A y D) La extremidad operada se queda retrasada durante la marcha. B y C) No es capaz de levantar el tren trasero al iniciar la marcha.

En el grupo de casos, la situaci3n ha variado m3s. Se muestran mucho m3s activas y la extremidad operada participa parcialmente en el desarrollo del patr3n de marcha. Han curado las 3lceras iniciales y son pocas las p3rdidas digitales.





**Figura 3. 12 Deambulaci3n del grupo de casos a los 30 d1as.**

Serie de fotograf1as del estudio de deambulaci3n del grupo de casos a los 30 d1as. A) Recuperada su capacidad de elevarse para agarrarse a la jaula. B) Retraso de la extremidad operada durante la marcha. C) Elevaci3n de la pata trasera para dar el paso, movimiento poco preciso. D) La pata trasera pierde su apoyo y resbala por incoordinaci3n para la propulsi3n.

A los 60 d1as, ambos grupos muestran una mejor1a respecto al periodo preoperatorio. Los animales son capaces de trepar la jaula, apoy1ndose no sin dificultad sobre sus patas traseras, para alcanzar el borde de la misma. Aceleran la marcha.





**Figura 3. 13 Deambulaci3n del grupo control a los 60 d1as.**

Conjunto de im1genes del seguimiento del grupo control a los 60 d1as. A) Contractura en flexi3n de los dedos de la pata operada. B) Retraso de la extremidad durante la deambulaci3n. C) P3rdida del alineamiento de las extremidades durante la marcha. D) Dificultad para elevar el cuerpo del suelo.

Especialmente las ratas del grupo de casos, poseen una marcha con apoyo de la pata intervenida, con elevaci3n parcial de la misma del suelo a la deambulaci3n, con amplitud del paso.



**Figura 3. 14 Deambulaci3n del grupo de casos a los 60 d1as.**

Conjunto de fotograf1as del grupo de casos a los 60 d1as postquir1rgicos. A) Alineamiento casi completo de la pata operada con su homolateral delantera. B) Elevaci3n parcial del cuerpo. Recuperaci3n completa de la longitud y densidad del pelo rasurado el d1a de la cirug1a.

A los 90 días, justo antes del sacrificio de los animales, éstos poseen una marcha ágil, sólo parcialmente interrumpida por sucesivos tropiezos, con paso ligeramente más corto y apoyo más fugaz de la extremidad distal.



Figura 3. 15 **Deambulaci3n del grupo control a los 90 d3as.**

Escenas captadas del estudio de deambulaci3n del grupo controles d3as antes de su sacrificio. A) Retraso de la extremidad. B) Uno de los controles a3n presenta alteraciones en el pelo a nivel de la herida quir3rgica. C) Deambulaci3n acompasada con alineamiento de las 4 extremidades.

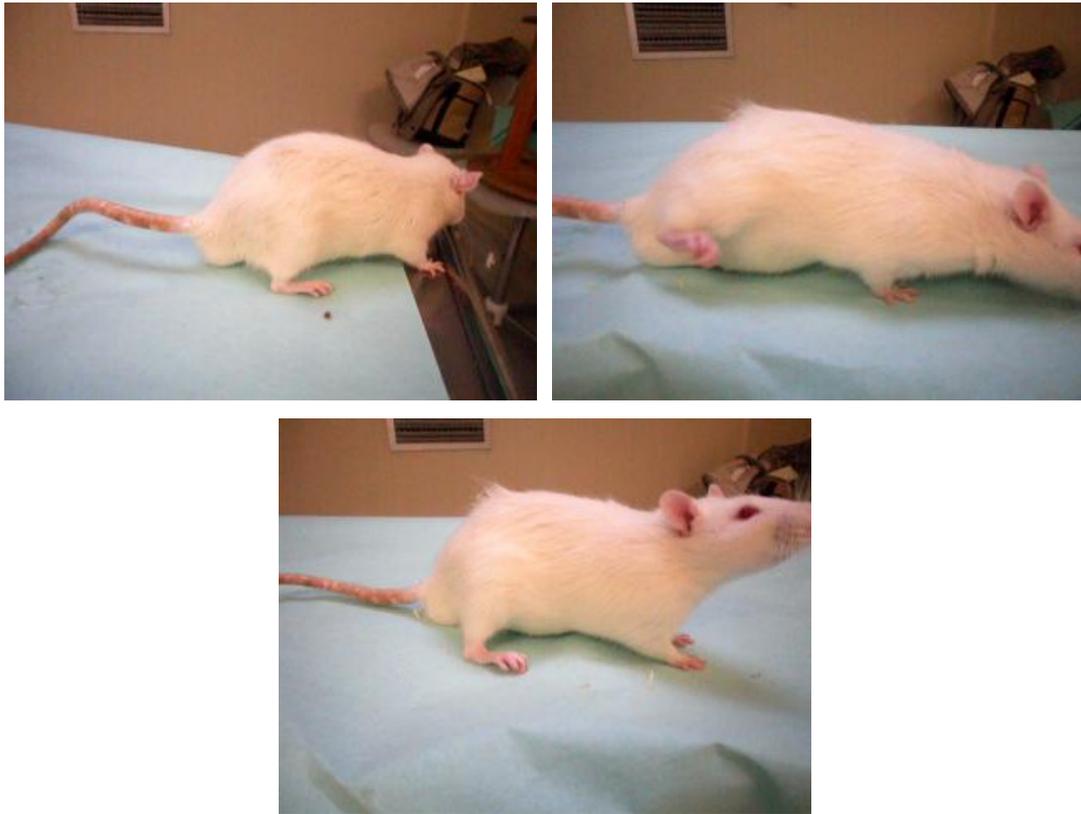


Figura 3. 16 Deambulaci3n del grupo de casos a los 90 d1as.

- A) Libertad de movimientos e integraci3n con el entorno, con elevaci3n del hemicuerpo posterior. B) Movimiento circular de la extremidad operada para dar el paso. C) Estática correcta del animal, con apoyo adecuado de la pata y estiramiento casi completo de los dedos.

#### ❖ *GRASPING TEST*

El *Grasping Test* o test de la rejilla (*Bertelli & Mira, 1995; Tos et al., 2009*) nos ayuda a valorar la capacidad motora de la pata operada del animal de experimentaci3n, comparándolo adem1s con la extremidad sana contralateral.



Figura 3. 17 **Técnica del *Grasping Test*.**

Procedimiento de la prueba del *Grasping Test*, con medición de la fuerza de anclaje del animal a la rejilla.

Al observar las patas traseras elevadas, visión previa al agarre de las patas traseras, cuando las delanteras ya están sujetas a la rejilla o al intentar apoyarlas en el suelo, podemos descubrir la ausencia o la recuperación de la capacidad de extensión y separación de los dedos de la extremidad operada.

Como resultado de la lesión completa del nervio peroneo, los extensores de los dedos y los pies y los dorsiflexores eversores no funcionan. Pero además, secundario a la lesión de la rama tibial, existe pérdida de la flexión plantar del tobillo, inversores del pie, flexores de los dedos, e intrínsecos del pie. Presentan una tendencia a la eversión del pie, con flexión plantar aún así.

En el grupo control, 6 de los animales podían extender la pata y los dedos, pero no separar éstos. El resto no podía extender ni separar los dedos. Muestran una contractura en flexión moderada de toda la extremidad. La eversión y la flexión plantar del pie se hacen más evidentes en este grupo. La pata se queda retrasada en el espacio, permaneciendo en una posición posterior, mientras la contralateral se adelanta para alcanzar la superficie de agarre.

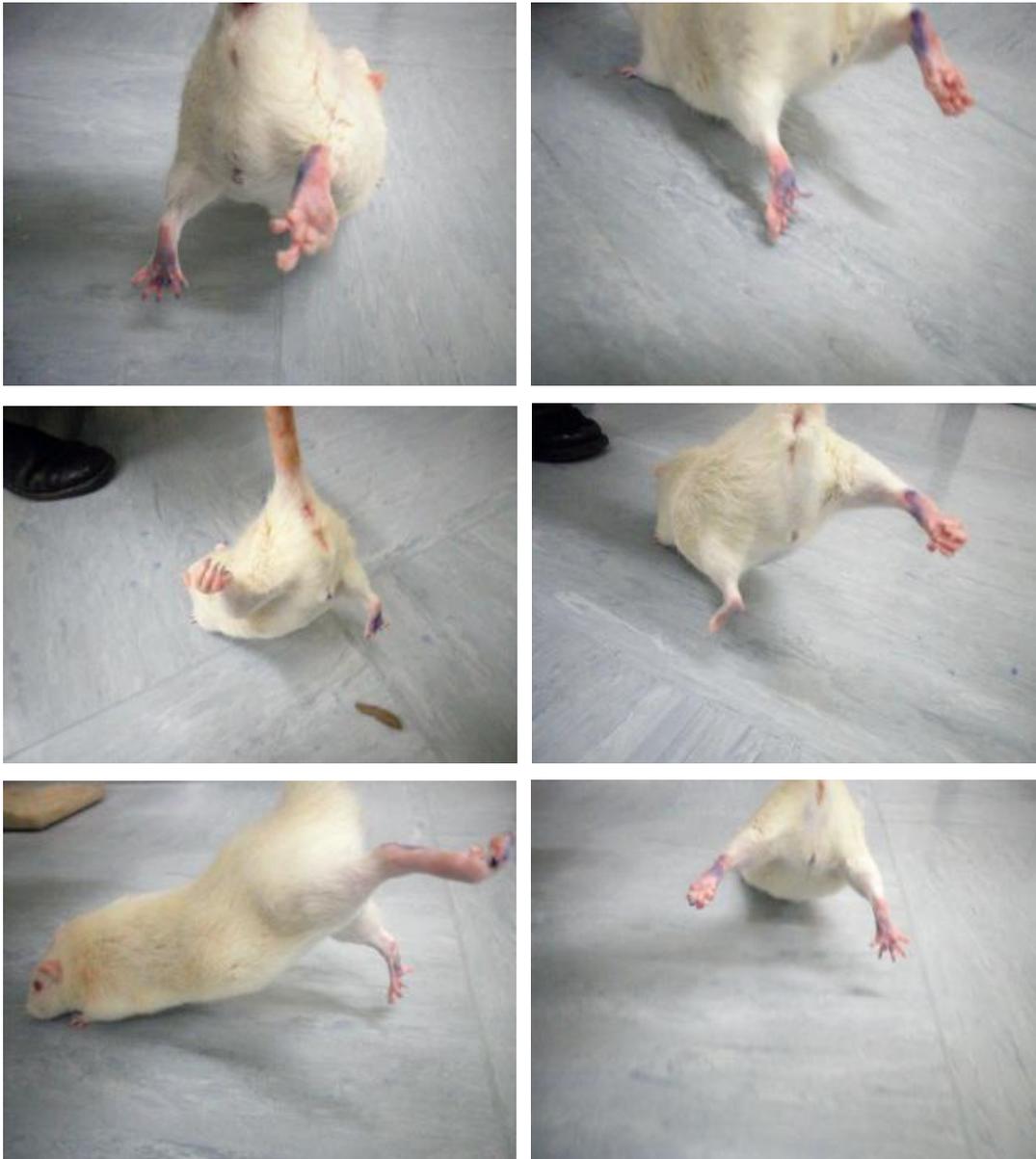


Figura 3. 18 *Grasping Test* grupo control.

Fotogramas extraídos de los videos que se realizaron a los 90 días de evolución en el grupo de controles, al analizar la posibilidad de extensión y separación de los dedos, mientras se levantan los animales por el rabo, en su intento de amarre. A) Intento de separación de los dedos de la pata trasera derecha, en rata control con pérdidas digitales. B) Imposibilidad de extensión ni separación digital, en una huella plantar, que al haber sido impregnada previamente con el filtro de tinta al hacer la prueba del Índice Funcional Ciático, muestra su mal apoyo con el borde póstero-medial. C) Falta de control sobre la extremidad cuando el animal precisa de su instinto de agarre a la superficie, con extremidad que pierde el alineamiento con el resto del cuerpo, con importante contractura digital. D) Mala posición del pie, que mira hacia medial, en lugar de a la superficie donde debe buscar apoyo. E) La extremidad operada no busca el punto de agarre, permaneciendo en la posición posterior previa. F) Acompañamiento de la extremidad a su contralateral, aunque persiste la contractura digital.

En el grupo de casos, se detectó una contractura en flexión en un 45% de las ratas en las que, aunque no extendían los dedos, lograban una posición neutra más

funcional durante la realización del test. Alcanzan mayor grado de alineamiento de la extremidad con el resto del cuerpo, incluso hemos visto a dos de los casos, como lograban una posición simétrica en el apoyo de las dos patas traseras.



Figura 3. 19 *Grasping Test* grupo de casos.

Fotogramas del estudio del grupo de casos a los 90 días postoperatorios, durante el *Grasping Test*. A) Rata caso que logra acercar simétricamente las dos patas traseras en busca de superficie a la que anclarse. B y C) Extensión parcial y separación digital, con ligero retroceso de la extremidad, pero con buena alineación corporal. D) Dinámica correcta de la extremidad al paso, con flexión dorsal del pie, aunque no logra separar completamente los dedos.

### ❖ **ÍNDICE FUNCIONAL CIÁTICO**

La evaluación del SFI muestra el mismo patrón funcional entre los diferentes grupos estudiados a lo largo del tiempo (preoperatorio y a los 7, 30, 60 y 90 días del postoperatorio).

Los valores obtenidos entre 0 y -20, en el período preoperatorio, reflejan una función normal, en ambos grupos, antes de la sección del nervio ciático. Se mantiene simétricamente con los parámetros de la pata contralateral, las mediciones realizadas para completar la fórmula de Bain: experimental (E) y normal (N); distancia de la pisada (PL) –entre la extremidad del tercer dedo y el calcáneo–; anchura de la pisada (TS) –entre el primer y el quinto dedo–, y la anchura intermedia de la pisada (IT) –entre el segundo y el cuarto dedo– (*Bain et al., 1989*).

<b>CONTROLES</b>	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI Preoperat</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-6,8400</b>	<b>-7,3200</b>	<b>2,10841</b>	<b>-9,56</b>	<b>-4,14</b>	<b>-8,6600</b>	<b>-4,7800</b>
EPL Preop	10	0	26,6580	26,8300	,61828	25,96	27,47	26,0400	27,1900
NPL Preop	10	0	25,998	26,000	,0756	25,9	26,1	25,935	26,060
ETS Preop	10	0	19,5060	19,4000	,28272	19,29	19,99	19,3150	19,7500
NTS Preop	10	0	19,3460	19,3400	,10900	19,24	19,52	19,2550	19,4400
EIT Preop	10	0	10,1740	10,3300	,76412	9,04	10,92	9,4300	10,8400
NIT Preop	10	0	10,3000	10,3200	,18588	10,01	10,52	10,1450	10,4450

Tabla 3. 17 Descripción de los resultados del SFI preoperatorio del grupo control.

<b>CASOS</b>	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI Preoperat</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-5,9320</b>	<b>-5,2100</b>	<b>2,09353</b>	<b>-9,28</b>	<b>-3,70</b>	<b>-7,8925</b>	<b>-3,7000</b>
EPL Preop	10	0	26,4060	26,2450	,43884	25,90	27,25	26,0925	26,8300
NPL Preop	10	0	26,122	26,115	,1165	26,0	26,3	26,048	26,178
ETS Preop	10	0	19,6890	19,6900	,15416	19,43	19,92	19,5850	19,7900
NTS Preop	10	0	19,3750	19,3450	,12222	19,21	19,65	19,3000	19,4375
EIT Preop	10	0	9,5390	9,6700	,53567	8,69	10,20	9,0100	10,0100
NIT Preop	10	0	10,3510	10,3300	,28045	10,03	11,07	10,1850	10,3825

Tabla 3. 18 Descripción de los resultados del SFI preoperatorio del grupo control.

La evolución esperada de la primera semana, nos ofrece unos resultados de la medición del SFI en ambos grupos, severamente alterada, con cálculos que se aproximan al valor máximo, de mínima capacidad para la deambulaci3n. Así, en el grupo control el SFI a los 7 días tiene un valor medio de -82,24 (-83,93; -80,09), máximo de -79,84, mínimo de -84,64. El parámetro que más variaci3n sufre respecto del preoperatorio es la anchura de la pisada. Y el que más varía dentro de las mediciones a los 7 días es la distancia de la pisada.

En el grupo de casos, la media del SFI a los 7 días es de -93,91 (-95,86; -91,76), con valor máximo de -91,63, mínimo de -96,19. Coincide con el grupo de controles que el parámetro que más variaci3n sufre respecto del preoperatorio es la anchura de la pisada; así como que el más varía dentro de las mediciones a los 7 días es la distancia de la pisada.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 7días</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-82,2400</b>	<b>-83,1600</b>	<b>2,05772</b>	<b>-84,64</b>	<b>-79,84</b>	<b>-83,93</b>	<b>-80,09</b>
EPL 7d	10	0	13,9400	14,1300	,51638	13,02	14,23	13,5700	14,2150
NPL Preop	10	0	25,998	26,000	,0756	25,9	26,1	25,935	26,060
ETS 7d	10	0	4,5460	4,4700	,16471	4,36	4,73	4,4100	4,7200
NTS Preop	10	0	19,3460	19,3400	,10900	19,24	19,52	19,2550	19,4400
EIT 7d	10	0	4,6300	4,4600	,39345	4,36	5,30	4,3650	4,9800
NIT Preop	10	0	10,3000	10,3200	,18588	10,01	10,52	10,1450	10,4450

Tabla 3. 19 Descripción de los resultados del SFI a los 7 días postoperatorios del grupo control.

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 7días</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>-93,9100</b>	<b>-94,5800</b>	<b>2,01221</b>	<b>-96,19</b>	<b>-91,63</b>	<b>-95,8650</b>	<b>-91,7650</b>
EPL 7d	9	1	12,7100	13,0300	,60407	11,95	13,42	12,0750	13,2350
NPL Pre	10	0	26,122	26,115	,1165	26,0	26,3	26,048	26,178
ETS 7d	9	1	6,4811	6,5300	,14633	6,26	6,65	6,3300	6,6050
NTS Pre	10	0	19,3750	19,3450	,12222	19,21	19,65	19,3000	19,4375
EIT 7d	9	1	4,2011	4,2800	,33784	3,66	4,55	3,8700	4,5100
NIT Preop	10	0	10,3510	10,3300	,28045	10,03	11,07	10,1850	10,3825

Tabla 3. 20 Descripción de los resultados del SFI a los 7 días postoperatorios del grupo de casos.

La situación comprometida se mantiene durante el primer mes, con valores muy negativos en el SFI a los 30 días del grupo control, con un valor medio de -76,21 (-79,21; -73,74), máximo de -72,67, mínimo de -79,77. El parámetro que más variación sufre respecto del preoperatorio es la anchura de la pisada. Y el que más varía dentro de las mediciones a los 30 días es la distancia de la pisada.

Espectacular mejoría en los resultados del grupo de casos, con una media del SFI a los 30 días de -35,03 (-37,04; -32,40), con valor máximo de -31,46, mínimo de -39,5. La anchura de pisada y la distancia de pisada reflejan una variación similar respecto al valor preoperatorio, algo mayor sigue siendo la anchura de la pisada. La mayor mejoría se observa en el parámetro de la anchura intermedia de la pisada.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 30días</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-76,2160</b>	<b>-75,1800</b>	<b>2,92316</b>	<b>-79,77</b>	<b>-72,67</b>	<b>-79,21</b>	<b>-73,74</b>
EPL 30d	10	0	15,4780	15,3800	,73183	14,47	16,43	14,8550	16,1500
NPL Preop	10	0	25,998	26,000	,0756	25,9	26,1	25,935	26,060
ETS 30d	10	0	5,9040	5,9900	,23320	5,63	6,17	5,6600	6,1050
NTS Preop	10	0	19,3460	19,3400	,10900	19,24	19,52	19,2550	19,4400
EIT 30d	10	0	4,9820	5,0800	,54020	4,20	5,47	4,4500	5,4650
NIT Preop	10	0	10,3000	10,3200	,18588	10,01	10,52	10,1450	10,4450

Tabla 3. 21 Descripción de los resultados del SFI a los 30 días postoperatorios del grupo control.

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 30días</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>-35,0333</b>	<b>-35,5600</b>	<b>2,77255</b>	<b>-39,50</b>	<b>-31,46</b>	<b>-37,0450</b>	<b>-32,4050</b>
EPL 30d	9	1	19,9400	19,8100	,80683	18,60	21,08	19,3800	20,6800
NPL Preop	10	0	26,122	26,115	,1165	26,0	26,3	26,048	26,178
ETS 30d	9	1	12,2844	12,2900	,23501	11,90	12,68	12,1050	12,4650
NTS Preop	10	0	19,3750	19,3450	,12222	19,21	19,65	19,3000	19,4375
EIT 30d	9	1	7,2867	7,4100	,49477	6,21	7,90	7,0450	7,6200
NIT Preop	10	0	10,3510	10,3300	,28045	10,03	11,07	10,1850	10,3825

Tabla 3. 22 Descripción de los resultados del SFI a los 30 días postoperatorios del grupo de casos.

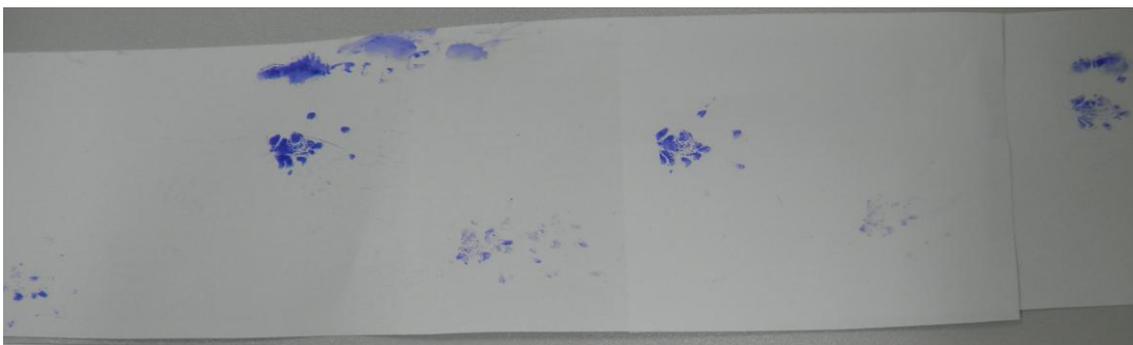


Figura 3. 20 **SFI a los 30 días postoperatorios.**

Severa alteración del patrón de huellas plantares de uno de los animales del grupo control a los 30 días postoperatorios, con diferencia significativa entre la pata operada y la sana. Dificultad del animal para caminar por el túnel de la prueba.

A los 60 días, todos los parámetros evaluados van mejorando, quizás en este caso se detecte mayor mejoría en el grupo de los controles (mayor porcentaje de variación si comparamos con los resultados a los 30 días). Así, el SFI a los 60 días de los controles tiene un valor medio de -34,14 (-37,98; -30,96), máximo de -29,67, mínimo de -38,61. El parámetro que más corrección sufre respecto del preoperatorio es la anchura de la pisada. Y el que más varía dentro de las mediciones a los 60 días sigue siendo la distancia de la pisada.

Los valores del grupo de casos, aunque han decelerado el ritmo de mejoría, continúan presentando mejores resultados. La media del SFI a los 60 días es de -22,53 (-23,77; -21), con valor máximo de -20,06, mínimo de -24,76. Coincide que el parámetro que más variación sufre respecto del preoperatorio y el que más varía dentro de las mediciones a los 60 días es la distancia de la pisada.

<b>CONTROLES</b>	<b>N</b>		<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desv. tít.</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Percentiles</b>	
	<b>Válidos</b>	<b>Perdidos</b>						<b>25</b>	<b>75</b>
<b>SFI 60 días</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-34,1400</b>	<b>-32,8200</b>	<b>3,72761</b>	<b>-38,61</b>	<b>-29,67</b>	<b>-37,98</b>	<b>-30,96</b>
EPL 60d	10	0	20,0700	19,7800	,93926	18,80	21,13	19,2900	20,9950
NPL Preop	10	0	25,998	26,000	,0756	25,9	26,1	25,935	26,060
ETS 60d	10	0	15,874	15,880	,1846	15,6	16,1	15,735	16,010
NTS Preop	10	0	19,3460	19,3400	,10900	19,24	19,52	19,2550	19,4400
EIT 60d	10	0	7,6640	8,1200	,86596	6,38	8,36	6,7700	8,3300

Tabla 3. 23 **Descripción de los resultados del SFI a los 60 días postoperatorios del grupo control.**

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. tip.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 60 días</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>-22,5344</b>	<b>-22,9700</b>	<b>1,65680</b>	<b>-24,76</b>	<b>-20,06</b>	<b>-23,7750</b>	<b>-21,0000</b>
EPL 60d	9	1	22,0544	21,9900	,71898	20,57	22,98	21,7150	22,6350
NPL Preop	10	0	26,122	26,115	,1165	26,0	26,3	26,048	26,178
ETS 60d	9	1	16,448	16,460	,1133	16,3	16,7	16,340	16,520
NTS Preop	10	0	19,3750	19,3450	,12222	19,21	19,65	19,3000	19,4375
EIT 60d	9	1	7,9478	7,8800	,33417	7,46	8,45	7,6650	8,2350
NIT Preop	10	0	10,3510	10,3300	,28045	10,03	11,07	10,1850	10,3825

Tabla 3. 24 Descripción de los resultados del SFI a los 60 días postoperatorios del grupo de casos.

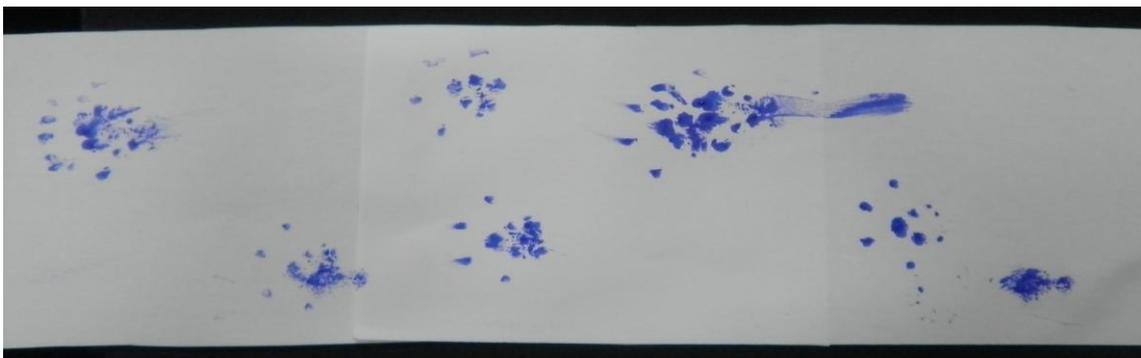


Figura 3. 21 SFI a los 60 días postoperatorios.

Recuperación parcial de la morfología de la pisada, respecto a resultados previos a los 60 días postoperatorios. Ambos grupos presentan mejoría de la anchura de la pisada, reflejándose una huella plantar similar. La pata trasera derecha tropieza en su intento de avanzar.

A los 90 días, ambos grupos muestran una recuperación satisfactoria del SFI; aunque no alcanzan los valores preoperatorios, se acercan a los resultados que se consideran normales. El SFI del grupo control a los 90 días tiene un valor medio de -19,6 (-21,72; -17,79), máximo de -16,97, mínimo de -22,53. El parámetro que más variación sufre respecto del preoperatorio es la distancia de la pisada. Y el que más varía dentro de las mediciones a los 90 días es la anchura intermedia de la pisada.

En el grupo de casos, la media del SFI a los 7 días es de -10,94 (-13,4; -9,52), con valor máximo de -5,55, mínimo de -16,35. De nuevo, coincide que el parámetro que

más variación sufre respecto del preoperatorio y el que más varía dentro de las mediciones a los 90 días es la distancia de la pisada.

<u>CONTROLES</u>	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 90 días</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>-19,6000</b>	<b>-19,0000</b>	<b>2,15627</b>	<b>-22,53</b>	<b>-16,97</b>	<b>-21,72</b>	<b>-17,78</b>
EPL 90d	10	0	22,1680	22,2100	,40715	21,64	22,56	21,7600	22,5550
NPL Preop	10	0	25,998	26,000	,0756	25,9	26,1	25,935	26,060
ETS 90d	10	0	16,6920	16,6900	,09808	16,54	16,81	16,6150	16,7700
NTS Preop	10	0	19,3460	19,3400	,10900	19,24	19,52	19,2550	19,4400
EIT 90d	10	0	7,6860	9,5000	3,80170	,95	9,85	4,7200	9,7450
NIT Preop	10	0	10,3000	10,3200	,18588	10,01	10,52	10,1450	10,4450

Tabla 3. 25 Descripción de los resultados del SFI a los 90 días postoperatorios del grupo control.

<u>CASOS</u>	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>SFI 90 días</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>-10,9475</b>	<b>-10,9000</b>	<b>3,33450</b>	<b>-16,35</b>	<b>-5,55</b>	<b>-13,4000</b>	<b>-8,5200</b>
EPL 90d	8	2	25,3575	25,2300	1,07529	23,65	27,50	24,9425	25,7450
NPL Preop	10	0	26,122	26,115	,1165	26,0	26,3	26,048	26,178
ETS 90d	8	2	18,8575	18,9100	,17726	18,46	19,03	18,8025	18,9700
NTS Preop	10	0	19,3750	19,3450	,12222	19,21	19,65	19,3000	19,4375
EIT 90d	8	2	9,6500	9,7850	,61326	8,74	10,60	9,0450	9,9775
NIT Preop	10	0	10,3510	10,3300	,28045	10,03	11,07	10,1850	10,3825

Tabla 3. 26 Descripción de los resultados del SFI a los 90 días postoperatorios del grupo de casos.

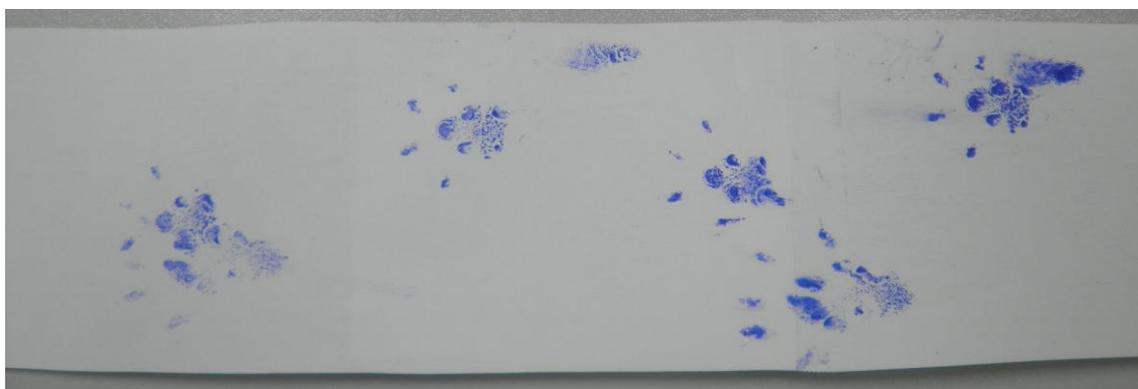


Figura 3. 22 SFI a los 90 días postoperatorios.

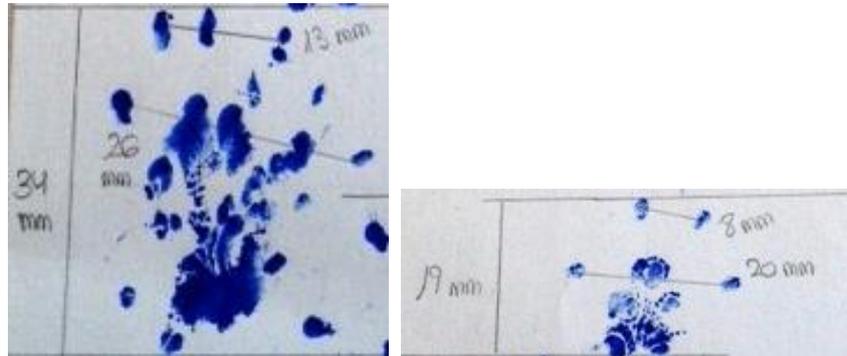
Clara mejoría en la separación digital de la extremidad operada de este animal "caso" a los 90 días postoperatorios. Ritmo de deambulación más armónico.

A continuación, se exponen los resultados de la prueba T de muestras independientes para la igualdad de medias, con la diferencia de medias y los intervalos de confianza, de cada uno de los parámetros analizados previamente por separado: observamos cómo las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas desde el 7º día postoperatorio, a favor del grupo tratado con el IGF-1.

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba T para la igualdad de medias			
			95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
<b>SFI Preoper</b>	<b>0,444</b>	<b>-0,91</b>	<b>-3,39</b>	<b>1,57</b>
EPL Preop	0,375	0,25	-0,34	0,84
NPL Preop	0,052	-0,12	-0,25	0,00
ETS Preop	0,123	-0,18	-0,42	0,06
NTS Preop	0,662	-0,03	-0,17	0,11
EIT Preop	0,082	0,63	-0,09	1,36
NIT Preop	0,721	-0,05	-0,35	0,25
<b>SFI 7días</b>	<b>0,000</b>	<b>11,67</b>	<b>9,21</b>	<b>14,13</b>
EPL 7d	0,002	1,23	0,53	1,93
ETS 7d	0,000	-1,94	-2,12	-1,75
EIT 7d	0,052	0,43	-0,01	0,86
<b>SFI 30días</b>	<b>0,000</b>	<b>-41,18</b>	<b>-44,61</b>	<b>-37,75</b>
EPL 30d	0,000	-4,46	-5,41	-3,51
ETS 30d	0,000	-6,38	-6,67	-6,10
EIT 30d	0,000	-2,30	-2,92	-1,68
<b>SFI 60 días</b>	<b>0,001</b>	<b>-11,61</b>	<b>-16,15</b>	<b>-7,06</b>
EPL 60d	0,001	-1,98	-2,96	-1,01
ETS 60d	0,000	-0,57	-0,75	-0,40
EIT 60d	0,515	-0,28	-1,34	0,77
<b>SFI 90 días</b>	<b>0,000</b>	<b>-8,65</b>	<b>-12,37</b>	<b>-4,94</b>
EPL 90d	0,000	-3,19	-4,31	-2,07
ETS 90d	0,000	-2,17	-2,36	-1,97
EIT 90d	0,314	-1,96	-6,66	2,74

Tabla 3. 27 Análisis comparativo de los resultados del SFI, en el tiempo, entre los dos grupos de trabajo.



**Figura 3. 23 Resultado funcional SFI.**

Comparación de dos huellas plantares. A) Huella plantar de la extremidad operada, a los 90 días postoperatorios, con alargamiento de la longitud de la huella y déficit a la extensión de los dedos. Cierta eversión del pie, con apoyo amplio del mismo. B) Huella plantar de la extremidad contralateral sana, huella corta en longitud, con una distancia entre los dedos (NTS) y entre los intermedios (NIT) mayor.

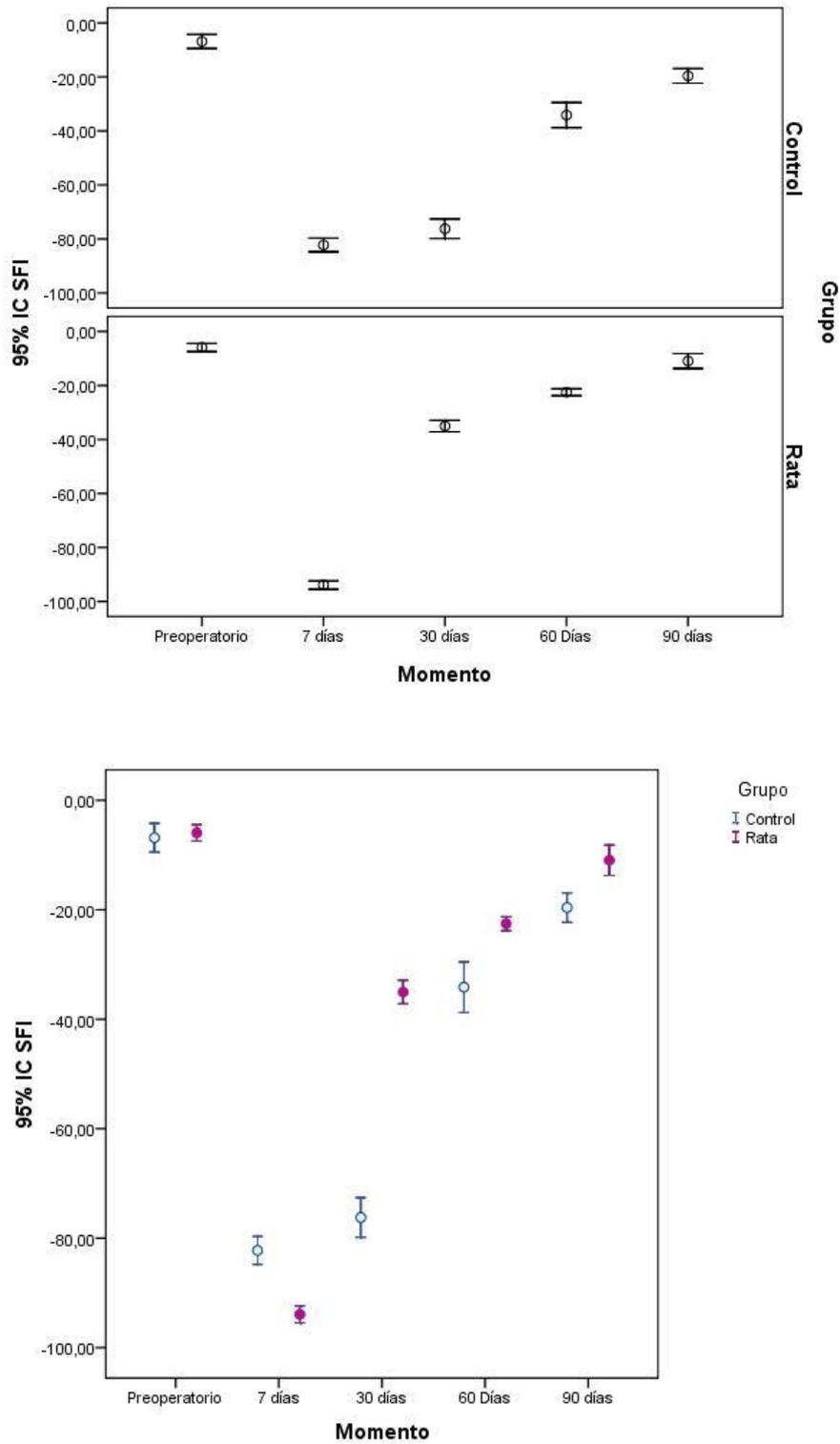


Figura 3. 24 **Representación gráfica de la distribución del SFI.**

Representación gráfico de los resultados de la prueba SFI en los dos grupos de trabajo, a lo largo de los 90 días. Se observa una caída importante tras la cirugía, que va recuperándose hasta alcanzar niveles inferiores al preoperatorio, pero dentro del rango reconocido como normal. Menos en el día 7, el rango del SFI de los casos supera al de los controles, y especialmente en el día 30, cuando existe la mayor diferencia.

### 3.- ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS PIEZAS

#### ❖ *DISECCIÓN*

Para la disección de la pieza a estudio, repetimos el abordaje previamente realizado, posterior con el animal ya fijado. Después de abrir la piel rasurada previamente, se localiza la musculatura de la extremidad inferior. Apartando el glúteo medio, localizamos el nervio ciático con una región del mismo, amarillenta, menos homogénea, cubierta por un tejido conectivo que fácilmente separamos de los planos adyacentes. Macroscópicamente, en 4 de los animales, el cabo distal estaba degenerado (degeneración lipídica) y con la formación de un neuroma.



Figura 3. 25 **Disección quirúrgica grupo control.**

Repetición del abordaje previo para la búsqueda, disección y extracción del nervio ciático para su análisis histológico. Visualizamos el estado de los tejidos tras su fijación.

En el grupo de casos, tras el sacrificio de los animales para la extracción de las piezas, llama nuestra atención la excesiva adherencia a planos contiguos, que dificulta la

disección, con severas complicaciones para diferenciar el plano muscular adyacente del injerto nervioso. Se visualiza un cordón amarillento de estructura tubular y aparentemente homogénea, entre las dos suturas del injerto.



Figura 3. 26 **Dissección quirúrgica grupo de casos.**

Dificultad para la disección del nervio ciático en el grupo de casos por la adherencia a los planos musculares adyacentes. Influye en la precaución con la que se realiza la sección de la pieza por miedo a la pérdida de material por falta de reconocimiento macroscópico.

### ❖ ***DIMENSIONES***

En todos los animales, se localizan las dos suturas, íntegras, con los dos puntos epineural-perimisio, que marcan los límites del injerto.

Los injertos han reducido su longitud respecto al bloque de músculo descelularizado empleado inicialmente; donde no existe una pérdida de injerto significativo, es en el espesor y anchura del mismo, que finalmente simula un cordón, más o menos homogéneo, que une los dos cabos, con morfología exuberante y poco redondeada.



Figura 3. 27 **Dimensiones de las piezas.**

Disección de dos piezas anatómicas de nervio ciático reparado. Se visualiza una estructura blanquecina, de mayor espesor y con recuperación parcial de la morfología tubular, entre las dos suturas de Prolene®. El cabo proximal se ha marcado con un lazo de Vicryl® de 2/0.

#### ❖ **COLOR**

La mayoría de las piezas extraídas para analizar, conservan un color amarillento casi blanquecino que simula la coloración del nervio original, con un aspecto macroscópico estriado. Si bien, algunas de las piezas presentan restos hemáticos vs musculares, con cierta tonalidad marronácea.

Han conseguido cubrirse de un tejido conectivo que protege el injerto, que se entrecruza con las coberturas conjuntivas del nervio, de color nacarado, que engaña sobre la continuidad de la estructura nerviosa.





**Figura 3. 28 Color de las piezas.**

Estructura blanquecina, tubular, A) con tintes marronáceos, posiblemente por falta de degeneración muscular; B) tallaje de una de las piezas en los 7 segmentos diferentes según protocolo diseñado previamente; C) continuidad macroscópica con ambos cabos a través del injerto, que pasados 90 días, se ha convertido en una estructura morfológicamente similar al nervio ciático.



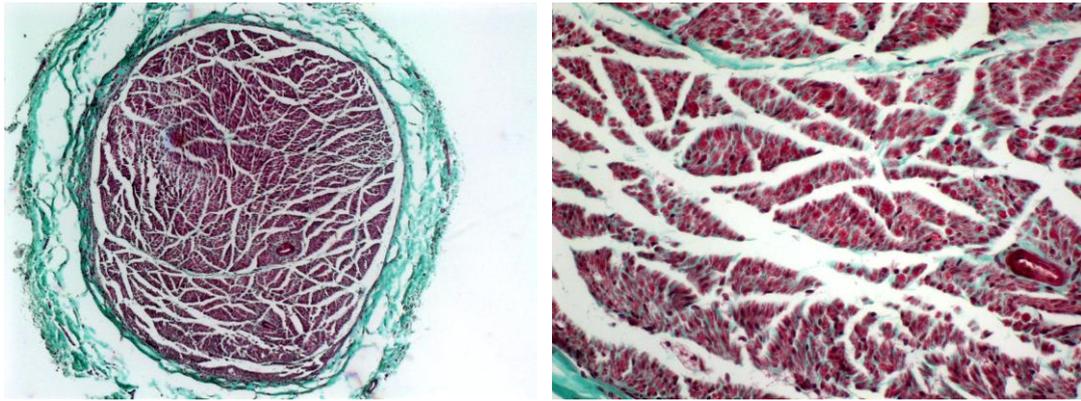
## **4.- ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS CORTES**

Para el estudio histológico, basamos nuestra investigación en el diseño de una pieza tallada en 7 secciones o cortes, según un protocolo previamente diseñado y explicado en *Material y Métodos*. Pero, además, el empleo de tres tipos de tinciones diferentes nos permite obtener datos particulares de cada una de ellas, según las estructuras más sensibles a cada una de las tinciones.

### **❖ DESCRIPCIÓN POR CORTES**

#### **Sección 1 (Cabo proximal)**

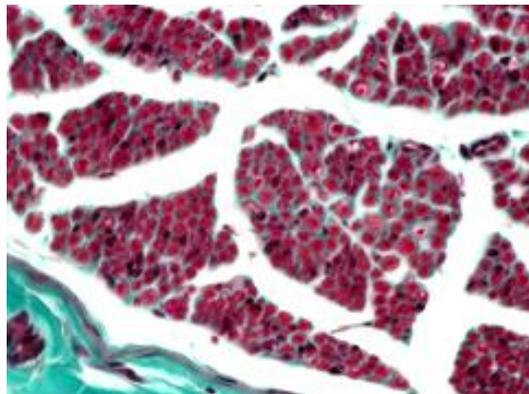
En el cabo proximal, con técnicas habituales de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, se observa una estructura característica de nervio periférico sano, redondeado, organizado en fascículos homogéneos, separados entre sí, con simetría en la densidad de axones, con cobertura mielínica regular dependiente de las células de Schwann. Con el método de tricrómico de Masson, se distingue claramente abundante epineuro y los relativamente escasos perineuro y endoneuro.



**Figura 3. 29 Sección 1 (cabo proximal).**

Con la tinción de tricrómico de Masson pueden apreciarse las fibras colágenas teñidas en verde en el epineuro y en el perineuro. A) Los fascículos muestran tinción de la matriz colágena intercelular (Tinción de tricrómico de Masson; aumento 5x). B) Detalle a 20x para observar la estructura organizada de un nervio con signos de regeneración, que mantiene la homogeneidad en sus fascículos (Tinción de tricrómico de Masson; aumento 20x).

El espacio entre los fascículos es relativamente amplio y las fibras nerviosas se diferencian claramente del tejido conjuntivo con el método de tricrómico. Los vasos sanguíneos se hallan en proporciones normales, uno por cada cuatro campos 100x, de media.



**Figura 3. 30 Sección 1 (cabo proximal) 100x.**

El mapa topográfico de los fascículos varía continuamente, lo que ofrece una imagen plexual (Tinción de tricrómico de Masson; aumento 40x).

Ambos grupos muestran estructuras similares, con un aspecto de nervio normal regenerado con vasos en su superficie, un epineuro uniforme y aparente continuidad.

## **Sección 2 (Cortes semifinos justo proximal al injerto)**

La sección 2, que pertenece igualmente al cabo proximal, permite descubrir con el método del azul de toluidina, fibras nerviosas relativamente normales aunque muestran formas algo irregulares, engrosadas, con pliegues y alteraciones de la vaina de la mielina, en el grupo sin IGF-1, evidencias de los mecanismos de degeneración y degradación sufridos después de la neurotmesis, que también se trasladan retrógradamente.

Está ocupada por cordones de fibras regeneradas, que parecen querer organizarse para formar estructuras de mayor jerarquía. Normalmente, los axones siguen trayectorias paralelas al eje mayor del injerto, aunque se aprecian conjuntos de fibras en otras orientaciones.

En el grupo de casos, los animales a los que se les suministró IGF-1 en el injerto, muestran en el cabo proximal una imagen similar a los controles, quizás con una distribución más regular, en alguno de ellos. Las células de Schwann que perdieron el contacto axonal proliferan rápidamente, se desdiferencian y mantienen en su interior la mielina desorganizada, evitando su efecto tóxico en el microambiente neural.

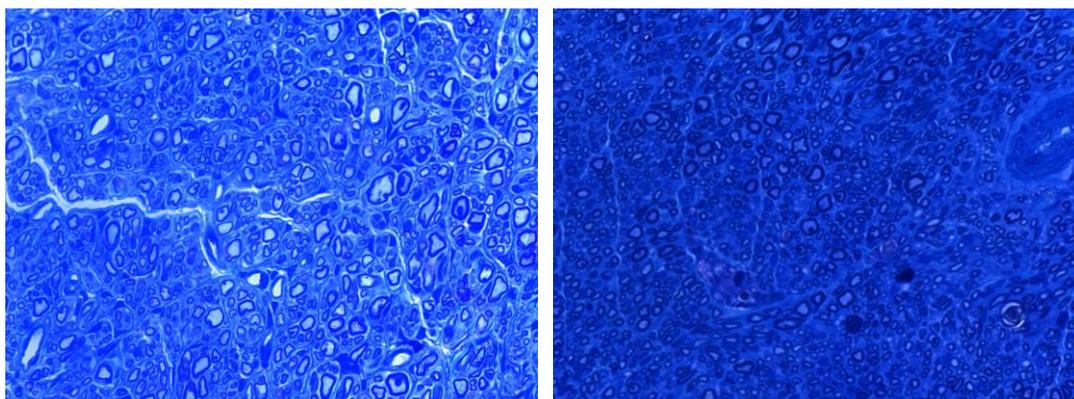


Figura 3. 31 **Sección 2, 40x.**

- A) Fibras mielínicas muy abundantes, normales, irregulares en tamaño y forma (Azul de toluidina, 40x).  
 B) Nervio normal ,con epineuro grueso y adipocitos rodeándolo, axones mielínicos, densa disposición, con escaso endoneuro (Azul de toluidina, 40x).

En secciones longitudinales, el cabo proximal de los nervios de ambos grupos de animales, muestran una disposición normal del epineuro y de los elementos tanto celulares como fibrilares que los constituyen.

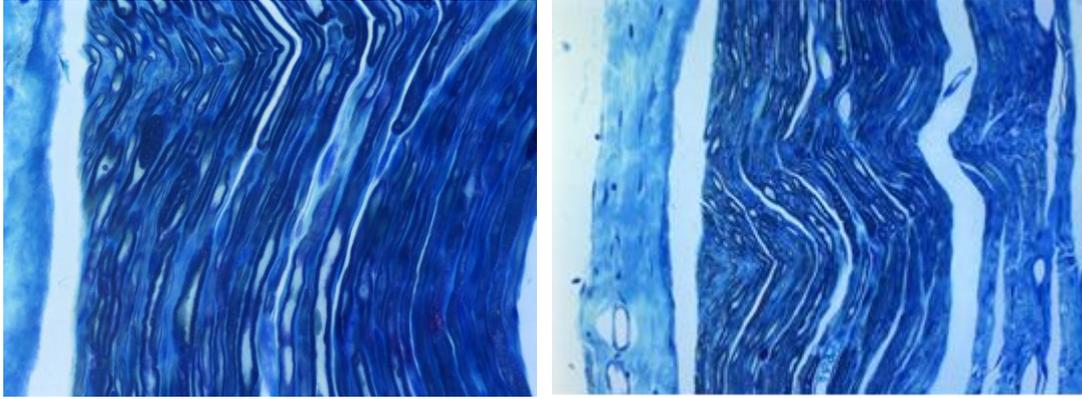


Figura 3. 32 **Sección 2, cortes longitudinales.**

A) Sección longitudinal del nervio ciático donde se observa la ondulación típica de las fibras nerviosas (Azul de toluidina x40). B) Vasos en endoneuro con hematíe en su interior (Azul de toluidina x40).

Así mismo, en las secciones longitudinales, se diferencia la vaina de mielina de las fibras nerviosas así como del tejido conjuntivo del perineuro y del endoneuro.

### **Sección 3 (Sutura proximal del injerto)**

Tanto en las secciones de los nervios no tratados como en aquellos que recibieron factor de crecimiento, se observa un infiltrado inflamatorio más o menos abundante alrededor de los fascículos musculares descelularizados.

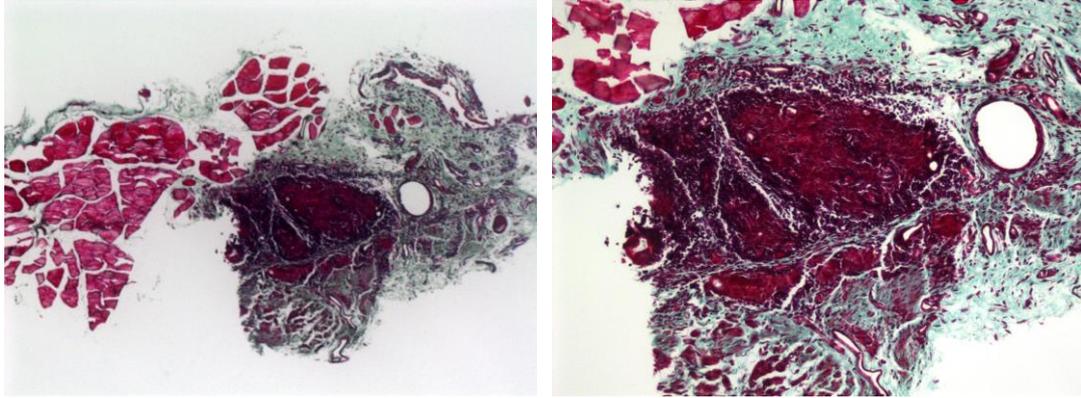


Figura 3. 33 **Sección 3, a pequeños aumentos.**

A) Masas de axones y células de Schwann, algunos ya separados formando pequeños fascículos, y el músculo a un lado, pero separados entre sí (Tricrómico de Masson 5x). B) Simula tejido inflamatorio (Tricrómico de Masson 10x).

También en ambos grupos de animales, los nervios aparecen formados por muy pocos axones o no aparecen en los cortes.

En el grupo de casos, observamos un estroma regenerativo colonizado por cordones de axones, poco empaquetados y bastante desorganizados, pero con cierta dirección en paralelo (en los cortes longitudinales).

En algunos animales, hemos encontrado entre las celulares musculares descelularizadas, fascículos nerviosos en disposición irregular que por su morfología y organización celular podrían ser considerados como pequeños neuromas.

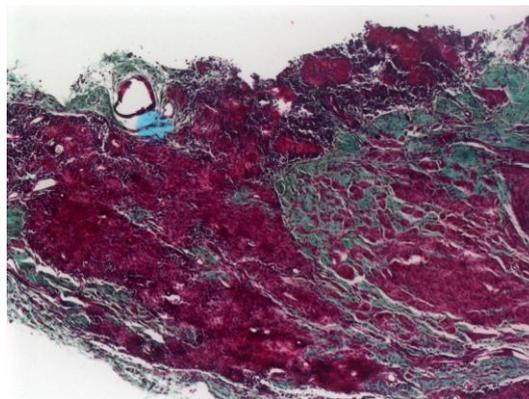


Figura 3. 34 **Neuroma.**

Tejido de granulación, que invade toda la muestra, de células desconocidas, con mucho citoplasma, núcleo redondeado (en vez de alargado como las células de Schwann). Con el tricrómico, no se distinguen los pequeños fascículos nerviosos (Tricrómico de Masson 5x).

En algunos zonas del implante, se observan haces de fibras nerviosas que penetran, no muy profundamente, entre las fibras musculares descelularizadas.

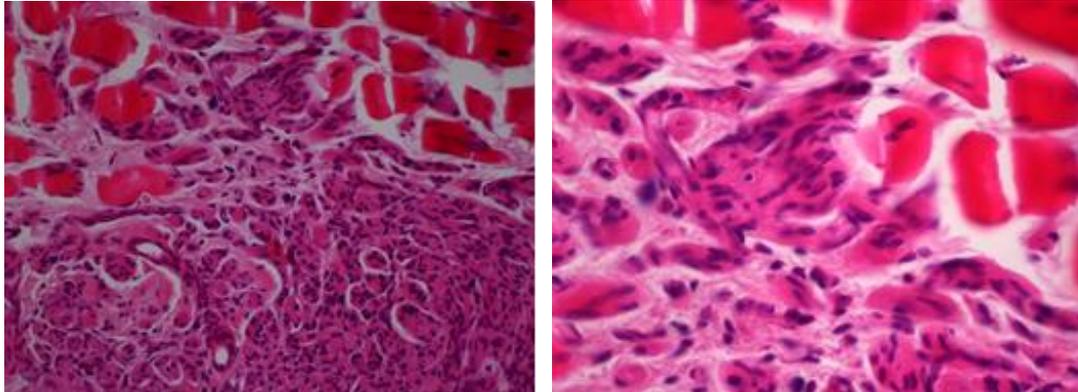


Figura 3. 35 **Sección 3, interfase H-E.**  
Interfase nervio-músculo con entrada periférica de los pequeños grupos de axones entre las células musculares (Hematoxilina-eosina, A) 20x, B) 40x).

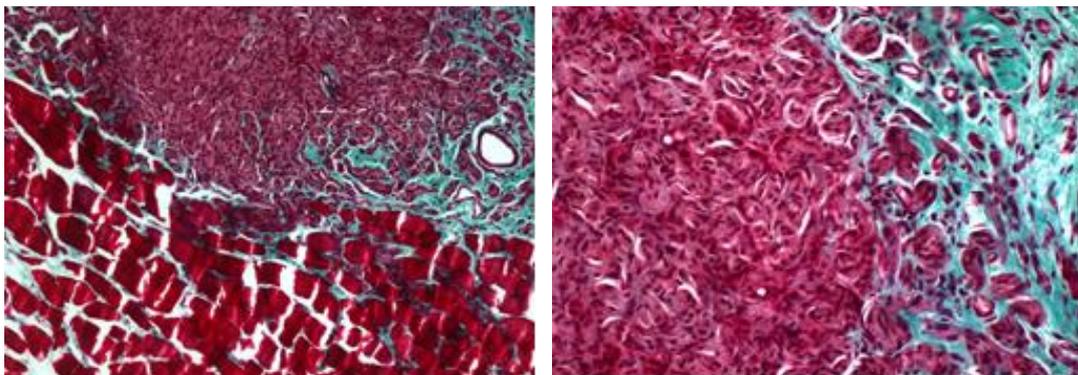
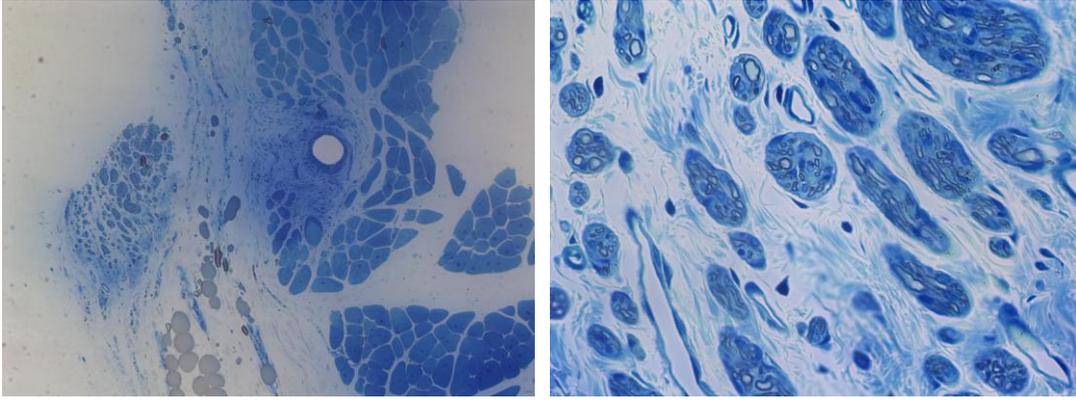


Figura 3. 36 **Sección 3, interfase tricrómico de Masson.**  
Interfase nervio-músculo, con la tinción de tricrómico de Masson, A) 10x, B) 20x.

#### **Sección 4 (Cortes semifinos del injerto)**

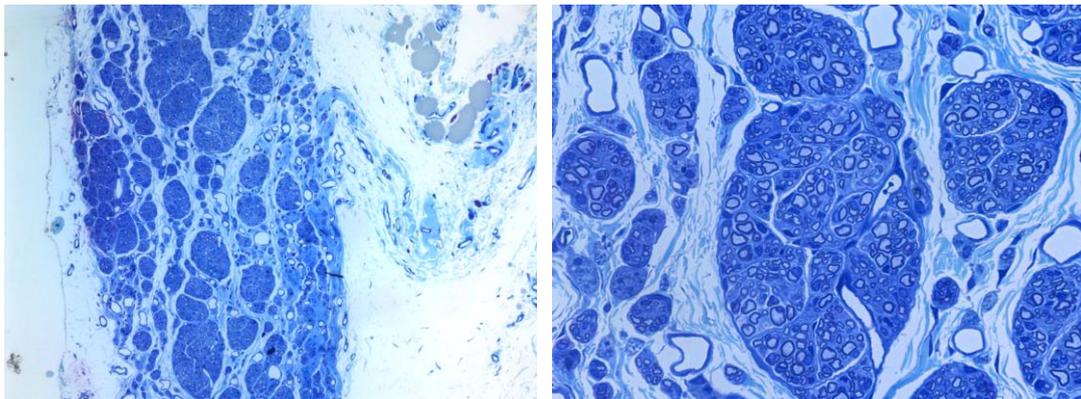
En este nivel, es frecuente observar pequeños fascículos nerviosos cerca de haces de fibras musculares descelularizadas, aunque con una cantidad abundante de tejido conectivo separando fibras nerviosas de las musculares.



**Figura 3. 37 Sección 4, cortes finos del injerto, grupo control.**

A) Músculo y nervio por fuera, separados. Un vaso muscular. Grasa entre ambos (como epimysio) (Azul de toluidina 5x). B) Muchos fascículos nerviosos, pequeños, separados por tejido conjuntivo abundante, con multitud de vasos; todo ello, propio del tejido regenerativo. Otra zona con menos fibras y más tejido conjuntivo, correspondería a un estadio primitivo de la regeneración (Azul de toluidina 40x).

En los nervios del grupo control, las fibras forman pequeños fascículos, de unos 8-20 axones, rodeados por abundante perineuro que a su vez, muestran numerosos capilares sanguíneos. Las fibras nerviosas son de tamaño muy variado, coexistiendo las fibras mielínicas muy gruesas con otras delgadas y con las no mielínicas, difícilmente identificables en las secciones semifinas.



**Figura 3. 38 Sección 4, cortes finos del injerto, grupo de casos.**

A) Grupo de fascículos nerviosos, con signos de regeneración (Azul de toluidina 10x). B) Fascículos separados, irregulares en cuanto a tamaño. Tejido conjuntivo abundante y laxo entre los fascículos, hay muchos vasos (Azul de toluidina 40x).

En la parte más interna de la luz, los pequeños fascículos parecen tener los límites más difusos, desdibujándose la morfología habitual y homogénea del nervio sano.

En los nervios tratados con IGF-1, se distinguen igualmente grupos no muy abundantes de fascículos nerviosos separados por epineuro relativamente abundante.

En el perineuro, se distinguen abundantes vasos sanguíneos, asegurando una buena irrigación del tejido regenerativo.

La mayoría de los animales tratados con IGF-1, además de los fascículos nerviosos cerca de las fibras musculares, poseen células inflamatorias, especialmente en relación con las fibras musculares descelularizadas.

En conjunto, parecen que son abundantes las fibras nerviosas en los nervios tratados con factor de crecimiento, ocupando la práctica totalidad de la superficie del corte, están más densamente empaquetados, también en las zonas interiores, donde parecen intentar formar un fascículo mayor, con finos septos internos. En esa zona hay más fibras nerviosas no mielinizadas.

### **Sección 5 (Sutura distal del injerto)**

En esta región, los animales no tratados con IGF-1, muestran fascículos nerviosos que discurren sobre la superficie del músculo descelularizado, aunque siempre se hayan separadas ambas estructuras por abundante tejido conjuntivo, siguiendo una trayectoria más aleatoria.

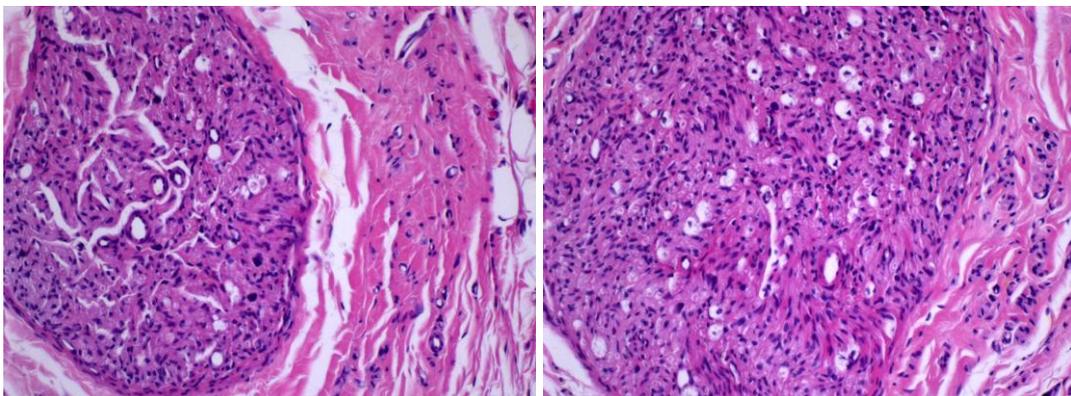


**Figura 3. 39 Sección 5, sutura distal, grupo control.**

A) Corte transversal de músculo descelularizado, con el nervio apoyado en la superficie del músculo. Se distinguen dos grupos de fascículos nerviosos por fuera del músculo, separados por un haz de tejido conjuntivo (Tricrómico de Masson 5x). B) Mismo corte visto en la tinción de hematoxilina-eosina (H-E 5x).

En estas secciones, destaca, especialmente con tricrómico de Masson, la abundancia de tejido conjuntivo epineural. En el interior de los troncos nerviosos, el tejido conjuntivo es más laxo y menos abundante.

Los animales tratados con IGF-1, presentan nervios en regeneración que se hallan igualmente separados de las fibras musculares por tejido conjuntivo. En algunas ocasiones, los fascículos nerviosos regenerados en el injerto tratado con IGF-1, muestran la disposición de un nervio completamente regenerado, es decir, formando fascículos, rodeados por epineuro bien organizado y con relativamente escasa cantidad de perineuro y endoneuro.



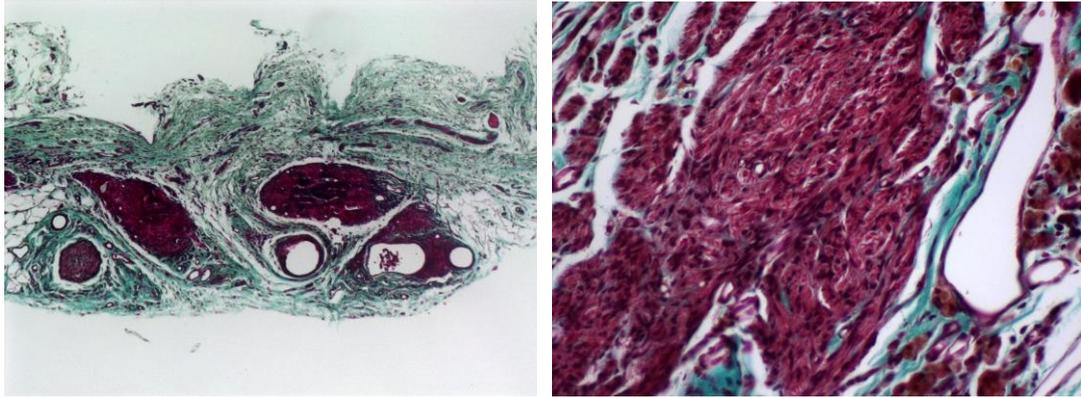


Figura 3. 40 **Sección 5, sutura distal, grupo de casos.**

A y B) Algunas de las secciones de los animales tratados con IGF-1 muestran signos de evidente regeneración, con estructura similar a la visualizada en el corte 1 (Hematoxilina-eosina 20x y 40x). C y D) Otros muestran mayores signos de desorganización, sin fascículos organizados, con abundante tejido conectivo (Tricrómico de Masson 5x y 20x).

### **Sección 6 (Cortes semifinos distal al injerto)**

El sexto segmento de los nervios del grupo control muestra la presencia de un buen número de minifascículos con axones mielinizados, que colonizan el cabo distal. Estos grupos suelen distribuirse más por la periferia del corte, dejando una zona más despoblada central. El grosor de la mielina a este nivel es inferior a los anteriores, así como el diámetro de las propias fibras nerviosas.

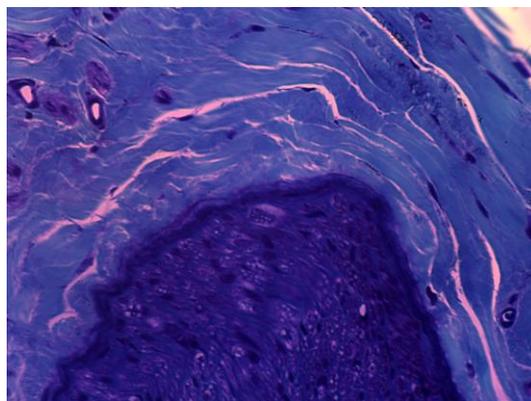


Figura 3. 41 **Sección 6, cortes semifinos, distal al injerto, control.**

Un fascículo totalmente independiente del músculo. Dobleces de la tinción. Las fibras están muy separadas, rodeadas por una vaina fibrosa. No hay distribución en en fascículos (Azul de toluidina 20x).

En esta región, los nervios del grupo de casos, muestran una estructura de nervio normal maduro, con epineuro bien desarrollado y cantidad moderada de perineuro y endoneuro. El trayecto parece ser oblicuo por lo que las fibras nerviosas aparecen cortadas en diferentes orientaciones.

Los pequeños fascículos se distribuyen más por la periferia. En algunos cortes, se observa el agrupamiento de varios axones asociados al proceso de una célula de Schwann. No se observan células inflamatorias.

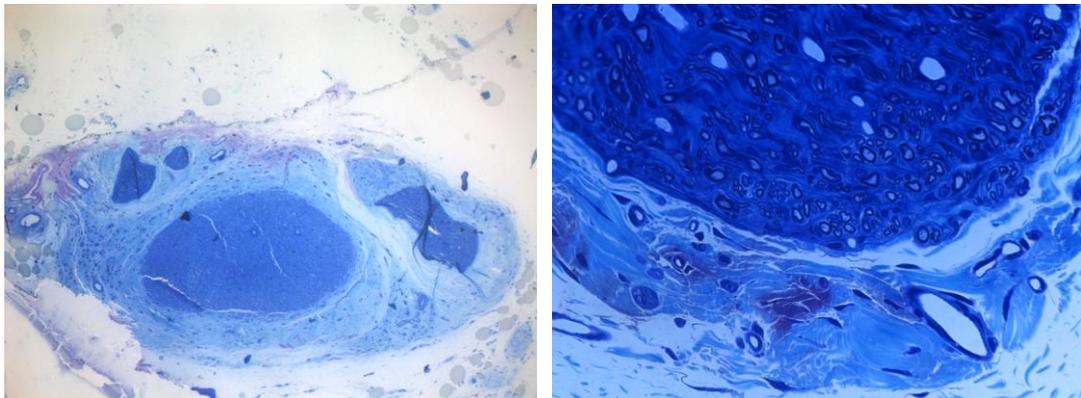


Figura 3. 42 **Sección 6, cabo distal, grupo de casos.**

A) Nervio grueso con 4 fascículos separados por abundante tejido conectivo (Azul de toluidina 5x). B) Aunque sí que es evidente que la apariencia es más semejante a la estructura normal que el control, sigue presentando desorden, sin división clara en fascículos. Tiene poco tejido conjuntivo entre las fibras y sin embargo, el epineuro está bastante bien desarrollado (Azul de toluidina 20x).

En uno de los animales tratados con IGF-1, se distinguen entre los axones en crecimiento, cristales de lípidos, rodeados de macrófagos, en ocasiones cargados de numerosas gotas de lípidos.

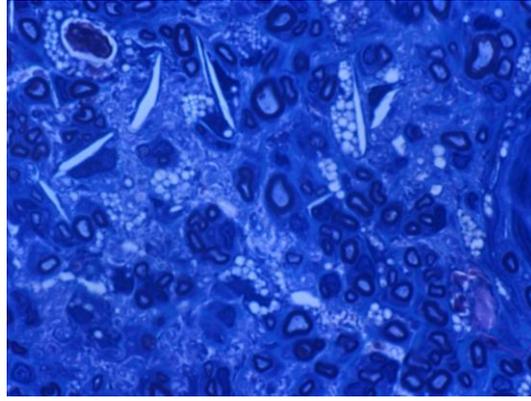


Figura 3. 43 **Cristales de grasa.**

Fascículo nervioso con células espumosas y macrófagos que digieren cristales de grasa (Azul de toluidina 100x).

### **Sección 7 (Cabo distal)**

En la zona distal de los nervios no tratados, se observó de 1 a 4 fascículos nerviosos de aspecto relativamente normal. Los axones forman cordones de varios elementos, que resultarían ser continuidad de aquellos fascículos pequeños de los segmentos centrales (en los cortes longitudinales).

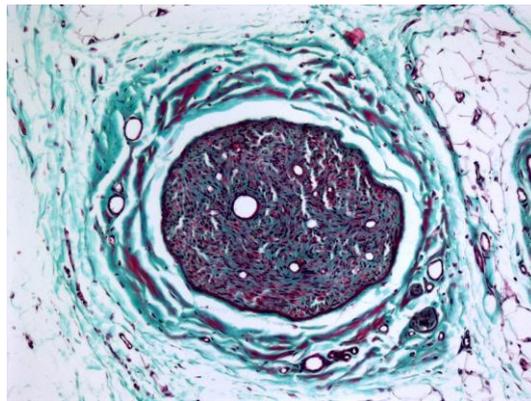
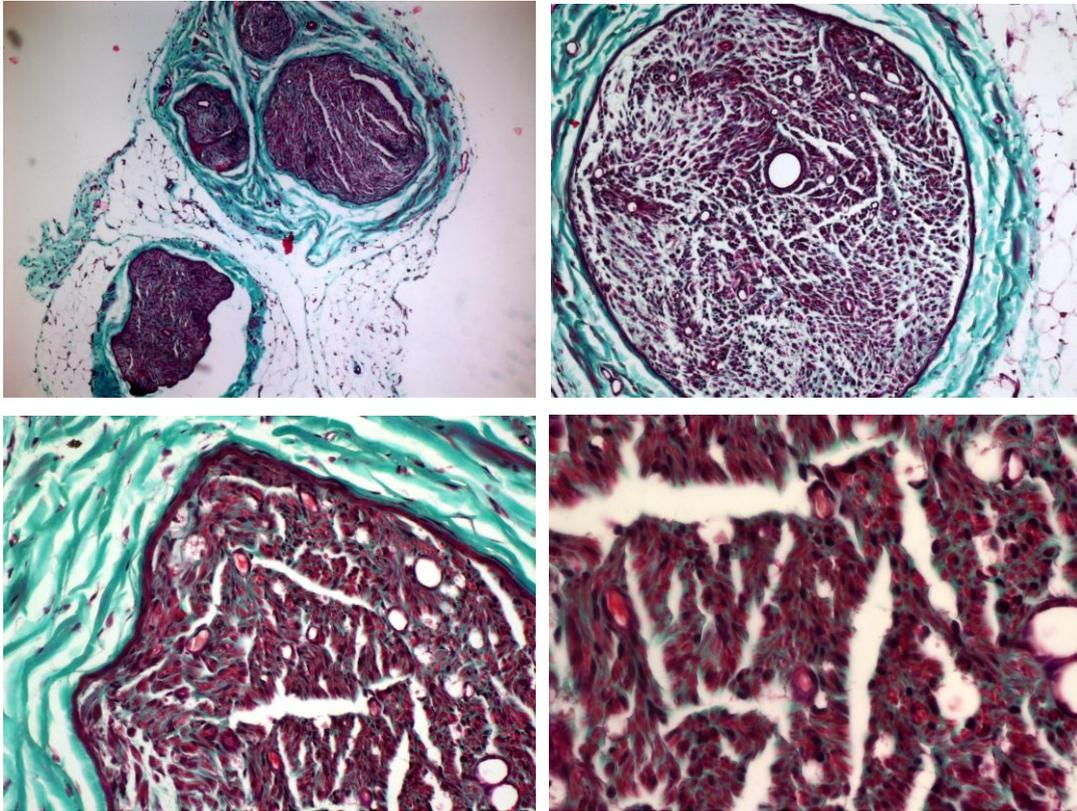


Figura 3. 44 **Sección 7 distal, grupo control.**

Estructura redondeada, con abundante tejido conectivo y vascularización, sin organización fascicular (Tricrómico de Masson 10x).

En los animales tratados con IGF-1, hemos observado una mayor variabilidad de tal manera que algunos animales muestran varios fascículos nerviosos regenerados, cordones de los fascículos observados en cortes previos o la división del tronco común.



**Figura 3. 45 Sección 7 distal, grupo de casos.**

A) Nervio distal, con cuatro fascículos rodeados de tejido conjuntivo y tejido adiposo (Tricrómico de Masson 5x). B) Entre la abundante vascularización, destaca el gran vaso arterial central (Tricrómico de Masson 10x). C) Sección del cabo distal de otro animal del grupo de casos, con similares características, con doblez central por defecto del proceso de inclusión (Tricrómico de Masson 20x). D) Axones constituyendo fascículos muy pequeños, no muy ordenados, separados por abundante tejido conjuntivo (Tricrómico de Masson 40x).

Mientras que uno de los casos, presenta una morfología que corresponde a un nervio degenerado, es decir, que no ha sido reinervado por las fibras nerviosas regeneradas.

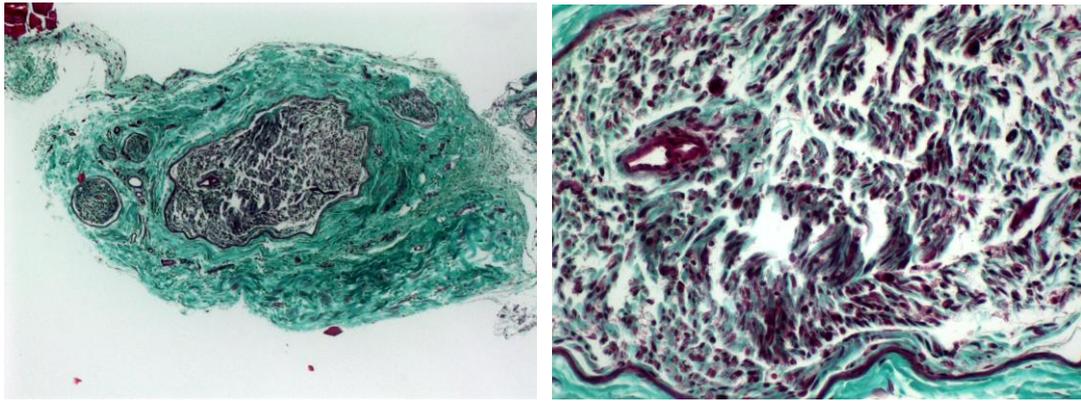


Figura 3. 46 **Nervio degenerado.**

A) Nervio degenerado (Tricrómico de Masson 5x). B) Se identifican células de Schwann y fascículos con lo que parecen ser citoplasmas de células de Schwann, que esperando a los axones que no llegan, se van muriendo (Tricrómico de Masson 20x).

El epineuro en este caso está incluso más desarrollado y en el interior se distinguen grupos de células de Schwann carentes de fibras nerviosas.

### ❖ *DESCRIPCIÓN POR TINCIONES*

#### **Hematoxilina-eosina**

La hematoxilina es un tinte de color púrpura oscuro que mancha la cromatina (el material nuclear), dejando un color púrpura-azul profundo. La eosina es un tinte anaranjado-rosado que tiñe de rojo el material citoplasmático incluyendo el tejido conectivo y colágeno, y deja una tinción de contraste de color naranja-rosa. Esto contrasta con el color púrpura-azul nuclear, y ayuda a identificar otras entidades en los tejidos, como la membrana celular (frontera), las células rojas y los espacios ocupados por sustancias líquidas.

Esta tinción nos ha permitido detectar ciertas circunstancias específicas durante el análisis de las muestras histológicas.

La hematoxilina-eosina refleja fielmente los límites biológicos de las estructuras nucleares de los tejidos conectivos que recubren las fibras nerviosas, marcando en un blanco impoluto los espacios vasculares y pliegues de los tejidos por el proceso de inclusión y corte. Es ilustrativa la visualización de los hematíes dentro de los vasos.

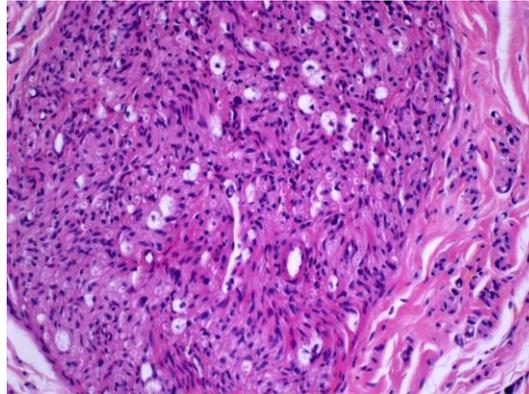


Figura 3. 47 **Hematoxilina-eosina, marcaje nuclear.**

Distribución celular en el cabo distal del nervio ciático de uno de los casos. Se observan multitud de fibras nerviosas poblando el espacio que definen las coberturas de tejido conectivo nervioso (Hematoxilina-eosina 20x).

El músculo descelularizado se tiñe en un tono más rojizo. Es de utilidad esta técnica como crítica al proceso de descelularización, porque tiñe perfectamente los núcleos residuales dentro de las células musculares; así como la inclusión de fibras nerviosas entre las fibras musculares acelulares.

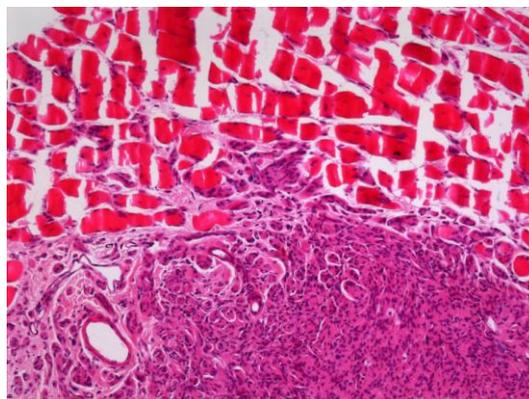


Figura 3. 48 **Hematoxilina-eosina, descelularización.**

Penetración de fibras nerviosas entre las fibras acelulares del injerto muscular (Hematoxilina-eosina 20x).

Pero esta técnica es pobre para la valoración fundamental del estudio, que sería la localización de axones mielinizados en el nervio en regeneración, ya que la hematoxilina-eosina no nos muestra signos de mielinización ni de degradación de las fibras nerviosas.

### **Tricrómico de Masson**

Es una técnica para la coloración de fibras colágenas y elásticas. Se observan tres colores distintos; tejido conjuntivo de verde, tejido muscular de verde pardo, eritrocitos de rojizo, núcleos azul negro y citoplasma y fibras musculares rosa.

El tricrómico de Masson es la tinción histológica que más información biológica ha aportado en los cortes de inclusión en parafina de la experimentación.

Permite distinguir las diferentes estructuras que configuran el corte: los restos de músculo descelularizado, el crecimiento del nervio regenerado, el tejido conjuntivo que lo rodea y los espacios que se crean al preparar la inclusión y el corte.

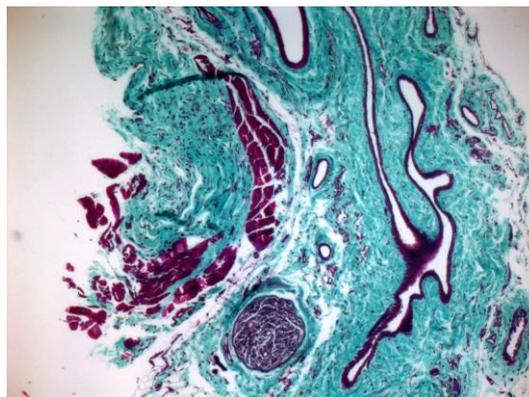


Figura 3. 49 **Tricrómico de Masson, las estructuras.**

Varios nervios finos, de fascículos regenerados. Mucho tejido conjuntivo, lo que corresponde a epineuro. No hay fascículos organizados y cada nervio tiene pocos axones (Tricrómico de Masson 5x).

El tricrómico de Masson permite descubrir las secciones de nervio donde los axones no han alcanzado el cabo distal y observamos una estructura predominantemente de tejido conectivo, con restos de fagocitación de los axones degenerados.

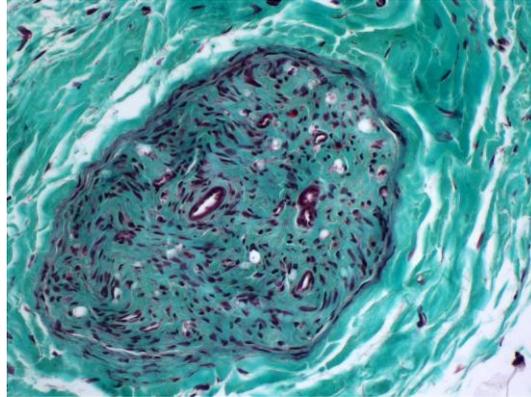


Figura 3. 50 **Tricrómico de Masson, degeneración.**

Cabo distal constituido sólo por tejido conjuntivo y células de Schwann, vainas sin axones; con estructura histológica de nervio, pero sin regenerar, como si no han llegado los axones a esa zona del tubo (Tricrómico de Masson 20x).

Así también podemos ver el conjunto de células de Schwann que no han recibido el axón de reinervación, con vainas de mielina vacías. Es difícil determinar si no están resentes los axones porque no logran la reinervación o porque los 90 días fueron insuficientes.

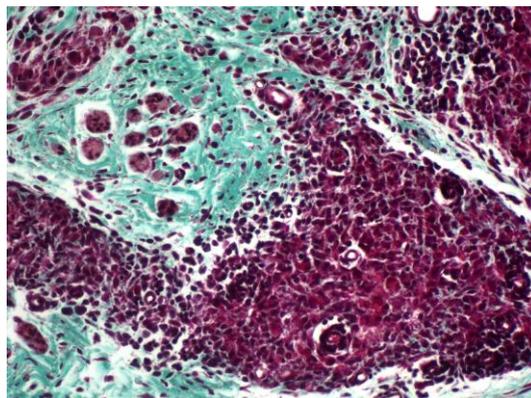


Figura 3. 51 **Tricrómico de Masson, ausencia de reinervación.**

Grupos de células de Schwann sin axones que rellenan el cabo distal nervioso (Tricrómico de Masson 20x).

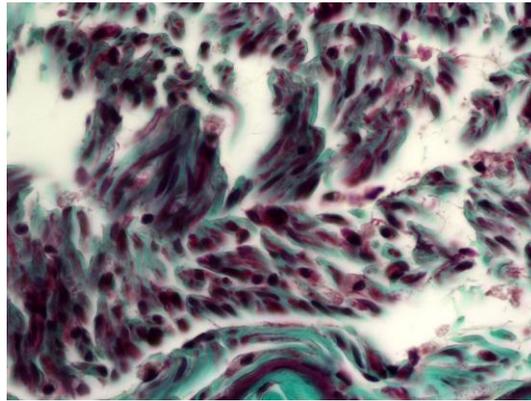


Figura 3. 52 **Tricrómico de Masson, la muerte de la célula de Schwann.**  
Fascículos con lo que parece citoplasmas de células de Schwann, que esperando a los axones que no llegan, se van muriendo.

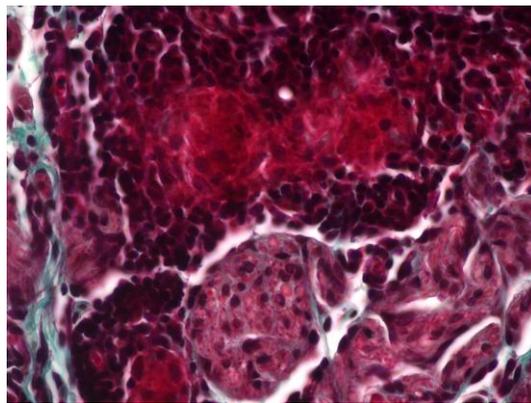


Figura 3. 53 **Tricrómico de Masson, fagocitación.**  
Fibras musculares degeneradas, que no portan axones y parecen ser fagocitadas (Tricrómico de Masson 40x).

Es difícil distinguir las diferentes coberturas de tejido conectivo que protegen y compartimentalizan la estructura nerviosa. Esta tinción permite observar el detalle de dichas coberturas, incluso a mayor aumento, del endoneuro.

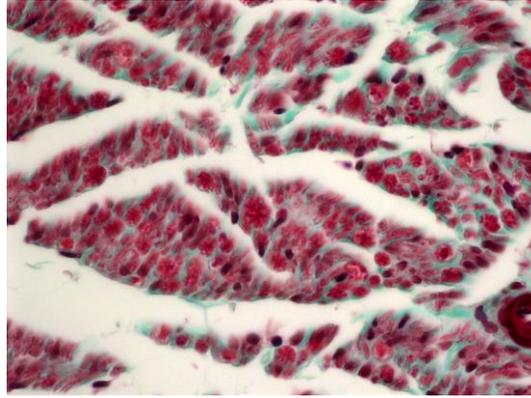


Figura 3. 54 **Tricrómico de Masson, el endoneuro.**

Sección de nervio distal, donde se observa la cobertura nerviosa más interna, el endoneuro de las fibras nerviosas (Tricrómico de Masson 40x).

Se descubren zonas de algunas secciones con características peculiares, como aquellas en las que destaca la visualización de un proceso inflamatorio, con aumento de la celularidad y destacando las células defensivas.

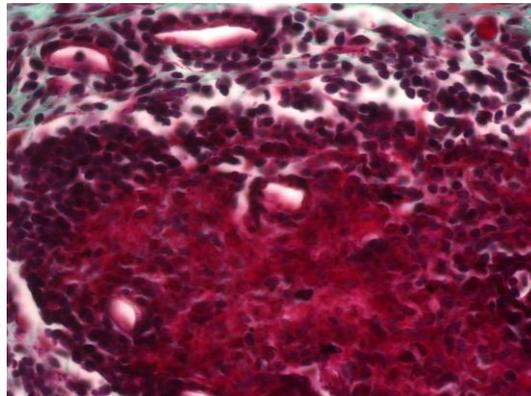


Figura 3. 55 **Tricrómico de Masson, inflamación.**

Celularidad aumentada a base de linfocitos, macrófagos y células cebadas (Tricrómico de Masson 40x).

Uno de los detalles mejor visualizados con esta tinción es la interdigitación de fibras nerviosas dentro del injerto muscular descelularizado, en aquellos casos en los que el injerto no fue sólo empleado como estructura de soporte para el avance de los axones.

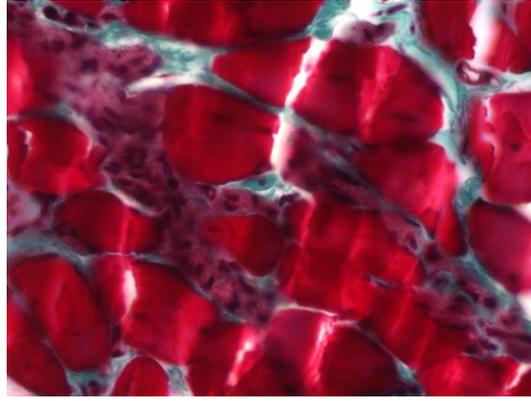


Figura 3. 56 **Tricrómico de Masson, inclusiones nerviosas en el músculo.**  
Interdigitación de fibras nerviosas entre las fibras acelulares del injerto muscular (Tricrómico de Masson 40x).

A veces, el proceso de talle de las secciones no se dirige bien y se detectan cortes oblicuos de la pieza, con lo que se pierde información porque unas fibras son cortadas transversales y otras longitudinales.



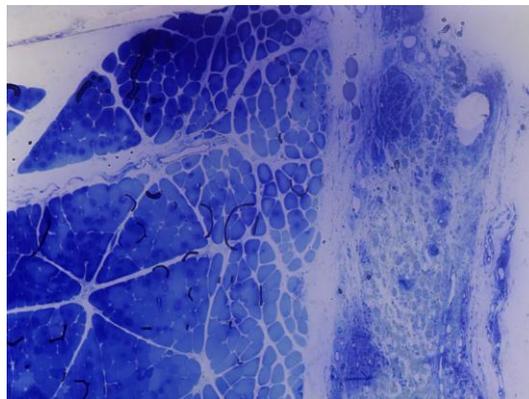
Figura 3. 57 **Tricrómico de Masson, corte oblicuo.**  
Sección oblicua de nervio, difícil de valorar (Tricrómico de Masson 40x).

### **Azul de toluidina**

El azul de toluidina es un colorante acidofílico y metacromático que pertenece al grupo de las tiacidas. Su característica principal es que tiñe selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como: sulfatos y radicales, fosfatos incorporados en el ADN y ARN de las células, tiñe el material nuclear de las lesiones malignas, pero no el de la mucosa normal. Esta sustancia no entra a la célula pero penetra en los surcos o depresiones de la mucosa y en los contornos de las elevaciones resaltando los cambios en la superficie mucosa.

Gracias a esta tinción, se han podido teñir los cortes semifinos incluidos en resina, de las secciones 2,4 y 6, para su visualización con microscopía óptica y electrónica.

Permite diferenciar el tejido muscular del nervioso en la observación rápida de las secciones a 5 aumentos con el microscopio de luz, para centrar la imagen antes de magnificar la escala microscópica.



**Figura 3. 58 Azul de toluidina, las estructuras.**

Nervio inmerso en conjuntivo, separado completamente del músculo (Azul de toluidina 5x).

Esta tinción también puede ser empleada como criterio de análisis del protocolo seleccionado para el proceso de descelularización del tejido muscular empleado como injerto.

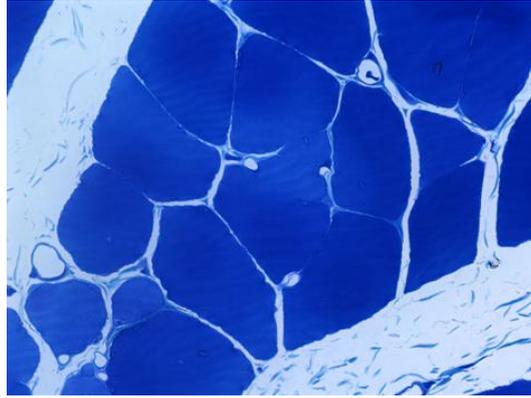


Figura 3. 59 **Azul de toluidina, método de descclularización.**

Músculo descclularizado pero persiste el citoesqueleto, como si estuviese desnucleado, sin membranas, sin organelas, con destrucción parcial de las vainas musculares de tejido conectivo, pero persistiendo la actomiosina (Azul de toluidina 40x).

Los axones del cabo distal luchan por encontrar su camino, dirigidos por la células de Schwann y promovidos por los factores de regeneración que avanzan retrógrada y anterógradamente.

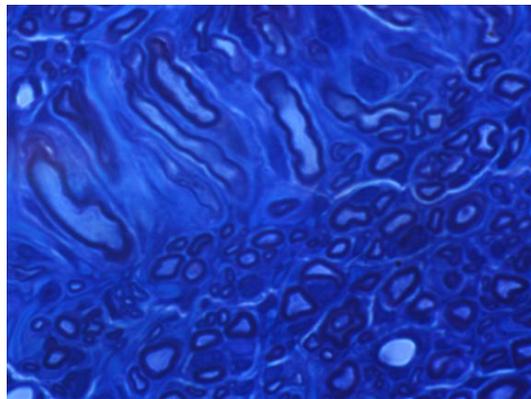


Figura 3. 60 **Azul de toluidina, trayectos nerviosos.**

Los axones siguen diferentes caminos, unos axones cortados transversales y otros longitudinales. El desorden está justificado: las fibras tienen avanzan anárquicamente como corresponde a un nervio regenerado, cuyas fibras están buscando aún su camino (Azul de toluidina, 100x).

Con el azul de toluidina en las cortes semifinos y a 40 aumentos, se pueden localizar y estudiar los componentes de la irrigación arteriolar, su distribución, el conectivo de su pared, su luz, en un tejido del cabo distal donde florece la neovascularización.

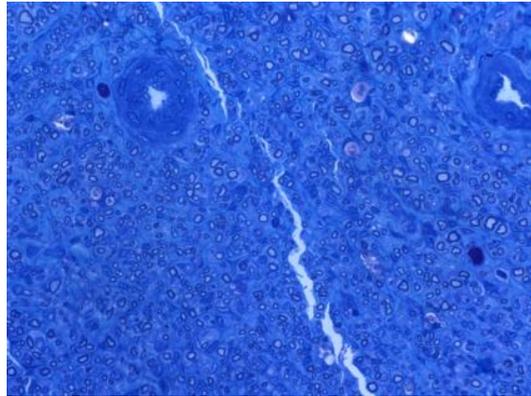


Figura 3. 61 **Azul de toluidina, neovascularización.**

Arteriolas de tamaño importante, que contrastan con los axones de pequeño calibre, en un territorio de fuerte tejido conectivo (Azul de toluidina 40x).

En algunas secciones centrales al nivel del injerto, se han detectado células pro-inflamatorias, como monocitos y macrófagos, encargados de la limpieza de la zona de restos de nervio degenerado.

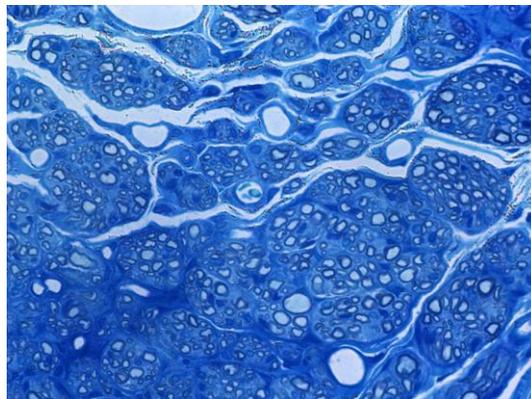


Figura 3. 62 **Azul de toluidina, células inflamatorias.**

Células de tipo monocito y macrófagos, demasiada celularidad para rodear los grupos pequeños de escasos axones (Azul de toluidina 40x).

En el caso número 8, se detectó a nivel del cabo distal, la presencia de células espumosas y macrófagos fagocitando los restos nerviosos, como signo de regeneración. Además, en estas secciones se localizaron multitud de cristales de grasa, parte de ellos, siendo procesados por dichas células.

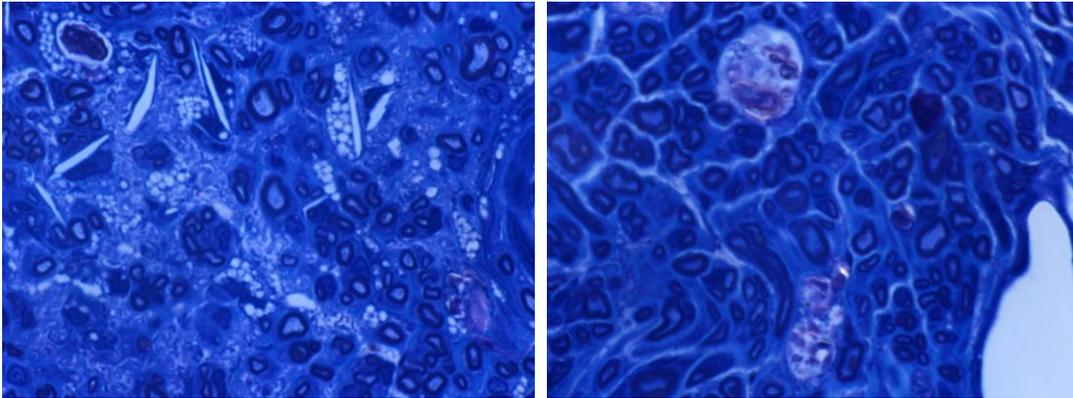


Figura 3. 63 **Azul de toluidina, cristales de grasa.**  
 A) Cristales de colesterol. B) Células espumosas (Azul de toluidina 100x).

Gracias a esta tinción, también se puede valorar la disposición ondulada de los axones en un corte longitudinal, su distribución no siempre simétrica a pesar de escoger una sección proximal al injerto, con vasos que portan la irrigación a zonas más distales.

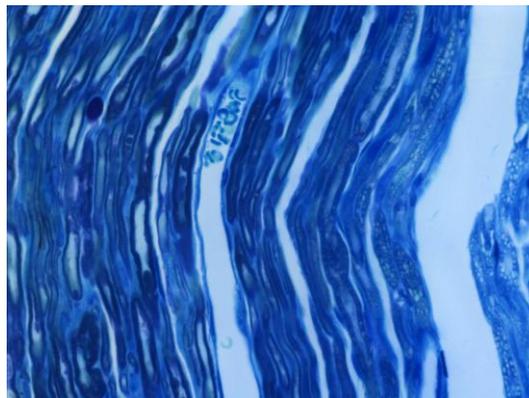


Figura 3. 64 **Azul de toluidina, corte longitudinal.**  
 Se observan las diferentes fibras nerviosas amielínicas, con mayor población central, agrupadas en pequeños fascículos. Se descubre un vaso con hematíes en su interior (Azul de toluidina 40x).

## 5.- DATOS CUANTITATIVOS HISTOLÓGICOS

A partir del conteo de los axones realizado a tres niveles en cada uno de los animales, obtenemos datos suficientes como para valorar el tamaño de las piezas, el conteo total de los axones y su densidad.

### ❖ *NÚMERO DE AXONES y DENSIDAD DE AXONES*

#### Sección 2

La sección o corte número 2 pertenece a la región proximal a la sección y por lo tanto, al injerto.

A este nivel, en el grupo control, el tamaño de las muestras es de 0.52 mm (0,42; 0,61). La densidad de los axones es de 11870 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 5651 (4720, 6575). Se contabilizan una media de 67 axones/campo.

En el grupo de casos, el tamaño de las muestras es de 0.54 mm (0,45; 0,59). La densidad de los axones es de 10757 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 5470 (487, 6236). Se contabilizan una media de 61 axones/campo.

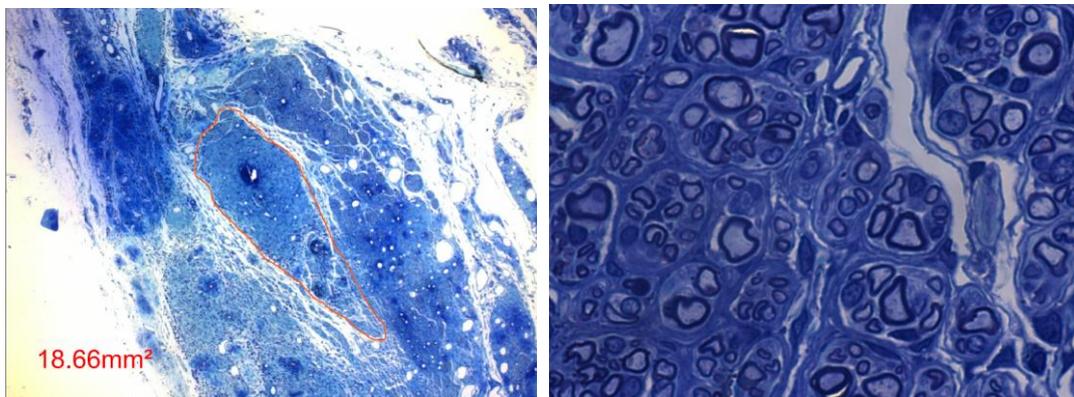


Figura 3. 65 **Número de axones grupo control, sección 2.**

A) Superficie a medir a 5x con el sistema AutoCad® 3D (Azul de toluidina 5x). B) Una de los 10 cortes seleccionados a ese nivel para el conteo de los axones (Azul de toluidina 100x).

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 2 tamaño</b>	10	0	,520920	,544100	,1229563	,3108	,6227	,422150	,608100
2 densidad	10	0	11870,4440	9167,7600	5820,92242	8361,59	22187,90	8729,5350	16362,6950
2 total axones	10	0	5651,00	5665,00	962,527	4549	6896	4720,00	6575,00
2 Ax/campo	10	0	67,6560	52,2500	33,17707	47,65	126,46	49,7500	93,2650
@2Axcampo2.1	10	0	39,40	42,00	16,742	13	54	24,00	53,50
@2Axcampo2.2	10	0	32,40	21,00	25,016	10	73	14,50	56,00
@2Axcampo2.3	10	0	48,80	63,00	27,041	13	74	20,00	70,50
@2Axcampo2.4	10	0	60,40	53,00	26,416	26	89	37,50	87,00
@2Axcampo2.5	10	0	60,00	57,00	11,619	48	79	51,50	70,00
@2Axcampo2.6	10	0	67,40	49,00	43,178	24	132	33,50	110,50
@2Axcampo2.7	10	0	76,00	54,00	44,760	32	144	42,50	120,50
@2Axcampo2.8	10	0	96,40	84,00	39,929	58	161	66,00	133,00
@2Axcampo2.9	10	0	98,60	70,00	75,603	48	232	54,50	157,00
@2Axcampo2.10	10	0	81,00	62,00	60,067	36	186	43,50	128,00

Tabla 3. 28 **Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, del corte 2 del grupo control.**

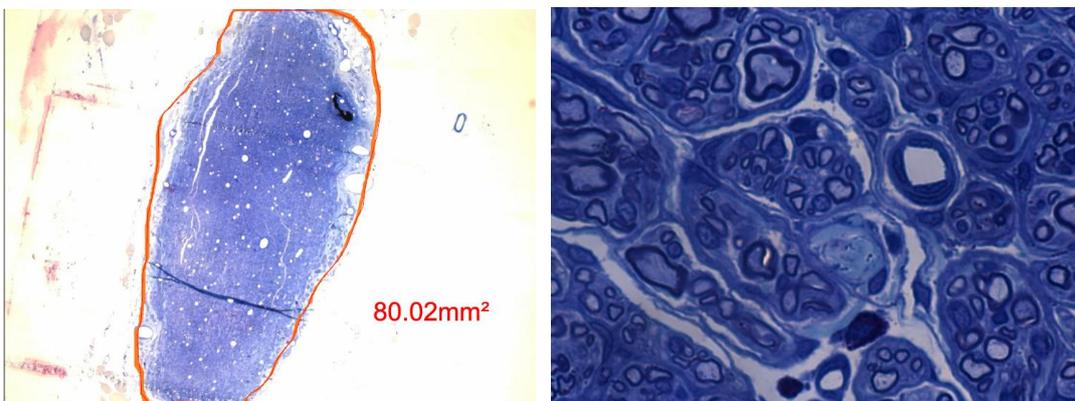


Figura 3. 66 **Número de axones grupo de casos, sección 2.**

A) Medición de la superficie del nervio en este corte (Azul de toluidina 5x). B) Contaje axonal en el campo a 100 aumentos (Azul de toluidina 100x).

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 2</b> tamaño	9	1	,542589	,531800	,1614401	,2988	,8904	,456650	,598200
2 densidad	9	1	10757,96 56	11323,81 00	3010,108 16	6709, 34	16231, 59	7870,01 50	12584,74 00
2 total axones	9	1	5470,00	5092,00	757,190	4487	6475	4878,50	6236,00
2 Ax/campo	9	1	61,3200	64,5400	17,15788	38,24	92,52	44,8600	71,7350
@2Axcampo2 .1	9	1	36,33	24,00	28,509	8	94	15,50	58,50
@2Axcampo2 .2	9	1	44,44	42,00	22,919	12	80	26,50	66,50
@2Axcampo2 .3	9	1	54,67	57,00	21,042	19	83	38,50	73,50
@2Axcampo2 .4	9	1	61,00	58,00	15,149	36	84	50,00	74,00
@2Axcampo2 .5	9	1	65,33	66,00	23,270	32	103	48,50	83,50
@2Axcampo2 .6	9	1	65,89	61,00	21,871	29	98	50,00	85,00
@2Axcampo2 .7	9	1	72,11	68,00	27,895	39	127	46,00	87,50
@2Axcampo2 .8	9	1	64,00	66,00	20,044	38	93	41,00	79,50
@2Axcampo2 .9	9	1	70,89	78,00	25,167	21	96	51,00	92,50
@2Axcampo2 .10	9	1	74,22	76,00	19,665	40	100	58,50	91,00

Tabla 3. 29 **Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 2, del grupo de casos.**

#### **Sección 4**

La sección o corte número 4 pertenece a la región de la sección nerviosa y justamente a ese nivel se localiza el injerto acelular de músculo puenteando la lesión.

A este nivel, en el grupo control, el tamaño de las muestras es de 0.53 mm (0,25; 0,77). La densidad de los axones es de 11150 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 4143 (3049, 5548). Se contabilizan una media de 63 axones/campo.

En el grupo de casos, el tamaño de las muestras es de 0.48 mm (0,37; 0,63). La densidad de los axones es de 11186 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 4385 (3470, 5253). Se contabilizan una media de 64 axones/campo.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 4 tamaño</b>	10	0	,536500	,634200	,2755727	,2100	,8649	,251650	,772500
4 densidad	10	0	11150,4160	8522,5500	9546,10191	3102,09	27104,76	4061,7050	19553,0600
4 total axones	10	0	4143,00	3520,00	1326,816	2683	5692	3049,00	5548,50
4 Ax/campo cv	10	0	63,5540	48,5600	54,41991	17,68	154,51	23,1500	111,4550
@4Axcampcv 4.1	10	0	21,40	23,00	12,137	8	35	9,00	33,00
@4Axcampcv 4.2	10	0	31,80	37,00	14,873	11	49	17,00	44,00
@4Axcampcv 4.3	10	0	55,20	46,00	48,982	13	137	18,00	97,00
@4Axcampcv 4.4	10	0	43,20	48,00	19,123	19	64	23,50	60,50
@4Axcampcv 4.5	10	0	63,00	54,00	47,864	24	142	25,50	105,00
@4Axcampcv 4.6	10	0	69,40	63,00	52,396	28	157	29,00	113,00
@4Axcampcv 4.7	10	0	92,80	73,00	86,216	27	243	37,00	158,50
@4Axcampcv 4.8	10	0	81,20	62,00	70,744	13	198	29,00	143,00
@4Axcampcv 4.9	10	0	96,60	37,00	120,587	9	304	21,50	201,50
@4Axcampcv 4.10	10	0	76,20	28,00	92,370	5	232	16,50	160,00

Tabla 3. 30 **Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 4, del grupo control.**

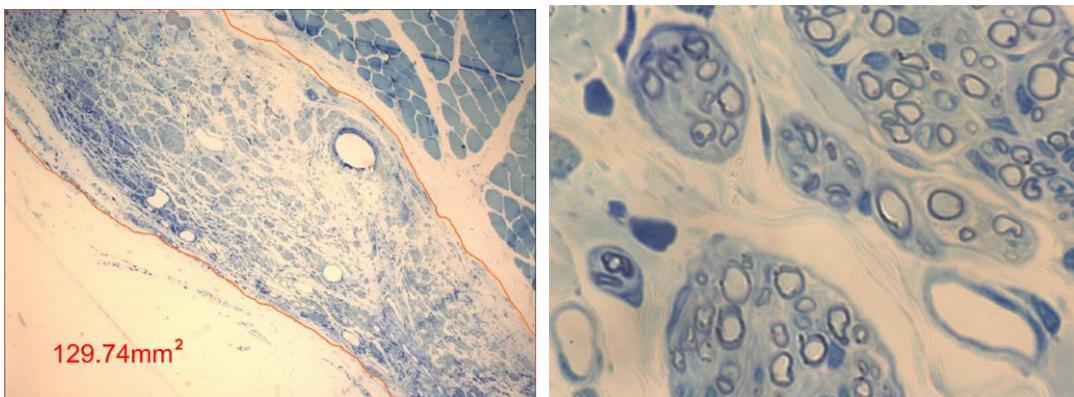


Figura 3. 67 **Número de axones grupo control, sección 4.**

A) Superficie a medir a 5x con el sistema AutoCad® 3D (Azul de toluidina 5x). B) Una de los 10 cortes seleccionados a ese nivel para el conteaje de los axones (Azul de toluidina 100x).

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 4 tamaño</b>	9	1	,478933	,483200	,1807473	,1244	,7132	,372400	,628750
4 densidad	9	1	11186,3422	9125,0400	6881,32490	5349,97	27717,04	6831,2500	13070,2800
4 total axones	9	1	4385,00	4006,00	951,475	3302	5786	3470,50	5253,50
4 Ax/campo cv	9	1	63,7678	52,0100	39,23319	30,50	158,02	38,9400	74,5050
@4Axcampocv 4.1	9	1	47,44	39,00	42,057	9	150	19,50	57,50
@4Axcampocv 4.2	9	1	51,44	43,00	44,393	8	158	21,50	63,00
@4Axcampocv 4.3	9	1	62,89	47,00	36,832	29	147	37,50	82,00
@4Axcampocv 4.4	9	1	61,33	51,00	42,092	22	161	35,00	72,50
@4Axcampocv 4.5	9	1	61,00	46,00	40,626	19	158	43,00	73,50
@4Axcampocv 4.6	9	1	72,22	63,00	47,654	15	170	37,00	97,50
@4Axcampocv 4.7	9	1	75,56	75,00	41,561	31	167	42,00	92,00
@4Axcampocv 4.8	9	1	72,44	64,00	42,149	32	157	42,50	98,00
@4Axcampocv 4.9	9	1	70,22	56,00	41,182	32	157	41,50	98,50
@4Axcampocv 4.10	9	1	60,00	49,00	43,792	12	155	31,00	83,50

Tabla 3. 31 **Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 4, del grupo de casos.**

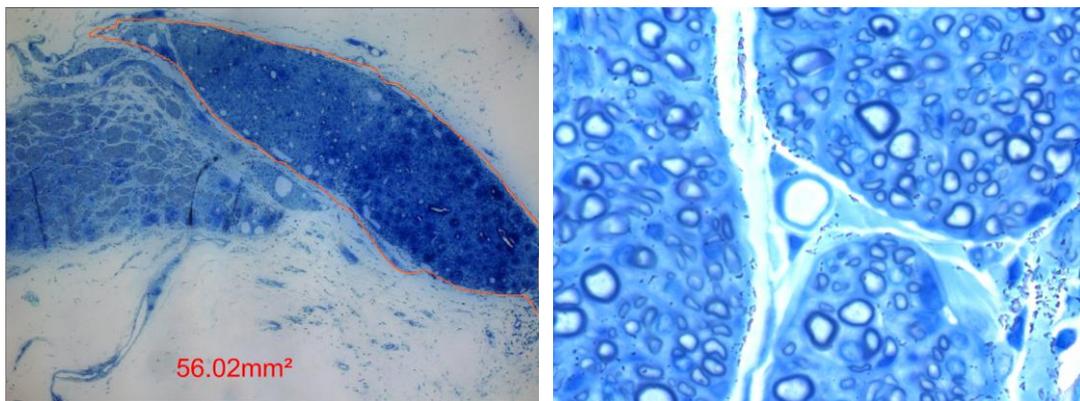


Figura 3. 68 **Número de axones grupo de casos, sección 4.**

A) Medición de la superficie del nervio en este corte de toluidina 5x). B) Contaje axonal en el campo a 100 aumentos (Azul de toluidina 100x).

**Sección 6**

La sección o corte número 6 pertenece a la región distal a la sección y por lo tanto, al injerto, justo antes de la división del nervio ciático en sus dos troncos principales.

A este nivel, en el grupo control, el tamaño de las muestras es de 0.35 mm (0,26; 0,46). La densidad de los axones es de 9999 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 3183 (2032, 4050). Se contabilizan una media de 62 axones/campo.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 6 tamaño</b>	10	0	,352340	,312700	,1158877	,2285	,5335	,264100	,460400
6 densidad	10	0	9999,0880	7029,0500	5452,31980	5628,71	18026,26	5828,4250	15654,7700
6 total axones	10	0	3183,00	3750,00	1063,626	1885	4119	2032,50	4050,00
6 Ax/campo	10	0	62,1740	60,2800	28,40374	32,08	102,74	36,0700	89,2250
@6Axcampo6 .1	10	0	27,40	23,00	21,232	8	56	8,00	49,00
@6Axcampo6 .2	10	0	35,00	29,00	28,346	15	84	15,50	57,50
@6Axcampo6 .3	10	0	54,20	47,00	31,420	25	101	27,00	85,00
@6Axcampo6 .4	10	0	59,40	44,00	31,628	31	107	35,00	91,50
@6Axcampo6 .5	10	0	61,40	42,00	32,761	36	111	37,50	95,00
@6Axcampo6 .6	10	0	58,80	44,00	34,339	27	105	30,00	95,00
@6Axcampo6 .7	10	0	64,40	49,00	33,193	31	103	36,50	100,00
@6Axcampo6 .8	10	0	68,20	54,00	40,493	23	123	34,00	109,50
@6Axcampo6 .9	10	0	66,00	59,00	32,718	34	113	37,00	98,50
@6Axcampo6 .10	10	0	71,20	61,00	33,589	43	123	43,50	104,00

Tabla 3. 32 **Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 6, del grupo control.**

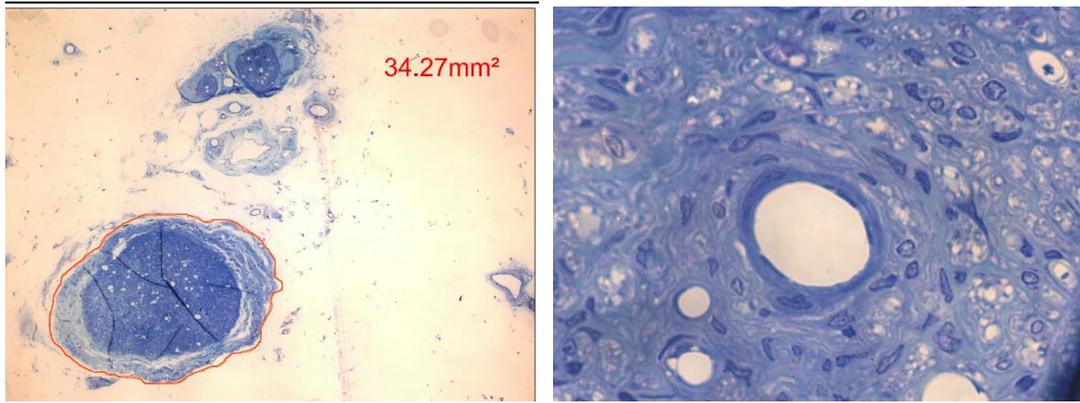


Figura 3. 69 **Número de axones grupo control, sección 6.**

A) Superficie a medir a 5x con el sistema AutoCad® 3D (Azul de toluidina 5x). B) Una de los 10 cortes seleccionados a ese nivel para el conteaje de los axones (Azul de toluidina 100x).

En el grupo de casos, el tamaño de las muestras es de 0.41 mm (0,31; 0,49). La densidad de los axones es de 11121 axones/mm<sup>2</sup>, con una media de axones totales de 3552 (2887, 4317). Se contabilizan una media de 63 axones/campo.

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>CORTE 6 tamaño</b>	9	1	,410700	,330700	,2314497	,1298	,9532	,308500	,487500
6 densidad	9	1	11121,2478	8917,4500	6357,96835	2963,70	25038,52	7377,4700	14355,7650
6 total axones	9	1	3552,00	3250,00	738,587	2732	4484	2887,00	4317,00
6 Ax/campo	9	1	63,3922	50,8300	36,24288	16,89	142,73	42,0550	81,8250
@6Axcampo6.1	9	1	47,44	34,00	46,193	5	150	12,00	73,00
@6Axcampo6.2	9	1	53,78	39,00	40,810	16	142	26,50	79,50
@6Axcampo6.3	9	1	60,78	53,00	32,264	26	119	34,50	89,00
@6Axcampo6.4	9	1	66,00	58,00	37,477	21	140	33,00	91,00
@6Axcampo6.5	9	1	62,78	59,00	39,704	15	148	32,50	80,00
@6Axcampo6.6	9	1	66,22	68,00	36,089	10	138	41,00	81,00
@6Axcampo6.7	9	1	71,56	67,00	42,161	9	143	37,50	103,00
@6Axcampo6.8	9	1	62,78	48,00	41,940	15	142	37,50	96,00
@6Axcampo6.9	9	1	68,89	58,00	40,126	18	149	39,00	92,50
@6Axcampo6.10	9	1	69,22	55,00	39,566	16	149	45,50	97,50

Tabla 3. 33 **Análisis descriptivo de la sección 6, del grupo de casos.**

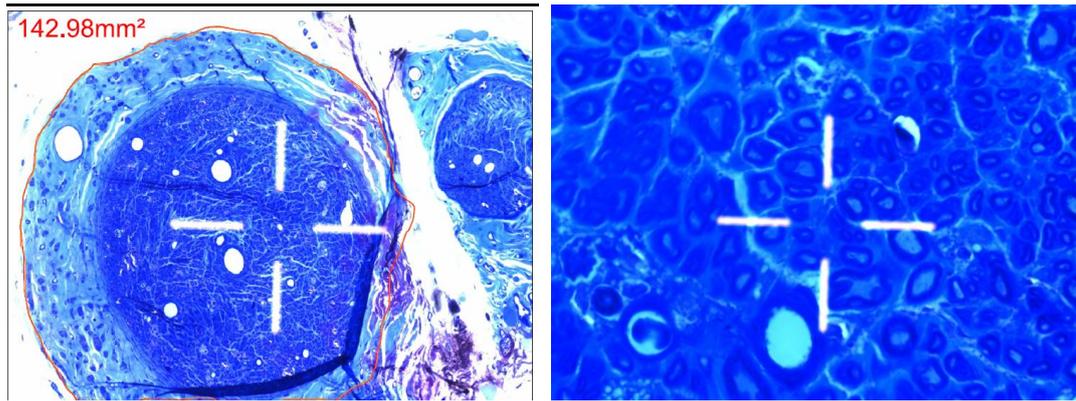


Figura 3. 70 Número de axones grupo de casos, sección 6.

A) Medición de la superficie del nervio en este corte (Azul de toluidina 5x). B) Contaje axonal en el campo a 100 aumentos (Azul de toluidina 100x).

A continuación, se exponen los resultados de la prueba T de muestras independientes para la igualdad de medias, de cada uno de los parámetros analizados previamente por separado: las diferencias no son estadísticamente significativas.

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba T para la igualdad de medias			
				95% IC para la diferencia
	Sig. (bilateral)	Difer. medias	Inferior	Superior
<b>CORTE 2</b> tamaño	0,800	-0,02	-0,20	0,16
2 densidad	0,641	1112,48	-3947,38	6172,33
2 total axones	0,703	181,00	-829,25	1191,25
2 Ax/campo	0,641	6,34	-22,50	35,18
<b>CORTE 4</b> tamaño	0,643	0,06	-0,21	0,32
4 densidad	0,994	-35,93	-9600,79	9528,94
4 total axones	0,698	-242,00	-1567,91	1083,91
4 Ax/campo cv	0,993	-0,21	-54,74	54,32
<b>CORTE 6</b> tamaño	0,611	-0,06	-0,30	0,19
6 densidad	0,746	-1122,16	-8500,29	6255,97
6 total axones	0,457	-369,00	-1414,97	676,97
6 Ax/campo	0,950	-1,22	-42,33	39,90

Tabla 3. 34 Análisis comparativo por secciones de los dos grupos.

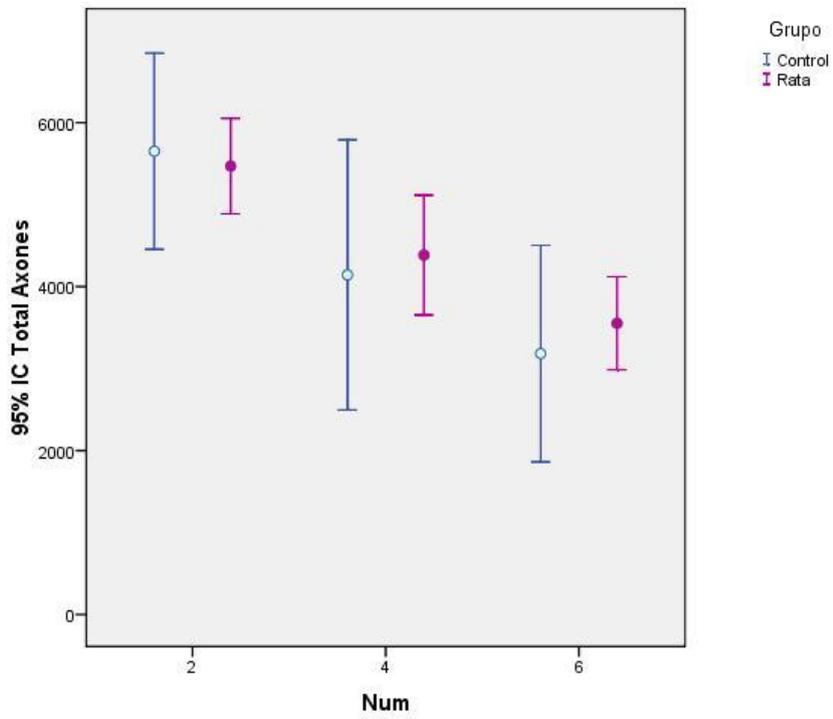
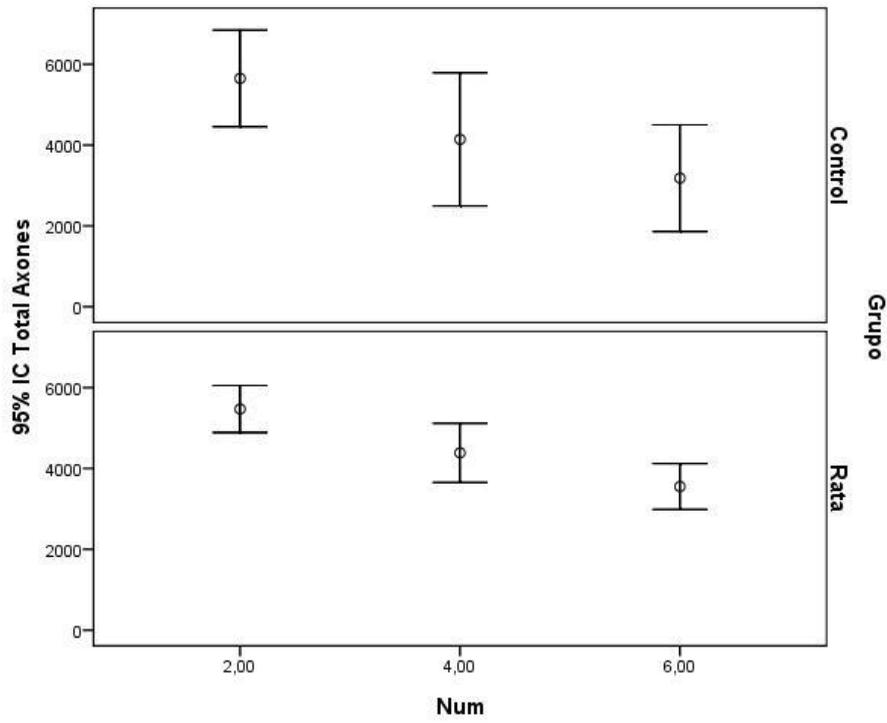


Figura 3. 71 Representación gráfica de la distribución del total de axones.

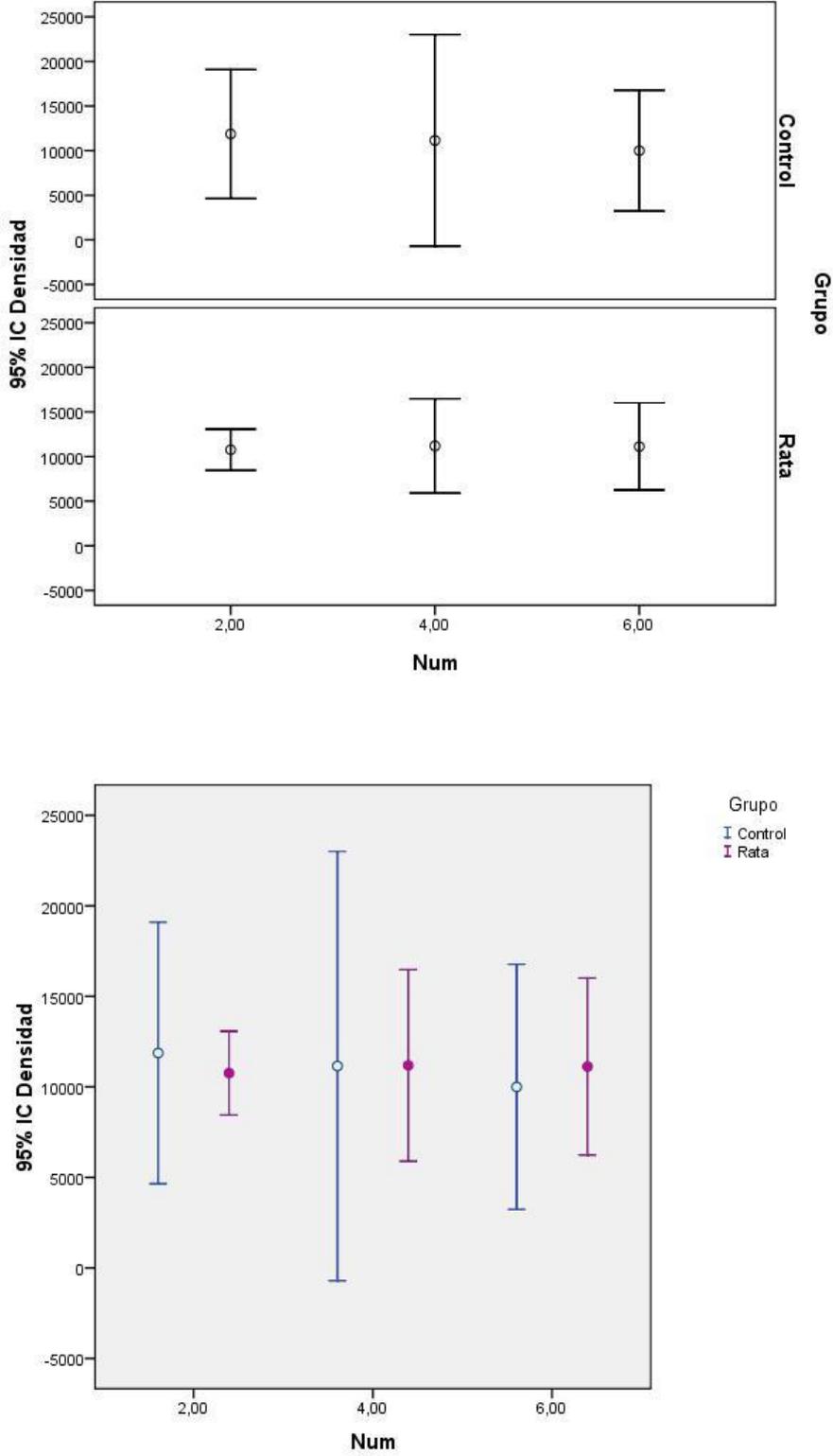


Figura 3. 72 Representación gráfica de la distribución de la densidad de axones.

### ❖ *DIÁMETRO DE LOS AXONES*

Nuestra serie presenta una gran variedad de diámetros de fibras nerviosas, no encontrándose diferencias reseñables entre los dos grupos. Esto puede ser, lo primero, porque en muchos cortes, no se logra tallar todas las piezas absolutamente perpendiculares al diámetro axial del axón y, segundo, porque los axones no siguen una distribución paralela, sino que buscan su camino mezclando sus direcciones, ocupando diferentes espacios y relacionándose entre sí.

La media de los diámetros tampoco es una cifra significativa, por la gran variedad entre fibras, dentro de la misma sección (0,071  $\mu\text{m}$  de media). No se logra descifrar ningún tipo de distribución de las mismas; sí que hemos detectado que en ambos grupos, el número de fibras nerviosas es inferior en los campos más periféricos, pero sin embargo, no se observa que a este nivel la diferencia en el diámetro medio de los axones sea significativa, respecto al diámetro medio de los campos centrales.

### ❖ *ESPESOR DE LA MIELINA*

Para el cálculo del espesor de la mielina, desarrollamos un protocolo similar al conteo de axones, recogiendo de las diez fotos de campo aleatorias, la media del diámetro de la vaina de mielina.

Se exponen a continuación los resultados de la recogida de estos datos, a nivel de las secciones 2, 4 y 6, todas ellas de cortes semifinos.

## Sección 2

A nivel de la sección 2, previo al injerto, la mielina media en los controles es de 0,000602 mm (0,00056-0,000635), con valor máximo de 0,00064. En los casos, el valor medio es de 0,00062 (0,00061-0,000625) mm.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.2 mielina</b>	10	0	,0006020	,0006100	,00003962	,00054	,00064	,0005650	,0006350
Mielina2_1	10	0	,0005980	,0005900	,00002775	,00057	,00064	,0005750	,0006250
Mielina2_2	10	0	,0006060	,0006300	,00003286	,00057	,00063	,0005700	,0006300
Mielina2_3	10	0	,0006000	,0005900	,00003873	,00056	,00065	,0005650	,0006400
Mielina2_4	10	0	,0006180	,0006100	,00004604	,00057	,00069	,0005800	,0006600
Mielina2_5	10	0	,0006040	,0006200	,00005983	,00051	,00067	,0005500	,0006500
Mielina2_6	10	0	,0005840	,0006000	,00005683	,00051	,00064	,0005250	,0006350
Mielina2_7	10	0	,0005860	,0005900	,00004159	,00054	,00064	,0005450	,0006250
Mielina2_8	10	0	,0006060	,0006100	,00004159	,00056	,00067	,0005700	,0006400
Mielina2_9	10	0	,0005780	,0005900	,00011987	,00040	,00070	,0004650	,0006850
Mielina2_10	10	0	,0006220	,0006300	,00011819	,00044	,00074	,0005150	,0007250

Tabla 3. 35 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 2 del grupo control.

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.2 mielina</b>	9	1	,0006200	,0006200	,00001871	,00059	,00066	,0006100	,0006250
Mielina2_1	9	1	,0006044	,0006000	,00001878	,00057	,00063	,0005950	,0006200
Mielina2_2	9	1	,0006000	,0006000	,00002828	,00056	,00064	,0005700	,0006250
Mielina2_3	9	1	,0006111	,0006000	,00003586	,00055	,00068	,0005950	,0006300
Mielina2_4	9	1	,0006211	,0006300	,00005134	,00054	,00072	,0005800	,0006400
Mielina2_5	9	1	,0006144	,0006300	,00003972	,00055	,00066	,0005750	,0006450
Mielina2_6	9	1	,0006344	,0006300	,00002186	,00060	,00067	,0006200	,0006500
Mielina2_7	9	1	,0006200	,0006200	,00002345	,00059	,00066	,0006000	,0006400
Mielina2_8	9	1	,0006322	,0006300	,00002224	,00060	,00067	,0006150	,0006500
Mielina2_9	9	1	,0006289	,0006200	,00005278	,00057	,00071	,0005800	,0006850
Mielina2_10	9	1	,0006322	,0006200	,00003193	,00059	,00068	,0006100	,0006650

Tabla 3. 36 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 2 del grupo de casos.

### Sección 4

A nivel de la sección cuatro, a nivel del injerto, la mielina media en los controles es de 0,000336 mm (0,00032-0,000355), con valor máximo de 0,00036. En los casos, el valor medio es de 0,00039 (0,000375-0,000405) mm.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.4 mielina</b>	10	0	,0003360	,0003300	,00001817	,00032	,00036	,0003200	,0003550
Mielina4_1	10	0	,0003200	,0003000	,00003937	,00030	,00039	,0003000	,0003500
Mielina4_2	10	0	,0003360	,0003100	,00006427	,00030	,00045	,0003000	,0003850
Mielina4_3	10	0	,0002800	,0002900	,00009000	,00013	,00037	,0002100	,0003450
Mielina4_4	10	0	,0003520	,0003600	,00003033	,00032	,00038	,0003200	,0003800
Mielina4_5	10	0	,000332	,000330	,0000311	,0003	,0004	,000305	,000360
Mielina4_6	10	0	,0003300	,0003300	,00003391	,00029	,00038	,0003000	,0003600
Mielina4_7	10	0	,0003400	,0003300	,00001871	,00032	,00036	,0003250	,0003600
Mielina4_8	10	0	,0003300	,0003200	,00001732	,00032	,00036	,0003200	,0003450
Mielina4_9	10	0	,0003760	,0003600	,00005177	,00032	,00046	,0003400	,0004200
Mielina4_10	10	0	,0003580	,0003600	,00003899	,00032	,00041	,0003200	,0003950

Tabla 3. 37 **Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 4 del grupo control.**

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.4 mielina</b>	9	1	,0003900	,0003900	,00002236	,00036	,00043	,0003750	,0004050
Mielina4_1	9	1	,0003989	,0004000	,00000782	,00039	,00041	,0003900	,0004050
Mielina4_2	9	1	,0003922	,0003900	,00003073	,00036	,00045	,0003650	,0004150
Mielina4_3	9	1	,0003767	,0003700	,00003742	,00032	,00046	,0003600	,0003850
Mielina4_4	9	1	,0003811	,0003900	,00002804	,00034	,00043	,0003550	,0003900
Mielina4_5	9	1	,000394	,000390	,0000288	,0004	,0004	,000370	,000430
Mielina4_6	9	1	,0003833	,0003900	,00003841	,00030	,00042	,0003650	,0004200
Mielina4_7	9	1	,0004067	,0004100	,00002062	,00038	,00045	,0003900	,0004150
Mielina4_8	9	1	,0004032	,0004000	,00003906	,00035	,00048	,0003750	,0004250
Mielina4_9	9	1	,0003767	,0003800	,00004243	,00032	,00045	,0003400	,0004100
Mielina4_10	9	1	,0003544	,0003600	,00003468	,00030	,00041	,0003250	,0003800

Tabla 3. 38 **Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 4 del grupo de casos.**

## Sección 6

A nivel de la sección seis, distal al injerto, la mielina media en los controles es de 0,00042 mm (0,000395-0,000445), con valor máximo de 0,00046. En los casos, el valor medio es de 0,0005389 (0,00053-0,000545) mm.

CONTROLES	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.6 mielina</b>	10	0	,0004200	,0004200	,00002739	,00039	,00046	,0003950	,0004450
Mielina6_1	10	0	,000392	,000370	,0000349	,0004	,0005	,000370	,000425
Mielina6_2	10	0	,0004020	,0003900	,00004817	,00035	,00047	,0003600	,0004500
Mielina6_3	10	0	,0003800	,0003600	,00005958	,00031	,00047	,0003350	,0004350
Mielina6_4	10	0	,0004340	,0004100	,00006189	,00037	,00050	,0003800	,0005000
Mielina6_5	10	0	,0004460	,0004300	,00004099	,00041	,00049	,0004100	,0004900
Mielina6_6	10	0	,0004140	,0004100	,00002881	,00039	,00046	,0003900	,0004400
Mielina6_7	10	0	,0004340	,0004300	,00004722	,00037	,00050	,0003950	,0004750
Mielina6_8	10	0	,00	,00	,000	0	0	,00	,00
Mielina6_9	10	0	,00	,00	,000	0	0	,00	,00
Mielina6_10	10	0	,0003940	,0004200	,00005639	,00033	,00046	,0003350	,0004400

Tabla 3. 39 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 6 del grupo control.

CASOS	N		Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles	
	Válidos	Perdidos						25	75
<b>C.6 mielina</b>	9	1	,0005389	,0005400	,00001054	,00053	,00056	,0005300	,0005450
Mielina6_1	9	1	,000527	,000530	,0000200	,0005	,0006	,000505	,000545
Mielina6_2	9	1	,0005389	,0005400	,00003516	,00050	,00060	,0005000	,0005650
Mielina6_3	9	1	,0004940	,0005400	,00016812	,00006	,00061	,0005050	,0005800
Mielina6_4	9	1	,0005567	,0005600	,00004528	,00048	,00061	,0005250	,0006050
Mielina6_5	9	1	,0005678	,0005600	,00003153	,00053	,00061	,0005400	,0006050
Mielina6_6	9	1	,0005589	,0005400	,00003060	,00053	,00061	,0005350	,0005900
Mielina6_7	9	1	,0005178	,0005300	,00005585	,00040	,00060	,0004900	,0005450
Mielina6_8	9	1	,00	,00	,000	0	0	,00	,00
Mielina6_9	9	1	,00	,00	,000	0	0	,00	,00
Mielina6_10	9	1	,0005233	,0005400	,00003041	,00047	,00056	,0004950	,0005400

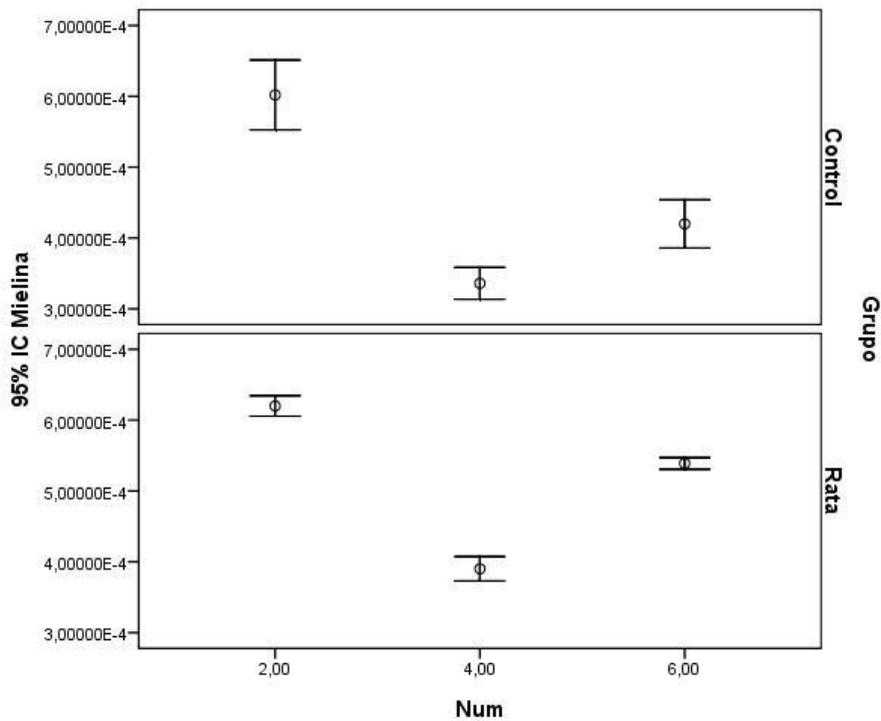
Tabla 3. 40 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en los cortes 6 del grupo de casos.

A continuación, se exponen los resultados de la prueba T de muestras independientes para la igualdad de medias: existen diferencias estadísticamente significativas en el espesor de la mielina de los cortes a nivel del injerto y en el cabo distal.

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba T para la igualdad de medias			
			95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
<b>C.2 mielina</b>	0,263	-0,0000180	-0,0000514	0,0000154
<b>C.4 mielina</b>	0,001	-0,0000540	-0,0000796	-0,0000284
<b>C.6 mielina</b>	0,000	-0,000119	-0,000141	-0,000097

Tabla 3. 41 **Análisis comparativo del espesor de la mielina en ambos grupos.**



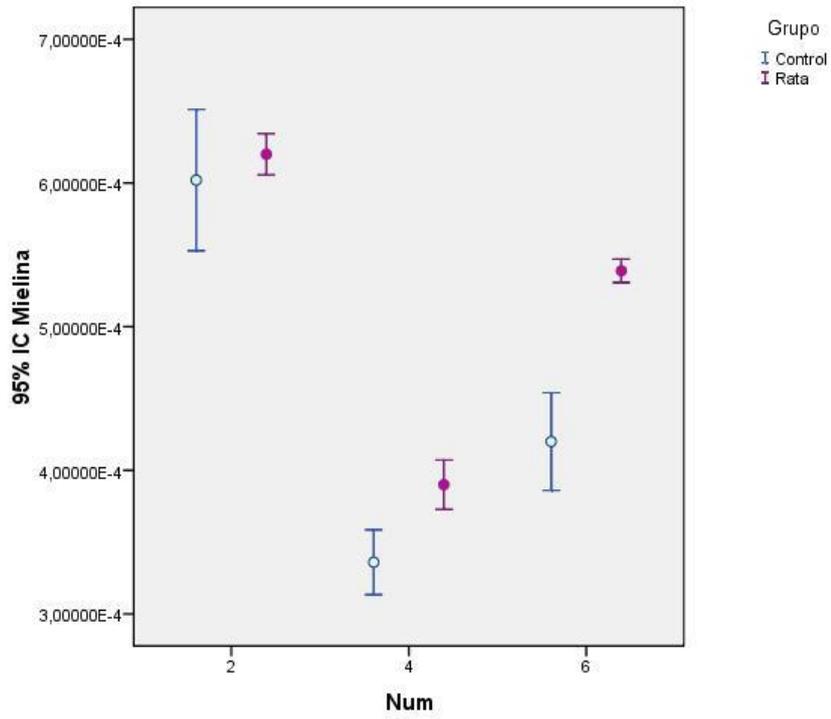


Figura 3. 73 Representación gráfica de la distribución del espesor de la mielina.

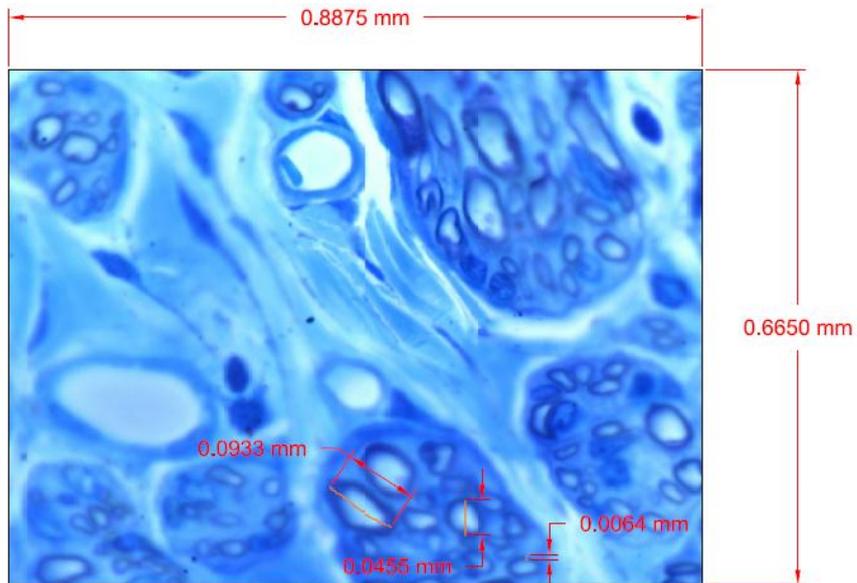
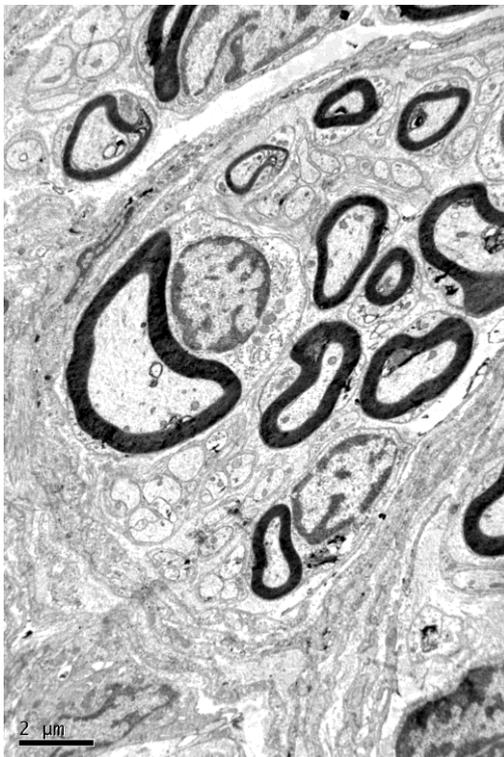


Figura 3. 74 Diámetro del axón y espesor de la mielina.

Cálculo mediante el software AutoCad® 3D del diámetro medio de los axones y del espesor de la mielina, en las secciones 2, 4, y 6 (Azul de toluidina 100x).

## 6.- APORTACIÓN DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El injerto de nervio regenerado muestra las características típicas de las fibras mielínicas y amielínicas. Las fibras mielínicas presentan un tamaño variado, todas ellas dentro del mismo fascículo nervioso.



**Figura 3. 75 Microscopía electrónica: la fibra mielínica**

Imagen ultraestructural de un fascículo nervioso en regeneración. Se distingue la característica variedad de tamaños de las fibras mielínicas. Las fibras nerviosas mielínicas muestran una relación normal con las células de Schwann, algunos de cuyos núcleos aparecen en esta sección. Se distinguen haces de fibras nerviosas amielínicas, rodeadas por citoplasma de células de Schwann. Aumentos 10000x.

Con microscopía electrónica, las fibras mielínicas se distinguen bien por la vaina de mielina que las rodea, aunque el núcleo de la célula de Schwann se encuentra sólo en algunas secciones, en otras sólo observamos una sección de su membrana. Las células de Schwann muestran sus características típicas: retículo endoplásmico rugoso abundante, poliribosomas libres, mitocondrias, y un núcleo de cromatina con algunas condensaciones cercanas a la membrana celular.



Figura 3. 76 **Microscopía electrónica: la célula de Schwann.**

Detalle de una fibra mielínica de la figura anterior. El núcleo de la célula de Schwann muestra una cromatina laxa con algunos acúmulos subnucleolemales. El citoplasma muestra una equilibrada proporción de organelas con algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y poliribosomas libres. Aumentos 20000x.

La mielina presenta, dependiendo del plano de sección de la vaina de mielina, una clara organización en capas concéntricas sobre todo en las secciones más perpendiculares al eje mayor. En algunas zonas, se pueden observar dilataciones de la vaina de mielina que contienen citoplasma *cisuras de schmidt lantermann*.



Figura 3. 77 **Microscopía electrónica: cisuras de schmidt lantermann.**

Fibra nerviosa mielínica rodeada por su célula de Schwann correspondiente. Por fuera de la membrana celular, se halla una lámina basal que separa el conjunto de célula y fibra, del tejido conjuntivo endoneural. En una zona de la vaina de mielina, se distinguen dilataciones que contienen citoplasma denominadas *cisuras de schmidt lantermann*. En el citoplasma de la fibra nerviosa, además de algunas mitocondrias, se distinguen neurofilamentos y neurotúbulos. Aumentos 40000x.

Las fibras amielínicas, que no se ven con microscopía de luz, se observan en el microscopio electrónico, con su característica habitual: envolturas de citoplasma de células de Schwann rodeando los haces de fibras nerviosas, pero sin formar mielina. Miden una décima parte de las fibras de mielina. Aunque de menor tamaño, las fibras amielínicas tienen la misma microestructura que las miélicas: neurotúbulos, neurofilamentos y alguna mitocondria.

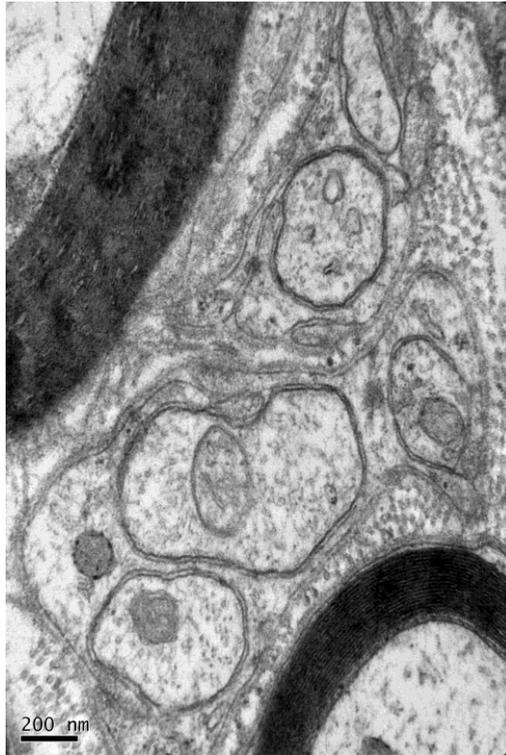


Figura 3. 78 **Microscopía electrónica: la fibra amielínica.**

Fibras amielínicas rodeadas por el citoplasma de la célula de Schwann. Cada grupo de fibras con su célula de Schwann, se halla rodeada por una lámina basal. En el espacio conjuntivo endoneural, se distinguen abundantes fibras de colágeno cortadas transversalmente. En el ángulo inferior derecho, se distingue la estructura laminar de una vaina de mielina. Aumentos 80000x.

Ambos tipos de fibras, están separadas del tejido conjuntivo por una lámina basal que rodea la membrana de la célula de Schwann. Por fuera de la lámina basal, se halla el espacio conjuntivo en el que se pueden distinguir haces de fibras de colágeno, fibroblastos endoneurales y vasos sanguíneos. Los fibroblastos endoneurales se caracterizan por tener un núcleo de cromatina agrupado en acúmulos submembranales, y un citoplasma no muy abundante con numerosos polirribosomas libres y cisternas del retículo endoplasmático rugoso. Las prolongaciones de estas células son muy delgadas y rodean a veces con varias capas los fascículos de fibras nerviosas miélicas y amielínicas.

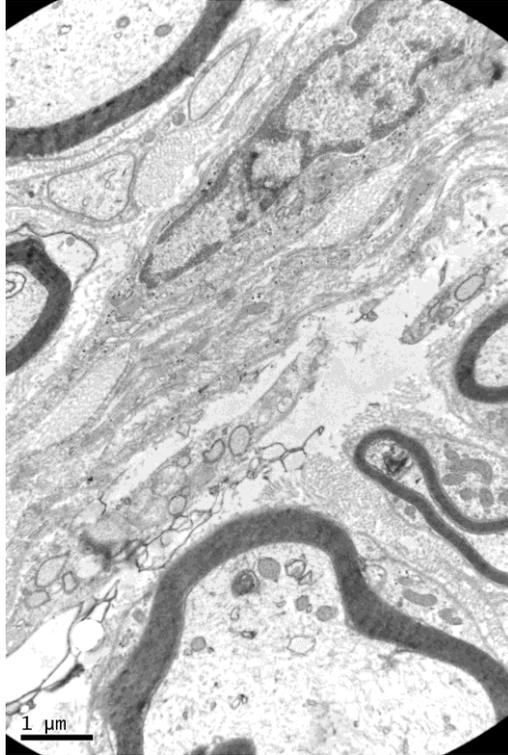


Figura 3. 79 **Microscopía electrónica: los fibroblastos endoneurales.**

Envoltura endoneural de un fascículo nervioso en regeneración. Rodeando las fibras mielínicas y amielínicas se distinguen el núcleo de un fibroblasto endoneural, de forma alargada que emite prolongaciones largas y delgadas para rodear junto con otras prolongaciones similares, las fibras nerviosas. Obsérvese la abundancia de fibras de colágena entre las prolongaciones de las fibras endoneurales. Aumentos 40000x.

Ultraestructuralmente, no se detectan diferencias significativas entre las secciones 4 (semifinos a nivel del injerto) y las secciones 6 (semifinos distales al injerto), analizadas por microscopía electrónica, en ninguno de los dos grupos de estudio. Así, pensamos que los 90 días de evolución de esta reparación nerviosa son suficientes para que los axones que comienzan a regenerarse a nivel proximal, alcancen el cabo distal.



## *DISCUSIÓN*

---



- 1.- JUSTIFICACIÓN DEL PLAN DE EXPERIMENTACIÓN**
- 2.- EVALUACIÓN POSTOPERATORIA DE LA REGENERACIÓN DESPUÉS DE LA LESIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO**
- 3.- RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOCOMOCIÓN**
- 4.- HISTOMORFOMETRÍA: HALLAZGOS MICROSCÓPICOS**
- 5.- FACTORES PRONÓSTICO EN LA REGENERACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO**
- 6.- EL PAPEL DE LA LÁMINA BASAL**
- 7.- LA VIDA MEDIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO IGF-1**
- 8.- UTILIDAD PRÁCTICA DE NUESTROS RESULTADOS**
- 9.- PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA**

El nervio ciático es el nervio periférico de mayor calibre y longitud del cuerpo humano. Sin embargo, sus lesiones son mucho más infrecuentes en comparación con la patología nerviosa de la extremidad superior (*Aydin et al., 2010*).

Los déficits neurológicos observados tras estas lesiones, que a menudo afectan a adultos jóvenes, impiden a los pacientes involucrarse en las actividades de la vida diaria y del trabajo y por lo tanto, acarrear altos costes para la sociedad (*Eriksson et al., 2011*). El coste sanitario de la atención de las lesiones nerviosas relacionadas con la actividad laboral es un 40% más alto que el de las que ocurren en el hogar o en el tiempo libre, si controlamos este dato por edad y calidad de vida (medido por EQ-5D a los 12 meses) (*Rosberg et al., 2013*). Independientemente del lugar de la lesión, los costes por pérdida de producción constituyen la mayor parte de los costes totales en los pacientes que trabajan a tiempo completo antes de la lesión, reduciéndose a un 66% en los pacientes que trabajan a tiempo parcial (*Rosberg & Dahlin, 2004; De Putter et al., 2012*). Estos gastos son mayores en los pacientes con edad > 50 años (*Rosberg et al., 2005*).

Por lo tanto, es importante mejorar las estrategias de terapéuticas existentes y, además, desarrollar nuevas líneas de tratamiento sobre la base de los nuevos conocimientos en neurobiología (*Rosberg & Dahlin, 2004*). La investigación animal en la reparación y reconstrucción de los nervios periféricos, experimentando con el nervio ciático de rata, constituye un fiel modelo para avanzar en el conocimiento de la lesión.

La reparación de los defectos críticos de estos nervios supone un reto para la investigación actual, por la necesidad de descubrir técnicas económica y biológicamente factibles, como consecuencia del conflicto generado por el puenteo clásico con nervio autólogo.

Con este proyecto de investigación, hemos intentado avanzar en la línea ya iniciada en investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo, en búsqueda de diferentes formas de presentar el injerto muscular como puente en las lesiones críticas nerviosas, y las opciones de las que disponemos para enriquecerlo biológicamente,

apoyando nuestro proyecto en las actuales experimentaciones con factores de crecimiento (*Gordon T, 2009; Yu et al., 2009; Moimas et al., 2013*).

Durante la investigación, se ha alcanzado el paso de axones a través del injerto de músculo estriado descelularizado, empleando la lámina basal de la fibra muscular (endomisio) como soporte y apoyo. Estos resultados confirman que la técnica elegida es la adecuada, con el hallazgo de tejido de características nerviosas en las muestras biológicas obtenidas del nervio ciático a nivel del injerto muscular aportado.

El aporte de factores de crecimiento IGF-1 ha permitido enriquecer el injerto con mejoría de los resultados de la evolución postoperatoria, funcional e histológica, dejando atrás el paso parcial y desorganizado de los axones del injerto inicial.

### *1.- Justificación del plan de experimentación*

Las lesiones de los nervios periféricos son una de las causas más comunes de los déficits sensitivo-motores y de la pérdida de productividad en adultos.

En los casos de defectos sencillos de los nervios periféricos, la recuperación funcional se puede alcanzar a través de la sutura directa sin tensión, la coaptación término-terminal de los cabos nerviosos. Por el contrario, la reconstrucción funcional de grandes defectos nerviosos complejos, típicamente requiere el uso de injertos de nervios autólogos (autoinjertos). Aunque los autoinjertos representan el tratamiento de elección para las lesiones nerviosas periféricas complejas, presentan una serie de limitaciones clínicas. Además de la escasez de tejido nervioso prescindible, tienen consecuencias significativas en la morbilidad del nervio donante, con aumento del riesgo de infección y la necesidad de tiempos quirúrgicos prolongados. Como resultado, actualmente existe un gran interés en el desarrollo de alternativas eficaces a los autoinjertos nerviosos en el tratamiento de las lesiones nerviosas periféricas.

El tejido nervioso alogénico (aloinjertos) es uno de los sustitutos más prometedores frente al autoinjerto nervioso. Los injertos de cadáver están disponibles en

abundancia y ofrecen ventajas en cuanto al tamaño / longitud y especificidad motora o sensorial. Contienen tanto células de Schwann donantes viables como la microestructura endoneural que proporciona el mismo nivel de apoyo regenerativo que los autoinjertos nerviosos con adecuada inmunosupresión (*Mackinnon et al., 2001; Brenner et al., 2008*).

Desafortunadamente, la aplicación clínica de los aloinjertos frescos está limitada por la concomitante necesidad de inmunosupresión sistémica, lo que predispone a los receptores a infecciones oportunistas, neoplasias y toxicidad secundaria.

El procesamiento de los aloinjertos para eliminar los componentes celulares ofrece un medio atractivo de eludir estas limitaciones al reducir la inmunogenicidad del injerto, y nos sirve de inspiración para su aplicación en otros tejidos, como el músculo. Existe un escaso consenso en cuanto a qué técnica de procesamiento es mejor para preservar la capacidad de regeneración natural y maximizar la recuperación funcional (*Myckatyn & Mackinnon, 2004*).

A pesar de las diferencias inherentes, todas las técnicas de procesamiento de los diferentes tejidos (nervio o músculo, entre otros), tienen como objetivo al mismo tiempo: 1) reducir la inmunogenicidad del injerto mediante la eliminación de los constituyentes celulares, y 2) mejorar la capacidad de regeneración a través de la preservación de la matriz extracelular nativa (*Hudson et al., 2004*).

Su procesamiento químico mediante detergentes es un método alternativo a la congelación o la radiación gamma, para la preparación de aloinjertos acelulares. Estas técnicas fueron desarrolladas inicialmente en un esfuerzo más eficaz por eliminar los restos celulares de los nervios donantes evitando al mismo tiempo los efectos destructivos de la ultraestructura del nervio durante su procesamiento en frío (*Fox et al., 2005*). Mientras que los protocolos primeros dependían en gran medida de la utilización de desoxicolato de sodio, Tritón X-100, y agua desionizada, los estudios más recientes han optimizado el procesamiento de detergente utilizando químicos menos agresivos (*Hudson et al., 2004*). Los injertos nerviosos expuestos repetidamente a las soluciones de agua desionizada, sulfobetaína-10 (SB-10), y Tritón X-200 / sulfobetaína-16 (SB-16) durante un período de cuatro días demostraron una capacidad superior para preservar la matriz extracelular nativa, con niveles equivalentes de descelerización en comparación con técnicas de procesamiento previas (*Hudson et al., 2004*). Se ha

demostrado que los aloinjertos nerviosos procesados químicamente siguiendo esta técnica, tienen posteriormente una capacidad significativamente mayor para apoyar la regeneración axonal de defectos de dimensiones superiores, cuando se han implantado en nervios ciáticos de ratas (*Hudson et al., 2004b*).

El reciente éxito de los injertos nerviosos acelulares en estudios de investigación y los informes clínicos sugieren un inminente cambio de paradigma en la gestión clínica de los defectos críticos irreparables del nervio periférico. En la práctica clínica actual, los injertos de nervio acelulares disponibles comercialmente han sustituido en gran medida conductos nerviosos como la alternativa preferida a los autoinjertos nerviosos para el tratamiento quirúrgico de las lesiones de escasa longitud y/o diámetro pequeño. La base de este cambio radica en la capacidad de regeneración superior del procesado de los aloinjertos acelulares en comparación con los conductos nerviosos disponibles (*Hunter et al., 2007*). La presencia de la matriz extracelular nativa y la conservación de la lámina basal de las células de Schwann en los injertos acelulares, apoya la regeneración axonal y la orientación con éxito de los axones en comparación con los conductos vacíos (*Johnson et al., 2011*).

Los estudios in vivo todavía tienen que dilucidar si la modesta ventaja en la capacidad regenerativa, se traduce en mejoras en la regeneración nerviosa y en la recuperación funcional después de un trasplante (*Moore et al., 2011*).

Todo el conocimiento alcanzado a partir de las experimentaciones en injertos nerviosos y, la necesidad plausible de descubrir nuevos tejidos que permitan mantener las características principales, reduciendo la morbilidad asociada al nervio donante, motivan y justifican nuestras actuales investigaciones con el músculo esquelético. Uno de los principales objetivos sigue siendo la identificación de un injerto propicio para uso en laboratorio y competitivo económicamente para su posterior aplicación clínica.

## *2.- Criterios para la evaluación postoperatoria de la regeneración después de la lesión del nervio periférico*

En las ciencias biológicas, se han desarrollado numerosos modelos animales con el fin de estudiar la regeneración del nervio periférico. Sin embargo, las ratas se utilizan ampliamente debido a su pequeño tamaño y a la disponibilidad de un gran número de animales de cualidades genéticas idénticas a un coste razonable. Una ventaja adicional es que estos animales ofrecen multitud de facilidades para que los científicos puedan trabajar y estudiar. El nervio ciático muestra una capacidad equivalente para la regeneración en ratas y primates subhumanos. Por esta razón, el nervio ciático de la rata es un modelo ampliamente utilizado para la evaluación de la función motora y sensorial del nervio periférico (*Sarikcioglu et al., 2009*).

Las lesiones del nervio ciático en la parte superior del muslo se asocian con dolor y parestesias a lo largo del territorio del nervio y pérdidas en la flexión de la rodilla, la flexión dorsal y plantar del pie. La pérdida de sensibilidad implica la región posterior del muslo, cara lateral de la pierna, pudiendo alcanzar todos los dedos del pie (*Varejão et al., 2001*). Esto puede conducir a úlceras por presión, infecciones y deformidad del pie en garra. Las alteraciones vasomotoras como frialdad, eritema, adelgazamiento de la piel, deformidades de las uñas y edema, puede acompañar a esta patología.

Las ratas de laboratorio son animales de rápida recuperación tras un proceso anestésico y/o quirúrgico (*Shen et al., 2013*). De manera que, a las 12 horas de la cirugía, encontramos nuestros animales bastante activos e inquietos. No hemos detectado pérdida de peso importante en el postoperatorio inmediato, puesto que comen desde que despiertan de la anestesia. Observaciones similares han sido publicadas recientemente, describiendo como la intervención quirúrgica no afecta a los hábitos alimenticios de estos animales (*Silva et al., 2012*). Los animales de esta experimentación, para tener 10-12 semanas, presentaban un peso inicial superior a la media de otras investigaciones (225-250 g de media en *Moore et al., 2011*; 260-290 g de media en *Mohammadi et al., 2013*): peso inicial medio del grupo de casos de 321 g,

mínimo de 290 g, máximo de 385 g. Esto se refleja al final de la experimentación, siendo su peso medio de 517 g (mínimo de 446 g, máximo de 608 g), pero también podría estar en relación con la capacidad tan favorable de evolución en las primeras horas. Pesos iniciales similares se muestran en un texto comparable: *Di Benedetto et al., 2009*. No se han demostrado diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a la evolución de su peso; similares diferencias a las cuantificadas por otros autores (*Haisheng et al., 2010*).

En toda experimentación animal, uno de los factores que más influye en los resultados, es la pérdida de animales. Su muerte puede estar en relación con el proceso anestésico, por sobredosis o por intolerancia (no se han detectado muertes por anestésico en esta investigación, aunque sí en series anteriores de nuestro equipo de trabajo). También pueden asociarse a la autofagia del propio animal, por eso nosotros empleamos el collarete isabelino durante los primeros días (3-4 días de media, muchas veces las ratas solas conseguían quitárselo). Otro riesgo es la pérdida de animales porque la otra rata de la jaula la mate, especialmente en el periodo de reanimación postanestésica, ya que conviven dos animales por jaula, de acuerdo con su carácter de animal gregáreo. Éste sería el caso de uno de nuestros animales; la otra pérdida fue por manipulación de los animales por otro grupo de trabajo. Ambas muertes han sucedido en el grupo de casos. La mayor parte de los artículos no especifican el motivo de la muerte y muchos de ellos ni siquiera sufren pérdida de animales durante la experimentación (*Rustemeyer et al., 2009*).

La lateralidad de la extremidad de los animales operada no ha marcado una diferencia en nuestro estudio, aunque intentamos que tampoco supusiese un sesgo a la hora de comparar los resultados. Tampoco están descritas en la literatura diferencias significativas en cuanto a la lateralidad del nervio ciático intervenido (*Dinn et al., 2009*). La recuperación del pelo rasurado, indetectable en muchos animales a los 60 días, nos informa del alto potencial de recambio celular en esta especie.

La atrofia de la extremidad operada aparece en el 100% de los animales, aunque sí que es cierto que en el grupo de casos, es más discreta macroscópicamente (60%) y menos severa funcionalmente; pudimos observar al final de los 90 días, movimientos perfectamente circulares y coordinados de la pata trasera operada durante la filmación de la deambulaci3n; esto es así, gracias al tono estático y a la participaci3n dinámica de

todos los músculos de la extremidad. Estos hallazgos están en consonancia con lo publicado previamente: *Moimas et al., 2013* analiza la atrofia muscular al mes de la reparación de la lesión, en su caso, con el depósito local de VEGF.

Se han alcanzado diferencias significativamente estadísticas ( $p < 0.05$ ) en la comparación del hallazgo de úlceras de decúbito que precisasen curas, y pérdidas digitales, entre los dos grupos de trabajo. Seis de los casos presentaban al final de la experimentación, una pata de morfología normal. Estas lesiones son descritas como parte de la pérdida sensitiva (*Di Benedetto et al., 2009*); otros especifican que sus animales no presentan pérdidas digitales por automutilación, como en nuestro caso (*Rustemeyer et al., 2009*). La aportación de IGF-1 al injerto de músculo descelularizado parece reducir significativamente estos hallazgos. Mohammadi et al., describen que cuando se carga en un injerto de arteria, IGF-1 acelera y mejora la recuperación funcional y los índices morfométricos del nervio ciático seccionado. Su comparación se basa en el análisis de los test de comportamiento, el estudio funcional del nervio ciático, la masa del músculo gastrocnemio y los índices morfométricos ( $p < 0.05$ ) (*Mohammadi et al., 2013*).

El ibuprofeno se ha recomendado para su uso como analgésico dosis-dependiente, la cual varía de 7,5 a 30 mg / kg (*Liles & Flecknell, 1992*). Se utiliza este fármaco de forma rutinaria como un aditivo para el agua en el tratamiento de patología que genere un dolor de leve a moderado tal como lesiones de la piel, heridas y abscesos del ojo (*Huerkamp & Michael, 2000*) El carprofen también está disponible para su uso en el agua como una alternativa. Otros medicamentos deben ser utilizados cuando se anticipa el dolor severo (*National Institute of Health, Office of Animal Care and Use, 2000*). Siempre que esté indicado, porque está documentada una respuesta fóbica en la rata, al agregar medicamentos al agua de las ratas que les genera pérdida de peso, aunque suele ser temporal (*Speth et al., 2001*).

Las dosis recomendadas para el tratamiento del dolor en ratas son:

- De 10 mg/kg a 30 mg/kg, disuelto en agua, cada 4 horas (*Carpenter JW, 2012*)
- De 15 mg/lb a 60 mg/lb, disuelto en agua, cada 4 horas (baja dosis analgésica, alta dosis con efecto anti-inflamatorio) (*Ducommun D, 2000*)

El dolor que presentan las ratas durante los primeros días postoperatorios se controla bien con el ibuprofeno disuelto en el agua de sus botellas: ibuprofeno 20 mg/ml (Dalsy®, Abbott, Madrid) a dosis de 10 ml por cada litro de agua de bebida (200 mg ibuprofeno/litro de agua de bebida). Reflejan su dolor en la irritación que presentan cuando reciben las curas, en el color de los ojos que se oscurece y en la pérdida de brillo del pelo. Algunos autores promueven además la infiltración local al finalizar la cirugía de bupivacína al 0,5% (*Rustemeyer et al., 2009*).

Aunque tras el seguimiento y de acuerdo con otras publicaciones (*Oliveira et al., 2004; Silva et al., 2012*), no se ha detectado ninguna infección de herida quirúrgica, el empleo de antibiótico profiláctico perioperatorio se completó según pauta veterinaria y con el consenso de todo el grupo de trabajo.

### *3.- Recuperación de la función de locomoción*

Si estudiamos la marcha a partir de la biomecánica, podemos asegurar que es uno de los eventos más complicados de la vida, puesto que se ponen en función muchos grupos musculares, varias articulaciones y sobre todo una actividad muy compleja del Sistema Nervioso Central.

La selección del parámetro adecuado de evaluación para medir la regeneración neuronal será crítica para el éxito de cualquier estudio experimental (*Sarikcioglu et al., 2009*).

El análisis de la marcha es una medida del movimiento distal coordinado del animal, que requiere la integridad de las funciones motoras y sensoriales. Después de la lesión del nervio, se pierde la selectividad de la inervación de las fibras nerviosas sobre los músculos, porque los patrones de activación de los músculos se alteran durante la locomoción (*Gramsbergen et al., 2000*). Como el esfuerzo máximo no es necesario para

caminar, no existe correlación entre los parámetros de la deambulación y las fuerzas musculares máximas.

Según Varejão et al., el SFI representa el método más fiable del análisis de la recuperación funcional, lo cual permite la integración entre los sistemas sensitivo y motor (Varejão et al., 2004). Parece ser además el método más versátil, ya que es de bajo coste y fácil aplicación en comparación con otros métodos propuestos, características que probablemente expliquen su aplicación más amplia (Oliveira et al., 2003).

El test del Índice Funcional Ciático proporciona un procedimiento no invasivo para evaluar el estado funcional del nervio ciático durante el proceso de regeneración. Como la deambulación adecuada requiere la función coordinada que implica la recepción de los estímulos sensoriales, la respuesta motora y la integración cortical, el SFI supone una valoración más completa que simplemente la electrofisiología básica o la histomorfometría del crecimiento de los axones y reinervación muscular, si el enfoque de la investigación se refiere a los resultados funcionales (Sarikcioglu et al., 2009).

El SFI es una prueba que evalúa globalmente la conducta motora desarrollada por el animal tras la lesión nerviosa e indica la recuperación de la función en la cual el nervio lesionado está directamente implicado. La sección del nervio ciático afecta a los impulsos mecano-sensoriales y propioceptivos procedentes de la planta y la región posterior de la extremidad, y desactiva la musculatura extensora del pie y los dedos inervada por la rama peronea, y los músculos flexores inervados por el nervio tibial (Varejão et al., 2003). Hemos observado como cuando nuestros animales pierden la capacidad de separar los dedos de la pata afecta, se reducen las mediciones de la rama peronea (TS e IT), y caminan arrastrando las partes más distales de los dedos, lo que incrementa el segmento PL de la rama tibial. Estas alteraciones de la huella plantar fueron descritas por Monte-Raso et al., en 2008.

Como resultado de una lesión completa del nervio peroneo, pierden su inervación los extensores de los dedos del pie, dorsiflexores y eversores. Por lo tanto, debido a la acción opuesta de los flexores de los dedos y del pie, el animal tiene una huella plantar acortada. La distancia entre los dedos intermedios se afecta relativamente poco, debido al funcionamiento normal de los músculos intrínsecos del pie, como

describió *Varejão et al., 2003*. La distancia entre los dedos intermedios sí se modificó sustancialmente en nuestros animales porque la lesión era completa a nivel del tronco ciático.

Si sólo hubiésemos generado una sección completa del nervio tibial posterior, se alteraría significativamente la marcha por la pérdida de la flexión plantar del tobillo, afectando a los inversores de pie, a los flexores de los dedos, y a los intrínsecos del pie. La huella característicamente demostraría un aumento de la longitud de la huella y una disminución de la extensión de los dedos. También habría una tendencia a la eversión del pie. La dorsiflexión del nervio peroneo intacto empujaría el talón hacia abajo, haciendo que el animal usase para caminar sobre todo la planta del pie. Esto resulta en una longitud mayor de la huella plantar (*Varejão et al., 2003*).

La lesión completa del nervio ciático generada en nuestras ratas es similar a la de la lesión del nervio tibial posterior, sin embargo, el patrón atribuible a la acción de la musculatura inervada por el peroneo no está presente. Por lo tanto, muestran un aumento de la longitud de la huella plantar, con disminución de la extensión de los dedos y disminución de la propagación intermedia de los dedos sin la tendencia a la eversión del pie. Debido a la pérdida de la función del nervio peroneo, la huella es aún más anormal con evidencia de arrastre de los dedos, como describió *Monte-Raso et al., en 2008*.

Los resultados obtenidos en nuestro examen funcional fueron positivos en ambos grupos de trabajo, apoyados por multitud de textos de la literatura que se emplean el SFI en su estudio funcional (*Oliveira et al., 2004; Pfister et al., 2007; Sobral et al., 2008; Di Benedetto et al., 2009; Rustemeyer et al., 2009; Haisheng et al., 2010; Silva et al., 2012; Mohammadi et al., 2013*). Aunque no alcanzan los valores preoperatorios en la mayoría de estas investigaciones y en los animales de nuestra experimentación, se acercan a los resultados que se consideran normales. Algunos de estos autores sí publican resultados de absoluta recuperación de los valores iniciales del SFI: en todos los grupos de análisis a los 28 días de seguimiento (*Sobrall et al., 2010*), o en el grupo de casos a los 90 días de evolución (*Silva et al., 2012*). El SFI del grupo control a los 90 días tiene un valor medio de -19,6 (-21,72; -17,79); y del grupo de casos, -10,94 (-13,4; -9,52). El SFI preoperatorio era de -6,84 los controles y -5,93 los casos. A los 7 días de la cirugía, el SFI de los controles era de -82,24; y de los casos -

93,91. El parámetro que más variación sufre respecto del preoperatorio es la distancia de la pisada. Y el que más varía dentro de las mediciones a los 90 días es la anchura intermedia de la pisada. Nuestros resultados son similares a otros publicados por autores como *Oliveira et al., en 2004*, especialmente en la primera medida del SFI postoperatorio: -96,81 y -98,07, con la demostración de la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio.

La recuperación más importante se detecta en la evaluación a los 30 días de la cirugía: los animales del grupo de casos tratados con IGF-1 muestran una mejoría espectacular, especialmente en el parámetro de la anchura intermedia de la pisada (EIT). Esta recuperación acelerada en el primer mes, sufre una deceleración de su ritmo de mejoría durante el segundo mes, resultando comparables los datos recogidos a los 60 días para ambos grupos, aunque seguían siendo superiores los del grupo de casos. Este hallazgo no ha sido descrito como tal en la literatura, tampoco en aquellas experimentaciones con IGF-1; sin embargo, hay autores que describen como única diferencia estadísticamente significativa, la medición del SFI al día 7 y al 30 postoperatorio (*Sobrall et al., 2008*), aunque no fue empleado el IGF-1 en su reparación nerviosa.

La mejoría de los parámetros de la marcha al añadirle factores de crecimiento, ha sido publicada recientemente, en el contexto de diferentes injertos para cubrir el defecto nervioso y la incorporación de distintos factores de crecimiento. Así, *Gravvanis et al.*, describen la recuperación de la deambulación al rellenar un injerto de vena con NGF (*Gravvanis et al., 2004*); *Pfister et al.*, analizan los diferentes factores de crecimiento utilizados en la actualidad y su incorporación en conductos nerviosos sintéticos de materiales biodegradables (*Pfister et al., 2007*); *Moimas et al.*, con VEGF o factor de crecimiento del endotelio vascular, en un injerto de vena relleno de fibras de músculo estriado tratadas químicamente con anterioridad a su implantación (*Moimas et al., 2013*); o *Mohammadi et al.*, empleando IGF-1 como promotor de la regeneración del defecto nervioso cubierto con un injerto arterial (*Mohammadi et al., 2013*).

Todos estos grupos de trabajo encuentran beneficioso el uso de factores de crecimiento en la reparación de los defectos del nervio periférico, pero no describen el ritmo de mejoría, ni su tiempo de duración específico, aunque sí que hacen referencia a

la vía de administración de los factores para prolongar su vida media (*Pfister et al., 2007*).

Sin embargo, hay otros autores que reflejan una crítica severa a la prueba del SFI, puesto que, según ellos, no es muy valorable en las primeras etapas de la recuperación nerviosa o cuando los resultados no son favorables. Así, Dinh et al. opinan que el SFI ha demostrado ser un método fiable de evaluación de la función después de la lesión y reparación del nervio ciático; pero que, sin embargo, este método puede no ser tan fiable en lesiones nerviosas graves (neurotmesis) por la presencia secundaria de contracturas de flexión, autonomía de la extremidad, o incluso por la necesidad de arrastrar la cola (*Dinh et al., 2009*); Schiaveto de Souza et al, afirman que no es posible establecer una correlación clara entre sus resultados y los obtenidos por otros métodos de evaluación, así como entre los resultados obtenidos por este mismo método en diferentes investigaciones o por diferentes investigadores (*Schiaveto de Souza et al., 2004*).

Nuestros resultados, comparables en la evolución funcional e histológica, nos permiten seguir confiando en la fiabilidad de esta prueba de estudio, viéndonos apoyados por numerosos estudios, (*Oliveira et al., 2001; Mendonça et al., 2003; De Sá et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Monte-Raso et al., 2005; Monte-Raso et al., 2008*), que muestran una correlación clara entre la recuperación morfológica (evaluada mediante la morfometría del nervio) y la recuperación funcional (medida mediante el SFI).

#### *4.- Histomorfometría: hallazgos microscópicos*

La estimación cuantitativa de la morfología de la fibra nerviosa (especialmente la mielinizada) es, junto con la evaluación funcional, una herramienta de investigación clave en la regeneración del nervio (*Geuna et al, 2004; Vleggeert-Lankamp CL, 2007*).

La "regla de oro" de la toma de muestras de cualquier tejido y órgano es la regla de igualdad de oportunidades, paradigma que se cumple en el diseño de muestreo (*Geuna, 2000*). El muestreo aleatorio simple es el diseño más básico basado en el azar; establece que todas las posibles combinaciones de las unidades de muestreo  $n$  tienen la misma probabilidad de ser seleccionado de entre el total.

Para definir el conjunto de reglas de inclusión / exclusión de las fibras nerviosas dentro del campo de muestreo, es necesario recordar el sesgo que depende del "efecto de borde" (*Geuna et al., 2004*) que puede causar diferencias significativas en la probabilidad de cada perfil por los bordes del marco: fibras más grandes tendrán una mayor probabilidad de intersección de los bordes del marco y por lo tanto de caer parcialmente en más de un campo de muestreo que las fibras más pequeñas.

Los parámetros geométricos más importantes que se pueden utilizar para la evaluación de las fibras nerviosas son los siguientes (*Vleggeert-Lankamp CL, 2007*):

- (1) Número de fibras,
- (2) Densidad de fibras,
- (3) Diámetro de las fibras y los axones,
- (4) Área de sección transversal de las fibras y los axones,
- (5) Perímetro de fibras y axones,
- (6) Espesor de la mielina.

Aunque el número y la densidad de las fibras nerviosas son los indicadores más utilizados en la regeneración de los nervios, ambos parámetros deben ser interpretados con precaución. De hecho, un número importante de fibras nerviosas regeneradas no sólo puede indicar una buena regeneración, sino también el hallazgo de un brote aberrante (en este caso la evaluación del tamaño de la fibra puede proporcionar información adicional). Ésta es la explicación que ofrecen algunos autores a la ausencia de correlación entre el número total de axones mielinizados y los parámetros funcionales (estudios de contracción muscular, de conducción nerviosa o la movilidad de las extremidades) detectada en sus investigaciones (*Varejão et al., 2004; Ahmed MR, 2005; Pfister et al., 2007*).

En nuestra investigación, al comparar el número de axones y su densidad en los tres cortes principales de la pieza histológica, detectamos valores descritos en la literatura como significativos de regeneración y muy similares entre los dos grupos. El número de axones total del grupo de animales tratados con IGF-1 es superior: un 11,59% en el cabo distal y un 5,84% en el interior del injerto; no así en el cabo proximal, que es un 3,2% inferior, aunque esté resultado no es estadísticamente significativo. A este nivel, los axones por campo son similares, su diferencia de 5 axones/campo a favor del grupo de controles tampoco es significativa. Quizás, cobre más importancia si nos fijamos en que el tamaño del corte en el grupo control es discretamente menor. Los datos publicados en la literatura tampoco alcanzan diferencias estadísticamente significativas en el cálculo del número total de axones (*Oliveira et al., 2004; Haisheng et al., 2010; Moore et al., 2011*); sí lo son los resultados que describen *Sobran et al., en 2008*, basados en la reparación nerviosa favorecida por el ejercicio físico del animal.

Los datos sobre la densidad de las fibras son aún más difíciles de interpretar ya que una alta densidad de fibras no siempre refleja buena regeneración de los nervios, sino que también puede reflejar la presencia de pequeños axones regenerados. Por otro lado, una densidad de fibra baja puede reflejar axones más grandes (que es un buen predictor) o también la presencia de edema en el nervio regenerado (que es un mal predictor). De nuevo en este caso, la evaluación contemporánea del tamaño de la fibra puede facilitar la interpretación de los datos de densidad.

En el grupo de animales tratados con IGF-1, la densidad de las fibras nerviosas disminuyó en el cabo proximal respecto del grupo control en -9,37%; aunque luego aumentó un 0,32% en el injerto y un 11,22% en el cabo distal. Estas diferencias resultan reseñables en el cabo distal, que por otra parte, sería la sección de análisis más interesante por su repercusión funcional. Nuestros datos son equiparables a otros publicados, en cuanto a que el grupo de trabajo logra una densidad superior a los controles, aunque su diferencia no es estadísticamente significativa (*Di Benedetto et al., 2009; Rustemeyer et al., 2009*); pero diferimos de aquellos que alcanzaron menor densidad que en el grupo control (*Sobrall et al., 2008*).

El diámetro del axón es el parámetro clásico para la identificación del tipo de nervio, ya que ha demostrado ser el principal determinante de la velocidad de

conducción (*Geuna et al., 2001*). *Moore et al., en 2011* concedieron a este parámetro mayor relevancia como medida viable de la maduración de los axones mielinizados que crecen a través de un injerto. Se pueden utilizar varias medidas para evaluar su tamaño: el diámetro máximo (que está fuertemente sesgado por la oblicuidad de los perfiles de fibra de sección transversal), el diámetro mínimo (el cual está fuertemente sesgado por la retracción de la fibra), y el diámetro del círculo equivalente (lo que representa el diámetro de un círculo de la zona que se corresponde con el área de sección transversal de la fibra y / o axón).

Se detecta en nuestra serie una gran variedad de tamaños de fibras nerviosas, no encontrándose diferencias reseñables entre los dos grupos. La media de los diámetros tampoco es una cifra significativa, por la gran variedad entre fibras, dentro de la misma sección, sin una distribución conocida (0,071  $\mu\text{m}$  de media). Sobre el diámetro, se han publicado opiniones muy diversas: algunos autores apoyan nuestros hallazgos (*Di Benedetto et al., 2009*), otros observan peores diámetros cuando intentan mejorar la regeneración (*Sobrall et al., 2008*, en la aplicación del ejercicio físico), éstos mismos le restan importancia, aludiendo al logro de iguales diámetros en los diferentes grupos con el paso del tiempo.

El área de sección transversal es otro parámetro utilizado para la estimación del tamaño de las fibras nerviosas mielinizadas que, sin embargo, no es fácil de interpretar. A partir de los datos en bruto del diámetro de la fibra (D) y el axón (d), pueden ser calculados otros parámetros de tamaño por fórmulas matemáticas simples:

- grosor de la mielina  $[(D-d) / 2]$ ,
- grosor de la mielina en relación al diámetro del axón  $[(D-d) / 2d]$ ,
- la relación diámetro de la fibra/diámetro del axón (D / d),
- relación del diámetro del axón / diámetro de la fibra, también llamado relación-g (d / D).

Estos parámetros adicionales son particularmente importantes para la investigación de desarrollo del nervio (*Licursi de Alcântara et al., 2008*), así como la regeneración del nervio, ya que se correlacionan mejor con el resultado funcional de la recuperación del nervio (*Bilego Neto et al., 2013*).

El análisis del espesor de la mielina y su comparación entre los dos grupos, resulta difícil, porque las dimensiones de las estructuras a medir son muy reducidas y es fácil sesgar los datos obteniendo un resultado erróneo. Como en el caso del contaje de los axones y el cálculo de la densidad de axones, el cálculo fue manual, prescindiendo de las medidas informáticas a nuestra disposición. Esto también puede aumentar el sesgo de dicha medición. Los resultados observados nos confirman la potenciación de los datos histológicos en el grupo tratado con IGF-1; se comprueba un aumento en las tres secciones analizadas, que además es progresivo, de proximal a distal (2,99% más de espesor en el grupo de casos en el cabo proximal; 16,07% a nivel del injerto; y un aumento del 28,31% en el cabo distal. El incremento en el espesor de la mielina a nivel del injerto y en el cabo distal, son estadísticamente significativos. Es difícil compararlo con lo publicado en la literatura, porque los textos que describen la influencia de los factores de crecimiento en el espesor de la mielina, apoyan nuestra conclusión, pero no concretan en el artículo publicado la cuantificación de esa mejoría (*Zeger et al., 2007; Furusho et al., 2012*).

Dado que la valoración de estos parámetros no siempre es fácil desde un punto de vista técnico, la selección de los indicadores utilizados en un estudio de la regeneración del nervio, debe ser también realizada sobre la base de la calidad del material histológico y el equipo disponible.

La evaluación cuantitativa de los tejidos y órganos en los cortes histológicos ha sido objeto de un acalorado debate científico en los últimos años. En particular, la aparición de un nuevo enfoque para hacer frente al sesgo en el análisis morfométrico, ha representado un avance significativo en Neuromorfología (*Geuna S, 2005; Schmitz & Hof., 2005; Baryshnikova et al., 2006; Canan et al., 2008*).

Independientemente de los parámetros objeto de la investigación, hay al menos cinco fuentes diferentes de sesgo en la evaluación cuantitativa de las fibras nerviosas (*Geuna et al., 2001*).

- En primer lugar, la cepa, sexo y edad de los animales de experimentación (fundaciones relacionadas con el esfuerzo, de género, relacionados con la edad de sesgo), controlado en nuestras ratas.

- En segundo lugar, el punto (nivel) en el eje neurálgico donde se realizan las secciones (sección de fundamentos relacionados de sesgo); de ahí, el protocolo descrito inicialmente para localizar el punto de sección del nervio ciático.
- En tercer lugar, la ubicación de los campos de muestreo dentro del perfil de la sección transversal del nervio (sesgo relacionado con la localización). Nosotros hemos descrito un esquema de 7 secciones, cuyos cabos son diferentes entre sí, lo que nos permite orientar el segmento y relacionarlo topográficamente en la pieza.
- En cuarto lugar, las reglas de inclusión-exclusión para el muestreo de perfiles dentro de los ámbitos de toma de muestras (fundaciones relacionadas con la morfología de sesgo). El muestreo al azar de 10 secciones por campo para el contaje estereológico intenta evitar el "efecto de borde".
- En quinto lugar, el método para la medición de los parámetros de tamaño seleccionados. Nuestro estudio se describe independiente de las mediciones informatizadas.

Las dos primeras fuentes potenciales de sesgo se relacionan con el diseño del estudio. Las otras tres fuentes están relacionadas con el procedimiento de muestreo y el método utilizado para la evaluación cuantitativa de fibras nerviosas.

La mayoría de los autores realizan mediciones sólo en una sección seleccionada al azar de cada nervio. Sin embargo, los resultados aquí mostrados se asocian a tres secciones diferentes, cada una de ellas representada por 10 cortes al azar de cada sección. El uso de una sola sección muestra mayor riesgo de resultado erróneo, ya que los parámetros cuantitativos de las fibras nerviosas pueden variar significativamente dependiendo del nivel del nervio y de la distancia desde el punto de la lesión (*Santos et al., 2007*).

El método empleado en nuestra experimentación para evitar en lo posible este tipo de sesgos, fue publicado por primera vez por Geuna (*Geuna S, 2000*): una vez que se selecciona al azar la sección, se mide el área de sección transversal total del nervio y los campos de muestreo se selecciona entonces al azar usando un procedimiento simple;

la densidad media de fibra se calcula dividiendo el número total de las fibras nerviosas en el campo de muestreo de su área ( $N/mm^2$ ); el número total fibras (N) se calcula finalmente multiplicando la densidad de fibras media por el área de sección transversal total de toda la sección transversal del nervio.

Las preguntas de investigación deben ser planteadas y resueltas según el material del que se dispone, el objetivo principal de la experimentación y las medidas más apropiadas a nuestro alcance. Si la naturaleza de la cuestión es la búsqueda de un resultado funcional, será mejor completar un análisis funcional. Sin embargo, si la hipótesis de la investigación se refiere a la mejora de la regeneración de la fibra nerviosa, será más apropiada un análisis electrofisiológico o morfológico (*Sarikcioglu et al., 2009*).

La extrapolación de los parámetros histomorfométricos puede conducir a una interpretación errónea sobre la recuperación funcional (*Mohammadi et al., 2013*). Los estudios estereológicos de medición del número total de axones o el espesor la mielina, no permiten conocer si el axón alcanza su órgano diana apropiado o no (*van Neerven et al., 2012*). En múltiples estudios, el número de axones mielinizados no se correlaciona con los parámetros funcionales (tales como la contracción muscular o la movilidad de las extremidades cuantificable mediante análisis de la huella plantar o estudio de los vídeos de la marcha), ni con los estudios de conducción nerviosa (*Ahmed MR, 2005*). El hallazgo de datos funcionales pobres en comparación con datos histomorfométricos satisfactorios, puede deberse a la falta de coincidencia de los axones con el órgano diana a reinervar (*Varejão et al., 2004*).

Los informes clínicos que correlacionan los resultados de las medidas cuantificables de la investigación, tanto histológicos como funcionales, son de interés en el diseño de los estudios, porque ponen de relieve la necesidad de considerar los diferentes aspectos de la regeneración nerviosa, para poseer distintos parámetros para comparar y rechazar aquellos que posiblemente resulten erróneos.

### *5.- Factores pronóstico en la regeneración del nervio periférico*

El resultado de la reparación del nervio periférico de la extremidad inferior, puede variar ampliamente, debido a la presencia de múltiples parámetros que influyen en el proceso terapéutico (*Maripuu et al., 2012*). A partir de los resultados obtenidos en nuestra experimentación, se describen los factores pronóstico más significativos.

La relación entre el tamaño del defecto a cubrir y el nervio sano influye en el resultado, siendo directamente proporcional, con implicaciones sobre la eficiencia de la regeneración axonal, por la necesidad de avance retrógrado y anterógrado de señales eléctricas y moleculares que activen la reparación. Además, se necesita un injerto de diámetro suficiente para atraer al número de axones necesario y para dirigirlos en su camino correcto (*Dahlin LB, 2008*).

Hay pocos estudios en la literatura que describan la relación entre la longitud del injerto y los resultados funcionales en la práctica clínica en humanos. No existe un consenso sobre la longitud crítica del injerto nervioso que afecta a la tasa de recuperación final. Varios autores han propuesto un límite de longitud crítica de 5 a 12 cm para los buenos resultados en humanos (*Vayvada et al., 2013*).

Los 15 mm seleccionados como defecto irreparable en nuestra experimentación, surgen de la comparación inicial con la posible longitud del nervio ciático sano de la rata, en función del peso y las semanas de vida de los animales seleccionados, y también influidos por la literatura publicada al respecto (*Ni et al., 2013*).

El momento de la reparación quirúrgica de las lesiones del nervio ciático es variable en la literatura. Una pérdida completa y grave de la función del nervio ciático en humanos sin evidencia de recuperación durante los primeros 3 meses, es generalmente aceptado como el límite para indicar su reparación quirúrgica (*Vayvada et al., 2013*).

El tratamiento de las lesiones del nervio ciático depende de la pérdida de la continuidad del nervio o lesión en continuidad. Si hay una buena vascularización y cobertura de los tejidos blandos, las heridas incisivas deben ser manejadas dentro de unos

pocos días; este criterio no se ha defendido en la literatura para heridas por contusión nerviosa o tracción. Algunos autores sugieren también que sería necesario un periodo de 2-4 semanas para la delimitación clara de los segmentos de nervio lesionados. La presencia de comorbilidades extensas (fracturas, lesiones vasculares, y la pérdida de la cobertura de tejido blando) también son razones para retrasar la reparación definitiva del nervio (*Maripuu et al., 2012*).

Por encima de esos tiempos, el proceso de regeneración nerviosa se extiende y además, la denervación de la musculatura diana distal, empeorarán el pronóstico para su reparación. El tiempo es de gran importancia debido a los cambios tanto en las células de Schwann, como en la neurona (*Ruijs et al., 2005*). En la presente investigación, la reparación se completa de forma inmediata, justo tras generar la lesión, para evitar el compromiso de los resultados por el deterioro celular.

La degeneración del muñón distal conduce a la muerte de las células de Schwann y a la fibrosis. Cuando el momento de la reparación supera el mes, podemos encontrar un número de axones congruente con un proceso de reparación activo en el medio del injerto y, sin embargo, el número de neuronas motoras espinales en regeneración y los axones mielinizados en el muñón distal haber iniciado proceso de deterioro con disminución constante de ambos parámetros (*Jonsson et al., 2013*). Esto da lugar a la denervación del músculo y al aumento de la atrofia.

El cabo distal del nervio es de importancia crítica con respecto a la limitación de la regeneración y reinervación después de una reparación diferida (*Ronkko et al., 2011*). Se estudiaron las células de Schwann que se encuentran en el muñón distal después de la reparación del nervio. Además de la disminución en el número de células de Schwann en el cabo distal de los animales sometidos a una cirugía retrasada, *Jonsson et al.* describen una serie de moléculas inhibitorias presentes en el muñón distal (*Jonsson et al., 2013*). Esto genera una disminución de la capacidad para apoyar la regeneración después de la reparación del nervio diferida, probablemente como resultado de la disminución del número de células de Schwann y al aumento de la fibrosis.

El punto de corte en este modelo experimental en rata parece ser los 3 meses; después de este punto, el resultado funcional de la reparación retrasada del nervio probablemente no pueda completarse (*Brauer & Waters, 2007*). No parece ser de absoluta importancia la reparación del nervio inmediatamente, ya que los resultados del

contaje axonal entre las reparaciones inmediatas y tras un mes de evolución, son comparables (*Jonsson et al., 2013*).

El nivel de la lesión es importante en relación con el tiempo que precisa el proceso de reinervación para alcanzar su destino y por lo tanto, con la preservación de la diana y con la posibilidad de recuperar su función. Un músculo sin inervación comenzará a atrofiarse (*Ray & Mackinnon, 2010*). Como se exponía anteriormente, esto comienza en los primeros 3 meses después de la lesión, y el proceso alcanza un nivel crítico después de dos años (*Tung & Mackinnon, 2010*). La atrofia muscular se convierte en irreversible si se llega a un punto de tiempo crítico, y dificulta la reinervación (*Ruijs et al., 2005*).

Las lesiones del nervio ciático que ocurren a nivel de la musculatura glútea (cerca de su origen lumbar) tienen un resultado peor que las lesiones a nivel del muslo, probablemente debido a la mayor distancia al músculo diana (*Kim et al., 2004*). También se ha detectado una mayor cantidad de muerte de células neuronales en las lesiones proximales, que están más cerca del cuerpo celular neuronal (*Abrams & Widenfalk, 2005*).

Tras valorar las dimensiones del nervio ciático sano de la rata, como hicimos para el diseño del defecto crítico, los límites de la sección del nervio se definieron: proximalmente, en un punto situado a una distancia de 90 mm respecto de la punta del tercer dedo de la pata, a fin de asegurar en todos los animales una distancia equivalente para la regeneración axonal; y a nivel distal, el defecto de 15 mm coincidirá unos mm antes de la bifurcación en sus dos ramas principales.

El mecanismo lesional es otro parámetro a tener en cuenta en la reparación del nervio ciático en la práctica clínica habitual, pero es un ítem no analizado en el este estudio ya que todos los animales sufrieron una sección completa aguda del nervio. Se sabe que las lesiones por alta energía, con aplastamiento, necrosis o compromiso vascular, empeoran el pronóstico de la recuperación (*Vayvada et al., 2013*).

Algo similar ocurre con la influencia del método de reparación seleccionado para la cirugía del nervio periférico. Quizás sea uno de los factores más determinantes para el éxito de la regeneración de la lesión, y es por esto que es objeto de la investigación que se presenta.

### *6.- El papel de la lámina basal*

A partir del análisis de los resultados obtenidos, podemos afirmar que el músculo acelular que empleamos a modo de injerto constituye un puente útil para el avance de los axones regenerados. El músculo ha sido descrito como la estructura histológica más eficaz para la liberación local de los factores en él inyectados (*Giacca M, 2007; Moimas et al., 2013*).

Es posible que esta conclusión satisfactoria se asocie a la proximidad estructural de la lámina basal del músculo descelularizado a las envolturas nerviosas. El endomisio actuaría como soporte anatómico y biomecánico para el crecimiento de los brotes axonales hacia el cabo distal, motivados por la presencia de células de Schwann en ambos cabos inicialmente. Además, el esqueleto de las células de Schwann degeneradas, laminina+, persistiría al proceso de deterioro celular, actuando como señal para la regeneración (*Höke et al., 2006*).

Las diferencias entre el porcentaje de éxito de las distintas técnicas de descelularización, radican en la cantidad residual de constituyentes celulares antigénicos y la calidad de la matriz extracelular preservada. Otros protocolos de procesamiento químico de tiempos más prolongados, afectan adversamente a la integridad de la microestructura de los injertos (*Hudson et al., 2004; Moore et al., 2011*).

Los hallazgos histológicos más repetidos en la experimentación muestran un crecimiento del cabo proximal hacia distal, apoyado sobre el soporte del injerto muscular descelularizado, utilizándolo como vehículo de paso; aunque, se han detectado dos casos en los que hemos corroborado el paso de axones entre las fibras musculares del injerto. Estos hallazgos concuerdan con lo ya publicado previamente por otros autores, como Meek et al., que afirman que los axones en regeneración y las células de Schwann del nervio ciático lesionado no precisan la presencia de la lámina basal de las células de Schwann, sino sólo la existencia de cualquier lámina basal celular,

incluyendo aquella que proviene de las fibras del músculo esquelético (*Meek et al., 2004*).

La laminina, uno de los principales componentes de la lámina basal, estimula el crecimiento de las neuritas, induce la mitosis de las células de Schwann, y juega un papel fundamental en la regeneración del nervio periférico. El papel de guía que ejercen la presencia de la matriz extracelular y la lámina basal en los injertos acelulares es un tema de debate actual, con numerosos apoyos a nuestros resultados (*Whitlock et al., 2009; Johnson et al., 2011; Moore et al., 2011; Mohammadi et al., 2013*).

### *7.- La vida media del factor de crecimiento IGF-1*

La regeneración del nervio requiere una compleja interacción entre células, matriz extracelular y factores de crecimiento.

Las citocinas y factores de crecimiento son polipéptidos sintetizados por una variedad de células y, a menudo muestran acciones que se superponen. Por lo tanto, los dos términos se usan como sinónimos, aunque citoquinas son proteínas inducibles que actúan como reguladores humorales, mientras que los factores de crecimiento se definieron originalmente como sustancias que promueven el crecimiento celular.

Se cree que la producción de los factores de crecimiento por las células de Schwann en el segmento distal del nervio denervado, es crucial para el éxito de la regeneración y crecimiento del nervio periférico. Las células de Schwann de los nervios cutáneos sintetizan predominantemente factor de crecimiento neurógeno (NGF), factor neurotrófico derivado cerebral (BDNF), factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF); todos ellos están regulados sustancialmente por las células de Schwann de los nervios cutáneos y de la raíz ventral (*Höke et al., 2006*).

El factor de crecimiento neurogénico (NGF) se ha puesto de manifiesto en la literatura como un neuroprotector y neuroestimulador importante, facilita el mensaje del traumatismo nervioso y la necesidad de regeneración, y por lo tanto, promueve la obtención de un resultado postoperatorio mejor (*Bhang et al., 2007*).

De los factores de los que disponemos en la investigación, elegimos el IGF-1, por las características que lo acreditan como promotor de la supervivencia de la neurona motora, el crecimiento y la ramificación axonal (*Rind & von Bartheld, 2002*). La literatura apoya esta decisión con sus múltiples publicaciones al respecto durante los últimos años. Yuan et al., confirmaron que el IGF-1 juega un papel importante en el desarrollo neuronal, la recuperación de la lesión neuronal, la supervivencia neuronal, y el crecimiento de neuritas después de su lesión por aplastamiento o sección (*Yuan et al., 2000*). Los estudios in vitro han sugerido que el IGF-1 es producido localmente por células no neuronales después de la lesión y estimula la regeneración (*Rabinovsky et al., 2003*). Se ha demostrado que afecta a múltiples facetas de la función de las células de Schwann in vitro, lo que probablemente contribuye a la mejora de la regeneración del nervio, incluyendo la proliferación, la movilización, la mielinización y la interacción de la célula de Schwann con el axón (*Rabinovsky ED, 2004*).

La presencia local de factores de crecimiento juegan un papel importante en el control de la supervivencia, migración, proliferación, y diferenciación de los diversos tipos de células que participan en la regeneración del nervio (*Pfister et al., 2007*). Por lo tanto, las terapias con factores de crecimiento reciben cada vez más atención en la investigación. Sin embargo, este tipo de tratamientos es complicado debido a la alta actividad biológica, los efectos pleiotrópicos (actúan en una amplia variedad de objetivos), y la corta vida media biológica (de pocos minutos a horas) de estas proteínas.

A pesar de estar constatada la conveniencia de la aplicación de los factores de crecimiento en la reparación nerviosa, su práctica es difícil y compleja (*Bhang et al., 2007*). Su biodisponibilidad es muy corta y se inactiva rápidamente en vivo. Las alternativas ya descritas para su aplicación son de alto coste, aplicabilidad clínica difícil y eficacia incierta (*Jubran & Widenfalk, 2003; Chunzheng et al., 2008*).

Por otra parte, en el contexto de la administración localizada de tales factores de crecimiento, poco se sabe acerca de las dosis requeridas y regímenes de dosificación

apropiada a aportar en el defecto del nervio apropiado y/o su influencia según los distintos modelos animales. Aún así, la literatura apoya nuestro planteamiento de la administración local, porque la vía sistémica supone una opción más compleja, por la gran cantidad de sustancia que se precisa y por la imposibilidad de conocer la concentración que alcanza el agente en el sitio de la lesión (*Jubran & Widenfalk, 2003; Chunzheng G, 2008; Silva et al., 2012*).

Desconocemos la vida media del IGF-1 localmente depositado en el injerto muscular, con nuestro intento por sellarlo dentro del bloque de músculo descelularizado con la cola de fibrina (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter, Valencia, España), colocada sobre las suturas. Quizás sí que potencie la regeneración en sus fases iniciales (mejoría del SFI a los 30 días en el grupo de casos), pero resulte insuficiente para mantenerla a ese nivel, y sean alcanzados los resultados por los controles sin IGF-1 en su meseta de acción (se igualan los resultados funcionales a los tres meses).

La estabilidad de los factores de crecimiento es generalmente muy limitada y así, la desnaturalización y la pérdida parcial o completa de la actividad biológica son eventos frecuentes en el procesamiento y la formulación de estos compuestos (*Fu et al., 2000; Zhu et al., 2000*). Por lo tanto, los factores de crecimiento requieren condiciones de proceso muy estrictas, tales como la temperatura (ambiente o baja), poca exposición a solventes orgánicos, y la presencia de aditivos estabilizadores. Por otra parte, para obtener formas de dosificación y sistemas de administración estériles, todos los procesos tienen que ser completados de forma aséptica, porque la esterilización terminal a través de los rayos gamma o calor destruiría las proteínas. El procesamiento aséptico, sin embargo, requiere la validación cuidadosa y es muy costoso económicamente.

Para probar la eficacia terapéutica de los sistemas de entrega de factores de crecimiento, el uso de una dosis local óptima y la cinética de entrega son críticos, pero se desconocen sus propiedades y detalles biológicos. Considerando que la dosis subterapéutica no tendrá ningún efecto, variar las dosis o la cinética de liberación inapropiada puede conducir a la regulación a la baja de la producción inherente de factores de crecimiento y sus receptores o a un aumento de la internalización de los receptores (*Jullien et al., 2002; Geetha et al., 2005*).

La vida media biológica corta de los factores de crecimiento precisa de un sistema de suministro que proteja y libere lentamente estas proteínas durante un período

de tiempo más prolongado, por la demanda de su presencia localmente en la regeneración nerviosa (*Pfister et al., 2007; Moimas et al., 2013*).

Sabemos que varios autores (*Rind et al., 2002; Rabinovsky et al., 2003; Apel et al., 2010*), han descrito liberaciones pulsátiles o continuas de IGF-1 locales mediante bombas conectadas por catéter desde el abdomen de la rata, con potenciación de los resultados nerviosos funcionales e histológicos tras el sacrificio de los animales, con el objetivo de prolongar la vida media de ese factor IGF-1.

Hay varias vías para administrar localmente una proteína en el sitio de la lesión. Si se aplica en un conducto nervioso vacío que puentee el defecto, tiene la ventaja de la asignación del espacio para la regeneración del nervio de manera que los axones pueden reinervar selectivamente el objetivo apropiado. Un conducto cuya luz está llena, proporciona una estructura de soporte que puede favorecer el crecimiento interno celular y la orientación de sus axones; éste sería el caso de la presente experimentación, donde el conducto sería el bloque de músculo y su “contenido”, la estructura acelular del endomisio.

Las minibombas osmóticas son dispositivos implantables, que pueden liberar diferentes fármacos a concentraciones constantes hasta 4 semanas. Un minibomba osmótica se ha utilizado para determinar la ventana terapéutica de los factores de crecimiento tales como BDNF y GDNF. BDNF, por ejemplo, exhibió una respuesta a la dosis bimodal (*Boyd & Gordon, 2002*): altas dosis (0,8 mg / día) inhibieron la supervivencia de las neuronas motoras, mientras que bajas dosis (0,5 a 2 mg / día) no tuvieron ningún efecto detectable después la reparación inmediata, pero invirtieron los efectos negativos de la sección del nervio de 2 meses de evolución. En contraste, el GDNF no mostró dependencia de la dosis dentro del intervalo ensayado (0,1-10 mg / día), pero sí un efecto sinérgico en combinación con BDNF (*Boyd & Gordon, 2003*).

Cuando la administración de fármacos debe realizarse mediante liberación pulsátil en vez de continua, los dispositivos empleados son bombas subcutáneas, que entregan la droga a través de un catéter hasta el sitio de la lesión. El uso de un dispositivo de inyección para la administración diaria de NGF (660 ng) a una sutura epineurial del nervio ciático de la rata, proporciona mayor regeneración de los nervios sin inducir ningún efecto adverso relacionado con el dispositivo (*Johnson et al., 2008*).

Un inconveniente de las minibombas osmóticas y de los dispositivos de inyección es que no son biodegradables, y requieren la extracción quirúrgica al final del tratamiento. Además, su tamaño es importante y el manejo microquirúrgico exigente para colocar el catéter puede llegar a ser problemático en lugares donde el espacio es escaso, tal como en cirugía de la mano o la cirugía experimental en animales pequeños. Además, parece difícil el mantenimiento de la sonda en la posición correcta durante la regeneración del nervio.

Las microesferas poliméricas biodegradables han sido consideradas para la entrega de factores de crecimiento en el contexto tanto de la implantación en el cerebro (*Pean et al., 2000*) como en la combinación con conductos nerviosos para la reparación del nervio periférico. No son utilizadas frecuentemente en el sistema nervioso periférico; esto podría ser debido a la complejidad la tecnología de microencapsulación de proteínas en términos de estabilidad de la proteína y fabricación aséptica.

Las microesferas se introdujeron en tubos de silicona, que se implantaban en un nervio ciático de rata con un defecto de 10 mm (*Xu et al., 2003*). Después de 3 meses, los conductos nerviosos con las microesferas de NGF, contenían un número significativamente mayor de fibras nerviosas y una densidad más alta, en comparación con los grupos control (tubo vacío).

Los factores de crecimiento también han sido unidos mediante cargas eléctricas a la cara luminal de la pared de los conductos nerviosos. El NGF fue covalentemente unido a través de carbodiimida a una gelatina de fosfato tricálcico de la membrana (*Chen et al., 2005*).

El uso de cola de fibrina como un portador de diversos elementos no es nuevo en la literatura; sin embargo, el descubrimiento de que sería capaz de mantener el NGF activo de forma prolongada en el tiempo, liberándolo en la reparación de nervios periféricos, se consideró un gran avance en la microcirugía actual (*Currie et al., 2001*).

El período durante el cual el pegamento de fibrina mantendría NGF activo en la reparación aún tiene que ser definido. De acuerdo con *Bhang et al.*, la liberación de NGF es estable y se mantiene durante dos semanas (*Bhang et al., 2007*); a diferencia de los que describen un pico de liberación en 18 horas, que se reduce progresivamente hasta su completa extinción en 14 días (*Silva et al., 2012*). A diferencia de *Currie et al.*,

que refirieron que la cola de fibrina ya no se encuentra en el sitio de reparación 10 días después de su aplicación, lo que limita la acción de NGF durante un período de tiempo más largo (*Currie et al., 2001*).

Esta característica de la fibrina, como promotor y regulador del depósito y la liberación prolongada de factores de crecimiento, fue uno de los fundamentos para el empleo del Tissucol<sup>®</sup> (Baxter, Valencia, España) en la reparación del defecto nervioso en nuestra investigación. Fue empleada sobre las suturas del injerto de músculo acelular, en el grupo de casos tras la inyección del concentrado de IGF-1. Además, se obtiene el beneficio de otra de sus características, como sellador de cierres quirúrgicos por su carácter hemostático.

Otro aspecto más complejo a ser definido es el gradiente de la liberación ideal de los factores que porte la fibrina. Su definición dependerá de muchos aspectos tales como la densidad de reticulación del gel de fibrina, la concentración de fibrina en el pegamento, su tasa de degradación intrínseca y su disociación ratio heparina (*Bhang et al., 2007*). En nuestro caso, todas estas características no han sido valoradas al ser constantes por la utilización de un mismo preparado comercial en toda la serie Tissucol<sup>®</sup> (Baxter, Valencia, España); reseñable fue nuestro intento de conservar sus propiedades como indica el laboratorio, en congelador, con proceso de descongelación lento y utilización tras alcanzar temperatura ambiente, mezclando sus dos componentes mediante el aplicador que acompaña al producto.

La fibrina ha sido estudiada recientemente en reparaciones término-terminales de nervio periférico, con el propósito principal de la preservación del nervio, manteniéndolo completamente intacto después de la cirugía, y en lugar de las suturas tradicionales, por el miedo a que sean éstas las que limiten los resultados más satisfactorios. En 2010 se confirmó la eficacia de esta técnica a través del análisis funcional y morfométrico (*Silva et al., 2010; Silva et al., 2012*).

Otros autores no encuentran diferencias significativas entre el aporte de factores de crecimiento en reparación mediante sutura término-terminal convencional o con ayuda de fibrina (*Currie et al., 2001*). Y otros no creen en su posible aplicación en humanos, especialmente por la complejidad de la técnica (*Millesi & Schmidhammer, 2007*).

### *8.- Utilidad práctica de nuestros resultados*

El argumento esencial de la investigación es evaluar lo que se puede aprender de la lesión del nervio ciático en el modelo animal, para su posterior aplicación en el tratamiento de una patología similar en los seres humanos, y además así ayudar a predecir un resultado.

Los pacientes con lesión de un nervio periférico se enfrentan a un resultado funcional impredecible y, a menudo, subóptimo, incluso después de la reparación microquirúrgica estándar del nervio. El objetivo principal de la reparación del nervio ciático es la restauración de la sensibilidad protectora de la planta del pie. Los objetivos secundarios incluyen la restauración de la flexión plantar para lograr despegar el pie del suelo durante la marcha (rama tibial) y corregir el pie equino (rama peronea), (*Vayvada et al., 2013*).

La comparación entre la investigación clínica de los pacientes y los resultados de estudios en animales tiene la ventaja de poderse trasladar. Lo verdaderamente interesante de las investigaciones realizadas en el campo de la medicina debe ser la pregunta: ¿Cómo afecta esto al paciente? Es esperable que una mejor comprensión de los mecanismos biológicos de la regeneración del nervio periférico mejore la atención de los pacientes?

Esta investigación ofrece la posibilidad de ampliar el conocimiento sobre el estudio de la marcha: cuáles son las consecuencias de la lesión del nervio ciático, cuáles son las alteraciones en el apoyo podal durante la deambulación, cómo va evolucionando y corrigiéndose el patrón de la marcha, y cuáles son los músculos más implicados.

La investigación en el modelo de rata ha demostrado la presencia de varios factores que pueden influir en la regeneración del nervio y el resultado en los pacientes. Por ejemplo, la importancia del momento de la reconstrucción y reparación ha sido claramente demostrado en el modelo del nervio ciático de la rata (*Maripuu et al., 2012*),

así como los demás parámetros desarrollados en nuestro estudio de los factores pronóstico para la regeneración nerviosa.

Con la elaboración de una experimentación que involucre actos quirúrgicos ejecutables posteriormente en el ser humano, los cirujanos logramos practicar los pasos de la intervención, su abordaje, corregir los detalles técnicos que falten por definir, reconocer los tejidos y sus relaciones topográficas aplicables y criticar activamente las ventajas o desventajas del procedimiento. Además, la repetición del mismo sin consecuencias legales, aunque sí éticas, es una motivación para la innovación y el conocimiento previo a la práctica clínica.

Uno de los principales problemas que pueden secundarse a la cirugía de reparación del nervio periférico es el error al dirigir las conexiones. Los mecanismos por los cuales el proceso de regeneración axonal encuentra su camino hasta el objetivo diana, siguen siendo motivo de debate. Algunos estudios indican que existe una orientación preferente, mientras que otros afirman que los axones que inervan el objetivo equivocado, logran reorientarse (*Abrams & Widenfalk, 2005*). Sin embargo, aunque muchos axones encuentran la diana correcta, otros no lo logran. Esto afecta al resultado funcional después de la reparación del nervio (*Hamilton et al., 2011*).

Los axones motores pueden llegar a conectar con otras fibras musculares que originalmente inervasen otro área. En la reinervación del músculo, un axón puede inervar un mayor número de fibras musculares que antes. Esto conduce a las unidades motoras grandes, que se pueden descubrir a partir de grandes potenciales de acción en el EMG (*Valero-Cabre & Navarro, 2002*). Puede existir también la poliinervación, donde una fibra muscular se activa por dos o más axones, suceso que podría resolverse con el paso del tiempo (*Ijkema-Paassen et al., 2002*). En la lesión del nervio ciático del modelo animal, la mala dirección conduce a la activación simultánea de los músculos antagonistas y a la alteración de la marcha (*Hamilton et al., 2011*). Las conclusiones del estudio en el modelo animal son aplicables al ser humano para evitar las graves consecuencias de la mala orientación axonal en la práctica clínica.

En los seres humanos adultos, la función motora alterada por la mala dirección axonal supone una morbilidad menor que la disfunción sensorial, lo que da lugar a una modificación del patrón de señal de los nervios periféricos al cerebro que requiere un proceso de aprendizaje y rehabilitación para su resolución (*Lundborg & Rosen, 2001*).

También podría hallarse alguna circunstancia de interdigitación entre los axones de las neuronas sensoriales y motoras, que contribuiría a una perturbación severa de la función (*Lundborg & Rosen, 2007*).

Este tipo de lesiones y, aún más, las consecuencias de su reparación incompleta o defectuosa, suponen al sistema de salud, un coste económico elevadísimo, que actualmente la crisis económica mundial no puede asumir. Las pérdidas de producción de todos los pacientes que abandonan temporalmente su trabajo para su curación y/o mejoría, el mantenimiento de sus bajas laborales, a mayores del coste directo de sus tratamientos, hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que mejoren la efectividad y la eficiencia de los resultados, y disminuya la morbilidad asociada a los tratamientos actuales. Éstas serían razones de peso para la justificación de la realización de la actual investigación, y el análisis crítico de sus resultados.

La evolución del modelo animal nos ayuda a enfrentarnos con el caso clínico y poder ofrecer al paciente y sus familias más información sobre el posible progreso de la lesión y su pronóstico. Por suerte, este tipo de patologías no son tan frecuentes en la práctica diaria como para adquirir, sólo a través de los casos clínicos, la capacidad para predecir su evolución. Es importante que el cirujano y el paciente sepan cuándo se ha alcanzado el punto final de la recuperación. De acuerdo con la literatura, se pueden encontrar mejoras significativas dentro de los 5 primeros años de evolución (*Rosen & Lundborg, 2001*); y no se pueden obtener conclusiones sobre la evolución definitiva de la lesión si no han transcurrido al menos 3 años de la misma (*Bruyns et al., 2003*). La investigación enriquece nuestro conocimiento sobre el pronóstico de secuelas por un lado, y sobre la necesidad de baja laboral por el otro, dos factores que incrementan la morbilidad de esta patología, y preocupan al paciente. Así, podremos adelantarnos ofreciendo al paciente alternativas a sus complicaciones o cirugía paliativa de sus secuelas.

El reto de mejorar los resultados después de procedimientos quirúrgicos sobre el nervio periférico, logra la motivación de muchos equipos de trabajo, tanto en el ámbito clínico como experimental. Algunos tratamientos innovadores se aplican actualmente a una variedad cada vez mayor de los pacientes, mientras que otros requieren un mayor desarrollo antes de la traducción a los sujetos humanos.

No todos los procedimientos aplicados en el modelo animal son susceptibles de emplearse en humanos y, por tanto, sus resultados no son siempre extrapolables. La deambulaci3n es una acci3n autom1tica en la rata y tiene un menor impacto que en el comportamiento humano. El hombre adulto, con menor tasa de reinervaci3n y distancias m1s largas que superar, precisa de mayor trabajo postquir1rgico personal en el tiempo para rehabilitar la funci3n gradualmente.

Uno de los grandes beneficios que presentan los modelos de nervio ci1tico de rata es que es posible realizar la pre-degeneraci3n o procesamiento del nervio ci1tico contralateral a la lesi3n planificada y utilizar 3ste como un injerto. En los seres humanos, esto no es factible. Es probable que sea una de las pocas estrategias que se beneficia de los efectos de la pre-degeneraci3n y posterior utilizaci3n como autoinjerto unos pocos d1as despu3s de la lesi3n.

El empleo cl1nico de los injertos acelulares de m1sculo esquel3tico es a1n muy limitado a un peque1o n1mero de pacientes tratados de lesiones de los nervios digitales (*Royanovic et al., 2007*). Las investigaciones sobre el l1mite de la regeneraci3n axonal en estos injertos ayudar1 a definir sus limitaciones cl1nicas y a evitar el entusiasmo exagerado que ha podido conducir, por ejemplo, a su fallo cuando han sido empleados en defectos de longitud a1n no investigada (*Moore et al., 2009; Moore et al., 2011*).

Como los injertos musculares no poseen c3lulas de Schwann, se limita su uso en grandes defectos (5 mm de rata equivalen a 6 cm de humanos), (*Oliviera et al., 2004*). Pero, considerando los resultados morfol3gicos y funcionales favorables, el uso del injerto muscular puede suponer una herramienta potencialmente aplicable en humanos, restringiendo su uso a defectos de escasa magnitud, hasta que las longitudes mayores sean investigadas.

### *9.- Perspectivas de investigación futura*

El trasplante celular es otra estrategia para crear un entorno favorable para la regeneración nerviosa. Las células más obvias a utilizar son las células de Schwann autólogas. Se sintetizan moléculas de adhesión (CAMs) de la superficie celular, y construyen membranas para el apoyo y la orientación de los brotes axonales. Además, las células de Schwann son responsables de la secreción de factores de crecimiento, tales como NGF, BDNF, NT-3, GDNF (*Höke et al., 2006*), y aseguran la supervivencia y la regeneración de las neuronas. Sus limitaciones principales son la sensibilidad biológica, el número manejable de factores de crecimiento, y el perfeccionamiento de su cinética de liberación.

En la práctica, el uso de las células de Schwann autólogas resulta poco factible porque se necesitan al menos 3 semanas para su proliferación *ex vivo* y posterior purificación, para obtener un número suficiente de células viables. Este largo proceso puede poner en peligro el beneficio terapéutico en situaciones donde es posible y esencial la reparación inmediata. Por otra parte, la proliferación *ex vivo* de las células de Schwann es relativamente costosa (trabajo, tiempo, infraestructura) y está en riesgo inherente de contaminación.

Para acortar y facilitar el proceso de extracción de celular a partir de tejido nervioso y la expansión *in vitro*, que por lo general toma 3-8 semanas, Nilsson et al. demuestran que, aunque las células de Schwann aisladas previamente e inyectadas en un tubo de silicona, mejoran los parámetros de regeneración de un defecto nervioso, no alcanzan los resultados que se obtienen con los injertos autólogos de nervio periférico donante (*Nilsson et al., 2005*).

Las células de Schwann también se han combinado con factores de crecimiento dentro de un conducto nervioso (*Bryan et al., 2000*). La combinación produjo una mayor mielinización, una velocidad de conducción eléctrica más rápida, pero un número más pequeño de axones y de vasos sanguíneos que el conducto cargado sólo con los factores. Por lo tanto, la combinación de las células de Schwann y el factor de crecimiento parece que ejercen un efecto sinérgico.

Las células estromales de la médula ósea, también conocidas como células madre mesenquimales (MSC), también han sido diferenciadas con éxito en células neuronales (*Hermann et al., 2004*).

La transferencia de genes en los nervios dañados o a través de las células de Schwann, también se ha propuesto como alternativa promotora de la reparación del nervio periférico. Las dificultades para la transferencia de genes *in vivo* se explican por la baja eficiencia de la práctica del procedimiento y, en el caso de vectores virales, por su, hasta ahora, dudosa seguridad (*Gonin et al., 2005*).

A partir de la experimentación actual, surgen nuevas dudas que nuestro grupo de trabajo tendrá que seguir descifrando con las próximas experimentaciones. Algunas de las más destacables serían:

- El axón utiliza el endomisio para pasar a través del músculo, ¿pero podría pasar también a través del endomisio intersticial? Nos planteamos si realmente resulta necesaria la presencia de un soporte físico que sustente la regeneración nerviosa, o ésta podría producirse espontáneamente, sin precisar ninguna guía. Esta duda es compartida con algunos autores (*Höke et al., 2006*).
- La fibrina empleada como sello para nuestras suturas, ¿podría generar más fibrosis y dificultar la disección de las piezas, incluso con pérdida de material? Sería otro característica a destacar de la fibrina a mayores de las descritas previamente como sellador de cierres quirúrgicos, hemostático, depósito y regulador de la liberación de proteínas como los factores de crecimiento (*Jubran & Widenfalk, 2003; Bhang et al., 2007; Chunzheng et al., 2008*). Ninguno de ellos hace referencia a la fibrosis secundaria en el campo quirúrgico.
- El músculo parece un buen vehículo para el IGF-1, ¿cómo podríamos prolongar la vida media? Se han descrito varios procedimientos sobre los que se debe seguir investigando (*Rind et al., 2002; Rabinovsky et al., 2003; Apel et al., 2010*).

Se abre así una nueva línea de investigación en la que trataremos de encontrar el estímulo físico y/o farmacológico para lograr prolongar la supervivencia del factor IGF-1 para potenciar la regeneración nerviosa en defectos críticos del SNP.

Además, proponemos investigar sobre la reparación de lesiones en los nervios periféricos mediante el implante de un nuevo tipo de prótesis, basado en segmentos acelulares de nervio alogénico.

No es posible examinar todas las posibilidades futuras en este campo de la investigación. Sin embargo, algunas perspectivas de investigación directamente relacionada con esta tesis podrían ser:

- En futuros estudios experimentales sobre la promoción de la regeneración de una lesión nerviosa, la evaluación del tipo de técnica debe ser considerada cuidadosamente. Son preferibles medidas cuantificables, que estén directamente relacionadas con la hipótesis de trabajo.
- La investigación experimental se enriquece con los estudios electrofisiológicos, pero éstos requieren una inversión en conocimientos técnicos. Cuando se decide realizar mediciones neurofisiológicas como un método de evaluación, las medidas ex vivo son preferibles a la electrofisiología convencional. Algo similar se podría reflejar sobre la inmunohistoquímica, que quizás sea más accesible para nuestro equipo de trabajo.
- Deberían plantearse estudios sobre las propiedades físicas del tejido nervioso, su resistencia a la tracción o a la tensión, su relación con la estructura fascicular/no fascicular, la heterogenicidad de su arquitectura o la distribución del colágeno en las diferentes regiones del nervio periférico.
- La práctica experimental de las vías de administración de los factores de crecimiento que faciliten la prolongación de su vida media, siendo conscientes durante su planteamiento, de la necesidad de involucrarse en un proyecto cuyo protocolo sea factible, por conocimientos y medios, y aplicable clínicamente.
- La ampliación del tamaño muestral para evitar los sesgos asociados a la pérdida de animales, a la manipulación por otros grupos de trabajo o al zar. Las

reflexiones tras una experimentación cuya muestra es amplia, ofrecen mayor seguridad y confianza en los resultados obtenidos.

Idealmente, la regeneración del nervio periférico y el efecto terapéutico de una estrategia de reparación deben ser estimados en un montaje experimental, donde la recuperación funcional y la regeneración estructural se pueden estudiar simultáneamente.

El resultado funcional de la reparación de defectos nerviosos de escasa longitud (6-8 mm), se ve crucialmente influenciado por el tiempo de la reparación. No así los defectos críticos, cuya principal brecha a salvar es el defecto en sí mismo, donde los axones requieren una orientación correcta y un soporte neurotrófico suficiente para la regeneración axonal. Estas lesiones tardarán un tiempo prolongado en lograr superar el defecto y la demanda de factores promotores cambiará a lo largo del procedimiento de reparación. Sería perfecto lograr un sistema de administración capaz de responder a los estímulos del medio ambiente local.

Posiblemente la estructura que mejor cumpla esos requisitos sea la célula de Schwann autóloga, sembrada en fibras longitudinalmente alineadas y orientadas hacia el muñón distal del nervio. Al sintetizar componentes de la lámina basal y factores de crecimiento, contribuyen a la regeneración exitosa. Por lo tanto, puede ser apropiado retrasar el tratamiento de los defectos críticos para el aislamiento previo y posterior cultivo ex vivo de las células de Schwann autólogas (*Pfister et al., 2007*).

El análisis de los resultados debe ser completo y abordar los diferentes tipos de parámetros, para que sus conclusiones sean fidedignas. Los parámetros histomorfométricos como la densidad y el diámetro del axón, dan información acerca de la cantidad de regeneración, mientras que los parámetros como el grosor de la vaina de mielina proporciona información sobre la calidad y madurez de los axones regenerados. Sin embargo, la densidad de los axones puede ser sobreestimada cuando se generan brotes axonales anormales a nivel de la reparación, y se calcula contando todos los axones in situ.

Estos parámetros estereológicos, además, dan una impresión basada principalmente en la condición física de los nervios regenerados y no predicen el

beneficio sobre la función motora y/o sensorial (*van Neerven et al., 2012*). En contraste, los análisis del comportamiento del animal agregan la información que falta sobre el efecto funcional de la estrategia de reparación. Entre la gran variedad de pruebas disponibles, el SFI ha demostrado ser un método fiable, válido y altamente eficiente para determinar la recuperación funcional después de la lesión del nervio periférico (*Bervar M, 2000; Bozkurt et al., 2008*).

El enfoque multimodal es esencial en la evaluación de la regeneración del nervio periférico. Así que cuando se pone a prueba el impacto de nuevas terapias nerviosas, la elucidación de la correlación estructural-funcional es obligatoria (*van Neerven et al., 2012*).

La denervación crónica del muñón distal en sí misma juega un papel clave en la reducción del éxito de la reparación del nervio, pero también influye la presencia de músculo denervado crónicamente, lo que reduce la capacidad de regeneración de las neuronas después de un periodo de tiempo prolongado (*Michalski et al., 2008*). Existe una disminución del 60% en el número de motoneuronas que regeneran sus axones, independientemente de la existencia de músculo denervado, mientras mantenga su continuidad. Este coeficiente se reduce al 15% si la reparación es inmediata, siempre y cuando los axones crecen a través de un injerto de nervio recién seccionado, en un muñón distal conectado al músculo diana distal (*Gordon et al., 2011*).

El curso temporal de la denervación demuestra que el entorno de crecimiento permisivo de los autoinjertos es transitorio, incluso cuando los injertos son cortos. Los axones en crecimiento de cualquier reparación que precise la interposición de un conducto, atraviesan dos sitios de sutura. Las células de Schwann normalmente migran a través de estos sitios para montar el sustrato de laminina sobre la que broten los axones y crezcan. Sin embargo, la laminina del sitio de la reparación está desorganizada hasta el 5° día, cuando las células de Schwann comienzan a infiltrarse en el tejido que invaden (*Witzel et al., 2005*). Los axones cruzan una línea de sutura dentro de los primeros 28 días (*Brushart et al., 2002*). De esto se desprende que el cruce de todos los axones en regeneración a través de un injerto de 15-mm, precisa de 10 semanas, incluso después de una reparación inmediata, reconociendo como válida una tasa de regeneración de 1-3 mm / d.

La pérdida de fibras musculares puede ser exacerbada por la inmovilidad que con frecuencia acompaña a la denervación del músculo. Las extremidades inmovilizadas conllevan un riesgo de isquemia, estasis venoso, y edema, todo lo cual puede afectar negativamente a la nutrición del músculo y su posterior recuperación (*Gordon et al., 2011*).

La regeneración de los axones muestra una fuerte preferencia por crecer a lo largo de los tubos de lámina basal de las células de Schwann en el muñón distal del nervio. La generación de varias ramas colaterales de axones no lesionados es el mecanismo por el que aumenta la precisión de la regeneración (*Pfister et al., 2007*).



## ***CONCLUSIONES***

---



Los métodos experimentales validados en este estudio, que aportan datos de resultados cuantificables, proporcionan una evidencia sólida para posibles estrategias beneficiosas en la recuperación de las lesiones críticas del nervio periférico.

### CONCLUSIÓN 1.-

El método biológico seleccionado para tratar químicamente el injerto de músculo estriado logra la descelularización adecuada del mismo, mediante el protocolo de detergentes químicos escogido. Este método alcanza una escisión casi completa del mioplasma y otros constituyentes celulares, mientras que preserva los tubos de lámina basal (no afecta a la laminina ni al colágeno tipo IV), y el contorno original de las fibras musculares.

### CONCLUSIÓN 2.-

Se demuestran los criterios a favor que este tipo de injerto posee para lograr una regeneración óptima. En primer lugar, el bloque de músculo acelular muestra similar rigidez mecánica a la de un nervio sano, con gran biocompatibilidad y mínima inducción de respuesta autoinmune frente al material extraño, puesto que se considera un injerto alogénico. Aporta componentes de la matriz extracelular de origen natural, tales como el colágeno I/IV y la laminina, que tienen un impacto profundo en el destino de los axones del nervio puente y estimulan a las células neuronales en crecimiento, en términos de migración y reparación celular.

### CONCLUSIÓN 3.-

Los axones en regeneración pueden pasar a través de un defecto de 15 mm de longitud del nervio ciático de la rata, gracias a la incorporación de un injerto de músculo esquelético descelularizado. El estudio funcional de los nervios tratados confirma el éxito de la técnica puesta a juicio. Parece que la restauración de la función sensitiva supera a la velocidad de crecimiento de las fibras nerviosas motoras, a juzgar por la recuperación trófica de la extremidad.

### CONCLUSIÓN 4.-

Las fibras musculares acelulares definen tubos de lámina basal que podrían apoyar la regeneración axonal, actuando como matrices para el crecimiento de los axones, cuando se injertan en un defecto nervioso. La lámina basal del músculo es probable que sea capaz de "guiar" los axones en crecimiento. Se logra con éxito la repoblación del cabo distal con axones en regeneración, alcanzando una apariencia macroscópica y microscópica de nervio tras los 90 días de seguimiento postoperatorio.

### CONCLUSIÓN 5.-

La evolución de las lesiones del nervio ciático tratadas con el aporte de un concentrado de IGF-1, apoya el papel del factor de crecimiento como impulsor de la regeneración nerviosa. El estudio de la marcha demuestra que el aporte del concentrado de IGF-1 en los injertos acelulares de músculo esquelético, acelera la recuperación del periodo postoperatorio inmediato respecto del grupo control, observando patrones de deambulación más activos, con implicación funcional precoz de la extremidad afectada en el patrón normal de la marcha. Todo ello se refleja en la mejoría del aspecto macroscópico de la misma.

### CONCLUSIÓN 6.-

Los estudios estereológicos de las secciones biológicas permiten cuantificar el incremento del número total de axones, de la densidad de los mismos y del espesor de la mielina, a partir del estudio microscópico de las piezas histológicas de los animales tratados con el factor de crecimiento IGF-1. Esta mejoría histomorfométrica respecto a la reparación sin dicho concentrado, es correlativa a los hallazgos evolutivos y funcionales.

### CONCLUSIÓN 7.-

La aplicación de un concentrado de factores de crecimiento tipo insulínico potencia los resultados obtenidos en el grupo control. La regeneración del nervio periférico requiere una compleja interacción entre células, matriz extracelular y factores de crecimiento. La presencia local de factores de crecimiento juega un papel importante en el control de la supervivencia, migración, proliferación, y diferenciación de los diversos tipos de células implicadas en la regeneración del nervio.

### CONCLUSIÓN 8.-

Los factores de crecimiento administrados localmente logran un efecto terapéutico adecuado, pero su vida media corta demuestra que a largo plazo su beneficio es limitado en el tiempo. Este hallazgo obliga a la búsqueda de caminos diferentes para su liberación local; el objetivo es mantener los factores de forma prolongada en el tiempo para que no se detenga su efecto beneficioso para la regeneración nerviosa.

### CONCLUSIÓN 9.-

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación confirman la veracidad de la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) propuesta al inicio de la experimentación, que dice que existen diferencias estadísticamente significativas en la reparación de un defecto crítico del nervio ciático de rata, mediante un injerto de músculo estriado alogénico descelularizado, enriquecido con factores de crecimiento tipo IGF-1, frente a la abstención en el uso de factores de crecimiento dentro del mismo tipo de injerto muscular.

### CONCLUSIÓN 10.-

Los estudios experimentales en el modelo de rata, permiten evaluar sus resultados para obtener conclusiones, y aplicarlo en la práctica clínica para su utilización en humanos. La lámina basal de la fibra muscular podría ser utilizada como un autoinjerto nervioso. Los pequeños segmentos de músculo, extraídos del propio paciente sin ninguna secuela funcional y tratados químicamente, podrían suponer una ventaja práctica respecto a los autoinjertos de nervio periférico, cuya morbilidad resulta en muchos casos, insalvable.

## *CONCLUSIONS*

---



Experimental methods validated in this study, which generate quantifiable outcomes data, provide strong evidence for possible beneficial strategies in the recovery of peripheral nerve critical injuries.

### **CONCLUSION 1.-**

The selected biological method for chemical treatment skeletal muscle graft achieves adequate decellularization thereof by the elected chemical detergents protocol. This method reaches an almost complete sarcoplasm cleavage and other cellular components while preserving the basement membrane tubes (not affect the laminin or type IV collagen), and the original contour of the muscle fibers.

### **CONCLUSION 2.-**

This type of graft has different characteristics to achieve optimal regeneration. First, the acellular muscle block shows similar mechanical rigidity as a healthy nerve with great biocompatibility and minimal induction of an autoimmune response against foreign material, since it is considered allogeneic graft. It brings the extracellular matrix components of natural origin, such as collagen I / IV and laminin, which have a profound impact on the fate of the bridging nerve axons and it stimulates the growth of neuronal cells.

### **CONCLUSION 3.-**

Regenerating axons can with the addition of a decellularized skeletal muscle graft pass through a defect of 15 mm in the rat sciatic nerve. The functional study of treated nerves confirms the success of the technique put to trial. It seems that sensory function is rapidly resored and it exceeds growth of motor nerve fibers, as judged by the trophic recovery of the limb.

#### **CONCLUSION 4.-**

Acellular muscle fibers have basal lamina tubes that support axonal regeneration, acting as matrices for the growth of axons, when grafted into a nerve defect. The muscle basal lamina is likely to be able to "guide" the growing axons. It succeeds in restocking the distal stump with regenerating axons, reaching a macroscopic and microscopic appearance of a nerve after 90 days postoperative follow-up.

#### **CONCLUSION 5.-**

The headway of sciatic nerve injuries treated with the treatment of concentrated IGF-1 supports the role of that growth factor as a promoter of nerve regeneration. Gait analysis shows that the contribution of the concentrated IGF-1 in acellular skeletal muscle grafts accelerates recovery in contrast to the control group, as observed by active track patterns with early functional involvement of the affected leg in the normal gait. This is also reflected in an improvement of the macroscopic appearance of the limb.

#### **CONCLUSION 6.-**

Stereologic microscopical quantification studies of sections showed an increase in the total number of axons, its axonal density and in the myelin thickness in the animals treated with the growth factor IGF-1. The histomorphometric improvement correlated with developmental and functional findings.

#### **CONCLUSION 7.-**

Applying a concentrate of insulin-like growth factor enhances the results obtained in the control group. Peripheral nerve regeneration requires a complex interaction between cells, extracellular matrix and growth factors. The local presence of growth factors plays a role in controlling survival, migration, proliferation, and differentiation of various cell types, which are involved in nerve regeneration.

**CONCLUSION 8.-**

Locally administered growth factors (i.e. IGF-1) achieve adequate therapeutic effect, but its short half-life shows that its benefit is limited in time. This finding requires the search of different ways for local release; the goal is to maintain factors for a longer time to not halt its beneficial effect on nerve regeneration.

**CONCLUSION 9.-**

The results obtained during that present investigation confirm the veracity of the alternative hypothesis ( $H_1$ ) proposed at the beginning of the experiment. There are significant differences in the repair of a critical defect of rat sciatic nerve by acellular allogeneic striated muscle graft, enriched with growth factors IGF-1 instead of abstention from the use of growth factors within the same type of muscle graft.

**CONCLUSION 10.-**

Experimental studies in the rat model allow us to assess their outcomes to draw conclusions, and apply these in clinical practice for the use in humans. The basal lamina of the muscle fiber could be used as a nerve autograft. Small muscle segments, extracted from the patient without any functional sequelae and chemically treated, may be a practical advantage compared to the use of peripheral nerve autograft.



## ***BIBLIOGRAFÍA***

---



- Abernethy** DA, Thomas PK, Rud A, King RH. Mutual attraction between emigrant cells from transected denervated nerve. *J Anat.* 1994; 184: 239-49.
- Abrams** M, Widenfalk J. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury. *Restor Neurol Neuros* 2005, 23:367–382.
- Aguayo** AJ, Bray GM, Terry LC, Swezey E. Three dimensional analysis of unmyelinated fibers in normal and pathologic anatomic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 1976; 35: 136-151.
- Ahmed** MR. Peripheral nerve regeneration in cell adhesive peptide incorporated collagen tubes in rat sciatic nerve – early and better functional regain. *J Peripher Nerv Syst* 2005; 10:390–391.
- Alant** JD, Kemp SW, Khu KJ, Kumar R, Webb AA, Midha R. Traumatic neuroma in continuity injury model in rodents. *J Neurotrauma.* 2012. 20; 29(8):1691-703.
- Antoine** JC. Anatomie et physiologie du nerf périphérique. *Encycl. Méd. Chir* (Elsevier, Paris-France), Appareil locomoteur, 14-005-A-10, 1999, 4-p.
- Apel** PJ, Ma J, Callahan M, Northam CN, Alton TB, Sonntag WE, Li Z. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during aging: an experimental study in rats. *Muscle Nerve.* 2010; 41(3):335-41.
- Appenzeller** O, Dhital KK, Corvan T, Burnstock G. The nerves to blood vessels supplying blood to nerves: the innervation of the vasa nervorum. *Brain Res* 1984; 304: 383-386.
- Appenzeller** O, Lincoln J, Zumwalt R, Zamir H. Vasa nervorum and nervi nervorum: adrenergic and peptidergic innervation of normal and neuropathic sural nerves. *Ann Neurol* 1989; 26: 185-189.
- Arbuthnott** ER, Boyd IA, Kalu KU. Ultrastructural dimensions of myelinated peripheral nerve fibres in the cat and their relation to conduction velocity. *J Physiol.* 1980; 308:125-57.
- Arias** J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. *Implante de órganos*. Ed. Garsi. Madrid, 1988.

**Ashley Z**, Sutherland H, Lanmuller H, Russold MF, Unger E. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:440–451.

**Attal N**, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P; EFNS Task Force. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 2006; 13:1153–1169.

**Aydin A**, Ozkan T, Aydin HU, Topalan M, Erer M, Ozkan S, Yildirim ZH. The results of surgical repair of sciatic nerve injuries. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2010; 44(1):48-53.

**Bain JR**, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 129-38.

**Bakkum DJ**, Frey U, Radivojevic M, Russell TL, Müller J, Fiscella M, Takahashi H, Hierlemann A. Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *Nat Commun.* 2013. 19; 4:21-81.

**Baptista PM**, Orlando G, Mirmalek-Sani SH, Siddiqui M, Atala A, Soker S. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009; 2009: 6526-9.

**Barker R**, Schiferer A, Gore C, et al. Femoral nerve blockade administered preclinically for pain relief in severe knee trauma is more feasible and effective than intravenous metamizole: a randomized controlled trial. *Journal of Trauma.* 2008; 64(6):1535–1538.

**Baron-Var Evercooren A**, Kleinman HK, Ohno S, Marangos P, Schwartz JP, Dubois-Dalcq ME. Nerve growth factor, laminin and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures. *J Neurosci Res* 1982; 8: 179-93.

**Baryshnikova LM**, Von Bohlen Und Halbach O, Kaplan S, Von Bartheld CS. Two distinct events, section compression and loss of particles ("lost caps"), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting. *Microsc Res Tech.* 2006; 69(9):738-56.

**Battiston B**, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery.* 2005; 25(4):258-67. Review.

**Battiston B**, Tos P, Conforti LG, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neuroorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:43-50. Review.

- Battiston B**, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Guglielmone R. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*. 2000; 20(1):37-41.
- Bauder AR**, Ferguson TA. Reproducible Mouse Sciatic Nerve Crush and Subsequent Assessment of Regeneration by Whole Mount Muscle Analysis. *J Vis Exp*. 2012; (60): 3606.
- Bélanger E**, Henry FP, Vallée R, Randolph MA, Kochevar IE, Winograd JM, Lin CP, Côté D. In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model. *Biomed Opt Express*. 2011.1; 2(9):2698-708.
- Bersnev VP**, Khamzaev RI, Boroda IuI. Results of using an epineural suture of the sciatic nerve. *Vestn Khir Im I I Grek*. 2009; 168(1):61-3.
- Bertelli JA**, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods*. 1995; 58(1-2):151-5.
- Bervar M**. Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods* 2000, 102:109–116.
- Bhang SH**, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 80(4):998-1002.
- Bielschowsky M**, Unger E, Die uberbruckung grosser nervenlücken. *J Psychol Neurol*, 1917; 22:267-318.
- Bilego Neto AP**, Silveira FB, Rodrigues da Silva GA, Sanada LS, Fazan VP. Reproducibility in nerve morphometry: comparison between methods and among observers. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:682-849.
- Birch R**, Bonney C, Wynn Parry CB. Surgical disorders of the peripheral nerves. *Edinburg: Churchill Livingstone*, 1998.
- Bistolfi A**, Massazza G, Deledda D, Lioce E, Crova M. Operative Management of Sciatic Nerve Palsy due to Impingement on the Metal Cage after Total Hip Revision: Case Report. *Case Rep Med*. 2011; 2011:830296.
- Bontioti E**, Dahlin LB, Kataoka K, Kanje M. End-to-side nerve repair induces nuclear translocation of activating transcription factor 3. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2006; 40(6):321-8.
- Bora FW Jr**. A comparison of epineurial, perineurial and epiperineurial methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res*. 1978;(133):91-4.
- Boyd JG**, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002.15:613–626.

- Boyd JG**, Gordon T. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol* 2003;183:610–619.
- Bozkurt A**, Tholl S, Wehner S, Tank J, Cortese M, O'Dey D, Deumens R, Lassner F, Schugner F, Groger A, et al: Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI—a novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). *J Neurosci Methods* 2008, 170:117–122.
- Bradley WG**, Asbury AM. Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Exp Neurol* 26: 275- 282, 1970.
- Brandt K**, Evans GR, Johnson M, Gürlek A, Lohman R, Nabawi A, Williams J, Hodges J, Patrick CW Jr. The effects of cisplatin and vincristine on peripheral nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104(2):464-9.
- Bratton BR**, Kline DG, Coleman W, Hudson AR. Experimental interfascicular nerve grafting. *J Neurosurg*. 1979;51(3):323-32.
- Brauer CA**, Waters PM. An economic analysis of the timing of microsurgical reconstruction in brachial plexus birth palsy. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 970–978.
- Brenner MJ**, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung TH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery*. 2008; 28(4):265–272.
- Brunelli GA**, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery*. 1993; 14(4):247-51.
- Brushart TM**, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* 2002; 22:6631– 6638.
- Brushart TM**. Nerve repair and grafting. Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC (ed). *Green's Operative Hand Surgery*. New York: Churchill Livingstone, 1999, 1381-403.
- Bruyns C**, Jaquet J, Schreuders T, Kalmijn S, Kuypers P, Hovius S. Predictors for return to work in patients with median and ulnar nerve injuries. *J Hand Surg [Am]*. 2003; 28: 28 -34.
- Bryan DJ**, Holway AH, Wang KK, Silva AE, Trantolo DJ, Wise D, Summerhayes IC. Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000; 6:129–138.
- Bryan DJ**, Miller RA, Costas PD, Wang KK, Seckel BR. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1993; 92: 927-40.

**Bunge RP.** Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 1993; 3: 805-9. Review.

**Burke FD.** Principles of hand surgery. *Edinburg: Churchill Livingstone*, 1990.

**Burkel WE.** Perineurium, endoneurium and tissue space in peripheral nerve. *Anat Rec* 1966; 154: 325.

**Burkel WE.** The histological fine structure of peineurium. *Anat Rec* 1967; 168: 177-190.

**Burnett MG, Zager EL.** Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury: A Brief Review. *Neurosurg Focus.* 2004;16(5).

**Cajal RS.** Degeneration and regeneration of the nervous system. Vol 1. London: *Oxford University Press*, 1928.

**Cajal S.R.** Degeneration and regeneration of the nervous system. *R.M. May* (Trans. Ed.), New York, Hafner Publishing Co. Vol. 1, 361. 1928.

**Cajal S.R.** Mecanismo de la regeneración y degeneración de nervios. *Trab Lab Invest Biol Madrid* 4:119, 1905.

**Calder JS, Norris RW.** Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: a preliminary communication. *Br J Plast Surg.* 1993; 46(7):557-64.

**Campbell WW.** Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119(9):1951-65.

**Canan S, Bozkurt HH, Acar M, Vlamings R, Aktas A, Sahin B, Temel Y, Kaplan S.** An efficient stereological sampling approach for quantitative assessment of nerve regeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34(6):638-49.

**Carbonetto S, Lindenbaum M.** The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. *Curr Opin Neurobiol.* 1995; 5(5):596-605. Review.

**Caroni P, Grandes P.** Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol.* 1990; 110(4):1307-17.

**Carpenter JW.** Exotic animal formulary (4th ed.). Philadelphia, Pa.: *Saunders*. 2002.

**Carrero G.** Fascicular anatomy, nervi nervorum, and paresthesia. *Reg Anesth Pain Med.* 2003; 28(1):72-3

**Casha S**, Yong VW, Midha R. Minocycline for axonal regeneration after nerve injury: a double-edged sword. *Exp Neurol*. 2008; 213(2):245-8.

**Castro J**, Negrodo P, Avendaño C. Fiber composition of the rat sciatic nerve and its modification during regeneration through a sieve electrode. *Brain Res*. 2008 23; 1190:65-77.

**Cauley KA**, Filippi CG. Diffusion-tensor imaging of small nerve bundles: cranial nerves, peripheral nerves, distal spinal cord, and lumbar nerve roots- clinical applications. *AJR Am J Roentgenol*. 2013; 201(2):W326-35.

**Chen PR**, Chen MH, Lin FH, Su WY. Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. *Biomaterials* 2005; 26:6579–6587.

**Chiu DT**, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*. 1982; 91(2):226-33.

**Choi D**, Li D, Raisman G: Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and DiI. *J Neurosci Methods* 2002, 117:167–172.

**Chunzheng G**. Siatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: An experimental study. *Injury* 2008; 39(12): 1414-1420.

**Chunzheng G**, Shengzhong M, Yinglian J, Ji-E W, Jianmin L. Sciatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: an experimental study. *Injury*. 2008; 39(12):1414-20.

**Ciaramitaro P**, Mondelli M, Logullo F, Grimaldi S, Battiston B, Sard A, Scarinzi C, Migliaretti G, Faccani G, Cocito D. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *J Peripher Nerv Syst*. 2010; 15(2):120-7.

**Clarke E**, Bearn JG. The spiral bands of Fontana. *Brain* 1972; 95: 1-20.

**Coetzee JF**. A review of analgesic compounds used in food animals in the United States. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2013; 29(1):11-28.

**Currie LJ**, Sharp JR, Martins R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 108(6):1713-26.

**Dahlin LB**, Anagnostaki L, Lundborg G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2001; 35: 29–34.

**Dahlin LB**, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am*. 2001; 12(2):341-52.

**Dahlin LB**, Stenberg L, Luthman H, Thomsen NO. Nerve compression induces activating transcription factor 3 in neurons and Schwann cells in diabetic rats. *Neuroreport*. 2008; 11;19: 987-90.

**Dahlin LB**: Techniques of peripheral nerve repair. *Scand J Surg* 2008, 97:310–316.

**De Curtis I**. Neuronal interactions with the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 1991; 3(5):824-31. Review.

**De Medinacelli L**, Freed WJ, Wiatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77: 634-639, 1982.

**De Putter CE**, Selles RW, Polinder S, Panneman MJ, Hovius SE, van Beeck EF. Economic impact of hand and wrist injuries: health-care costs and productivity costs in a population-based study. *J Bone Joint Surg Am* 2012, 94:e56.

**De Sá JMR**, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair. Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Meth* 2003; 136:45–53.

**DeFranzo AJ**, Morykwas MJ, LaRosse JR, Jennings DA, Challa V, Argenta LC. Autologous denatured muscle as a nerve graft. *J Reconstr Microsurg*. 1994; 10(3):145-9; discussion 149-51.

**Dellon AL**, Mackinon SE. Alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*.1988; 82:849-56.

**Dellon AL**. Evaluation of sensibility and re-education of sensation in the hand. *Baltimore: Williams and Wilkins*, 1981.

**Dellon E**, LeeA. The first nerve graft, Vulpian, and the nineteenth century neural regeneration controversy. *J Hand Surg Am*. 1993; 18(2):369-72.

**Dennis MJ**, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev Biol*. 1981.30;81(2):266-79.

**Deumens R**, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol*. 2010;92:245-76.

**Dhital K**, Lincoln J, Appenzeller O, Burnstock G. Adrenergic innervation of vasa and nervi nervorum of optic, sciatic, vagus and sympathetic nerve trunks in normal and streptozocin-diabetic rats. *Brain Res* 1986; 367: 39-44.

**Di Benedetto G**, Grassetti L, Mazzucchelli R, Scarpelli M, Bertani A. Peripheral nerve regeneration: autologous conduit of vein plus perineurium. *Eur J Plast Surg* 2009; 32:33–36.

**Dinh P**, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery*. 2009; 29(8):644-9.

**Dosios T**. Neuroapraxia. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80(2):791-2.

**Duckett S**, Scott T. Glycogen in human fetal sciatic nerve. *Rev Can Biol* 1913; 7: 731-737.

**Ducommun D**. Rat Health Care, 6th Edition. *Rat Fan Club*. 2000.

**Dvali L**, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg*. 2003; 30(2):203-21.

**Enver MK**, Hall SM. Are Schwann cells essential for axonal regeneration into muscle autografts? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994; 20(6):587-98.

**Eriksson M**, Karlsson J, Carlsson KS, Dahlin LB, Rosberg HE. Economic consequences of accidents to hands and forearms by log splitters and circular saws: cost of illness study. *J Plast Surg Hand Surg* 2011, 45:28–34.

**Esplin DW**. Independences of conduction velocity among myelinated fibers in cat nerve. *J Neurophysiol* 1962; 25: 805-821.

**Evans GR**. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol*. 2000; 19(3):312-8. Review.

**Feneley MR**, Fawcett JW, Keynes RJ. The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. *Exp Neurol*. 1991; 114(3):275-85.

**Forssman J**. Zur Kenntniss der Neurotropismus. Weiter Beitrage. *Beitrage zur pathologische Anatomie* 1900; 27, 407.

**Fox IK**, Jaramillo A, Hunter DA, Rickman SR, Mohanakumar T, Mackinnon SE. Prolonged coldpreservation of nerve allografts. *Muscle Nerve*. 2005; 31(1):59–69.

**Frey M**, Gruber H, Freilinger G. Is a crossover to the contralateral side by nerve transplants a satisfactory source for reinnervation of a muscle transplant? An experimental study in the rectus femoris muscle of the rabbit. *Microsurgery*. 1983; 4(1):41-50.

**Fricker** FR, Antunes-Martins A, Galino J, Paramsothy R, La Russa F, Perkins J, Goldberg R, Brelstaff J, Zhu N, McMahon SB, Orengo C, Garratt AN, Birchmeier C, Bennett DL. Axonal neuregulin 1 is a rate limiting but not essential factor for nerve remyelination. *Brain*. 2013; 136:2279-97.

**Frijlink** DW, Brekelmans GJ, Visser LH. Increased nerve vascularization detected by color Doppler sonography in patients with ulnar neuropathy at the elbow indicates axonal damage. *Muscle Nerve*. 2013; 47(2):188-93.

**Fu** K, Klibanov AM, Langer R. Protein stability in controlled-release systems. *Nat Biotechnol* 2000.18:24–25.

**Furusho** M, Dupree JL, Nave KA, Bansal R. Fibroblast growth factor receptor signaling in oligodendrocytes regulates myelin sheath thickness. *J Neurosci*. 2012.9; 32(19):6631-41.

**Gambe** HJ, Breathnach AS. An electron microscope study of human foetal peripheral nerves. *J Anat* 1965,99: 573-584.

**Gambe** HJ, Eames RA. An electron microscope study of the connective tissues of human peripheral nerve. *J Anat* 1964; 98: 655-663.

**Gambe** HJ. Comparative electron microscopic observations on the connective tissues of a peripheral nerve and a spinal nerve root in the rat. *J Anat* 1964; 98: 17-24.

**Geetha** T, Jiang J, Wooten MW. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell*. 2005.28; 20(2):301-12.

**Geuna** S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides. *Neurol Res*. 2004; 26(2):139-44.

**Geuna** S, Tos P, Battiston B. Preface: Essays on peripheral nerve repair and regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009; 87:21-22.

**Geuna** S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol (Berl)*. 2001; 204(1):1-10.

**Geuna** S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system. *J Comp Neurol*. 2000.20; 427(3):333-9.

**Geuna** S. The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research. *Microsc Res Tech*. 2005.1; 66(5):270-4.

**Giacca M.** Virus-mediated gene transfer to induce therapeutic angiogenesis: where do we stand? *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):527-40.

**Giftochristos N, David S.** Immature optic nerve glia of rat do not promote axonal regeneration when transplanted into a peripheral nerve. *Brain Res*. 1988.1; 467: 149-53.

**Glasby MA, Hitchcock RJI, Huang CLH.** The effect of muscle basement membrane on the regeneration of rat sciatic nerve. *J Bone Joint Surg*. 68B: 829-833, 1986.

**Glazner GW, Morrison AE, Ishii DN.** Elevated insulin-like growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF-supported nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994; 25(3-4):265-72.

**Goedee HS, Brekelmans GJ, Visser LH.** Multifocal enlargement and increased vascularization of peripheral nerves detected by sonography in CIDP: A pilot study. *Clin Neurophysiol*. 2013; 20.

**Goldberg JL, Barres BA.** The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2000; 23:579-612.

**Gonin P, Buchholz CJ, Pallardy M, Mezzina M.** Gene therapy bio-safety: scientific and regulatory issues. *Gene Ther* 2005; 12:146–152.

**Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG.** Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*. 2003; 8(4):236-50.

**Gordon T, Tyreman N, Raji MA.** The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci* 2011; 31(14):5325-5334.

**Gordon T.** The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*. 2009; 26(2):E3.

**Grafstein B.** The nerve cell body response to axotomy. *Exp Neurol* 1975; 48: 32-51.

**Graham RC Jr, Karnovsky MJ.** The histochemical demonstration of uricase activity. *J Histochem Cytochem*. 1965; 13(6):448-53.

**Gramsbergen A, J IJ-P, Meek MF.** Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. *Exp Neurol*, 2000; 161:183–193.

**Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD.** Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004; 24(5):408-15.

**Guerra Romero L.** Evidence-based medicine: trying to approximate science to the art of clinical practice. *Med Clin (Barc)*. 1996.28; 107(10):377-82.

**Gupta SK**, Pringle J, Poduslo JF, Mezei C. Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. *J Neurosci Res.* 1993; 34:14-23.

**Guyatt GH**, Kirshner B, Jaeschke R. A methodologic framework for health status measures: clarity or oversimplification? *J Clin Epidemiol.* 1992; 45(12):1353-5.

**Guyton A.** Anatomía y fisiología del sistema nervioso. *Editorial Médica Panamericana*, 1994.

**Haisheng H**, Songjie Z, Xin L. Assessment of nerve regeneration across nerve allografts treated with tacrolimus. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2008; 36(5):465-74.

**Hall S.** Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 1997;190 ( Pt 1):57-71.

**Hall S.** The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 2005; 87(10):1309-19. Review.

**Hall SM**, Enver K. Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts. An immunohistochemical and electron microscopic study. *J Hand Surg Br.* 1994; 19(4):444-51.

**Hamilton SK**, Hinkle ML, Nicolini J, Rambo LN, Rexwinkle AM, Rose SJ, Sabatier MJ, Backus D, English AW. Misdirection of regenerating axons and functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *J Comp Neurol* 2011, 519:21–33.

**Hanz S**, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron.* 2003.18; 40(6):1095-104.

**Harbour R**, Miller J. A new system for grading recommendations in evidence based guidelines. *BMJ.* 2001.11; 323(7308):334-6.

**Harris ME**, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 1991; 2(1):93-104.

**Harris RP**, Helfand M, Woolf SH, Lohr KN, Mulrow CD, Teutsch SM, Atkins D; Methods Work Group, Third US Preventive Services Task Force. Current methods of the US Preventive Services Task Force: a review of the process. *Am J Prev Med.* 2001; 20(3):21-35.

**Hermann A**, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117:4411–4422.

**Höke A**, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OA. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol*. 2002; 173(1):77-85.

**Höke A**, Redett R, Madeed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, Griffin JW, Brushart TM. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J Neurosci* 2006. 26:9646–9655.

**Höke A**. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(8):448-54.

**Hopayian K**, Song F, Riera R, Sambandan S. The clinical features of the piriformis syndrome: a systematic review. *Eur Spine J*. 2010; 19(12):2095-109.

**Hope J**, Bourne GH. Electron microscope demonstration of the perineural epithelium in rat peripheral nerve. *Acta Anat* 1963; 52: 193-201.

**Howard L**, Wyatt S, Nagappan G, Davies AM. ProNGF promotes neurite growth from a subset of NGF-dependent neurons by a p75NTR-dependent mechanism. *Development*. 2013; 140(10):2108-17.

**Hromada J**. On the nerve supply of the connective tissue of some peripheral nervous system, components. *Acta Anat* 1963; 55: 343-352.

**Hudson AR**, Hunter D, Kline DG, Bratton BR. Histological studies of experimental interfascicular graft repairs. *J Neurosurg*. 1979; 51(3):333-40.

**Hudson TW**, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*. 2004; 10(9-10):1346–1358.

**Hudson TW**, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, Schmidt CE. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng*. 2004b; 10(11-12):1641–1651.

**Huerkamp**, Michael J. The Use of Analgesic in Rodents and Rabbits. *Emory University, website*, updated 2/16/2000.

[http://www.emory.edu/WHSC/MED/DAR/Analgesic\\_drugs.htm](http://www.emory.edu/WHSC/MED/DAR/Analgesic_drugs.htm).

**Humphries MJ**, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K, Yamada KM. Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. *J Cell Biol*. 1988; 106(4):1289-97.

**Hunt J**, Bussière LF, Jennions MD, Brooks R. What is genetic quality? *Trends Ecol Evol*. 2004; 19:329-33.

**Hunter DA**, Moradzadeh A, Whitlock EL, Brenner MJ, Myckatyn TM, Wei CH, Tung TH, Mackinnon SE. Binary imaging analysis for comprehensive quantitative

histomorphometry of peripheral nerve. *Journal of neuroscience methods*. 2007; 166(1):116–124.

**Ichihara S**, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury*. 2008; 39(4):29-39.

**Ide C**. Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina: observations of the long-term regeneration. *Arch Histol Jpn*. 1983; 46(2):243-57.

**Ijkema-Paassen J**, Meek MF, Gramsbergen A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve* 2002, 25:891–897.

**Irisarri C**. Patología traumática de la mano. *Madrid: ENE*, 1992.

**Ishii H**, Umeda F, Kunisaki M, Yamauchi T, Nawata H. Modification of prostaglandin synthesis in washed human platelets and cultured bovine aortic endothelial cells by glycosylated low density lipoprotein. *Diabetes Res*. 1989; 12(4):177-82.

**Ishii S**, Merlino GT, Pastan I. Promoter region of the human Harvey ras proto-oncogene: similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science*. 1985. 20; 230(4732):1378-81.

**Itoh S**, Shinomiya K, Samejima H, Ohta T, Ishizuki M, Ichinose S. Experimental study on nerve regeneration through the basement membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. *Microsurgery*. 1996; 17(10):525-34.

**Jacobs J**. Penetration of systematically injected horseradish peroxidase into ganglio and nerves of autonomic nervous system. *J Neurocytol* 1977; 6: 607-618.

**Jacobs JM**, Mac Farlane RM, Cavanagh JB: Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat. Studied with horseadisch peroxidase. *J Neurol Sci* 1976; 29: 95-114.

**Jessen KR**, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilocic J. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron*. 1994; 12: 509-27.

**Jobe MT**, Martínez SF. Lesiones de los nervios periféricos. *Canale ST (ed) Campbell, Cirugía Ortopédica*, T IV, 10ª ed. Madrid: Elsevier, 2004, p: 3235-41.

**Johnson EO**, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. *Injury*. 2008; 39(3):S37-42.

**Johnson PJ**, Newton P, Hunter DA, Mackinnon SE. Nerve Endoneurial Microstructure Facilitates Uniform Distribution of Regenerative Fibers: A Post Hoc Comparison of Midgraft Nerve Fiber Densities. *J Reconstr Microsurg*. 2011; 27(2):83-90.

**Jonsson S**, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, Kingham PJ. Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56484.

**Jovell AJ**, Navarro-Rubio MD. Evaluation of scientific evidence. *Med Clin (Barc)*. 1995.2; 105(19):740-3.

**Jubran M**, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol*. 2003; 181(2):204-12.

**Jullien J**, Guili V, Reichardt LF, Rudkin BB. Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* 2002. 277:38700–38708.

**Junqueira LCU**, Montes GS, Kristzan RM. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* 1979; 202: 453-460.

**Kamal T**, Hall M, Moharam A, Sharr M, Walczak J. Gluteal pyomyositis in a non-tropical region as a rare cause of sciatic nerve compression: a case report. *J Med Case Rep*. 2008; 12;2:204.

**Kanaya F**, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996; 98(7):1264-71, discussion 1272-4.

**Kanje M**, Skottner A, Lundborg G, Sjöberg J. Does insulin-like growth factor I (IGF-1) trigger the cell body reaction in the rat sciatic nerve? *Brain Res*. 1991.1; 563(1-2):285-7.

**Kanje M**, Skottner A, Sjöberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res*. 1989.8; 486(2):396-8.

**Karacaoglu E**, Yüksel F, Peker F, Güler MM. Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery*. 2001; 21(5):196-201.

**Karlsson M**, Johansson F, Kanje M. Polystyrene replicas of neuronal basal lamina act as excellent guides for regenerating neurites. *Acta Biomater*. 2011; 7(7):2910-8.

**Karnovsky MJ**. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cel Biol* 27:137-138, 1965.

- Kataoka K**, Kanje M, Dahlin LB. Induction of activating transcription factor 3 after different sciatic nerve injuries in adult rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2007; 4:158-66.
- Katsimihias M**, Hutchinson J, Heath P, Smith E, Travlos J. Delayed transient sciatic nerve palsy after total hip arthroplasty. *Journal of Arthroplasty*, 2002; 17(3)379–381.
- Kaupilla T**, Jyväsjärvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P. A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1993; 123: 181-91.
- Kelly AM**, Zacks SI. The fine structure of motor endplate morphogenesis. *J Cell Biol.* 1969; 42(1):154-69.
- Kemp SW**, Syed S, Walsh W, Zochodne DW, Midha R. Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits. *Tissue Eng Part A.*2009; 15:1975-88.
- Kenyon C**, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.*1993.2; 366(6454):461-4.
- Key A**, Retzius G. Studien in der anatomic des nervesystems und des bindegewebes. Stockholm: *Samson and Wallin*, 1876.
- Keynes, RJ**, Hopkins WG, Huang CHL. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle. Guidance by residual muscle fibre basement membrane. *Brain res.* 295: 275-281, 1984.
- Kim DH**, Murovic JA, Tiel R, Kline DG. Management and outcomes in 353 surgically treated sciatic nerve lesions. *J Neurosurg.* 2004; 101:8–17.
- Kisner HJ**. Principles and clinical applications of image analysis. *Clin Lab Med* 8:723-736,1988.
- Klemm H**. Das perineurium als diffusions barrier gegenüber peroxidase beu epi und endoneuraler application. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1970; 108: 431-445.
- Kline DG**, Hackett ER, Davis GD, Myers MB. Microcirculation of peripheral nerves. *J Neurosurg* 1975; 42: 114-121.
- Kouyoumdjian JA**. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve.* 2006; 34(6):785-8.
- Kristensson K**, Olsson Y. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. Differences between mature and immature animals. *Acta Neuropath* 197; 17: 127-138.
- Kun A**, Canclini L, Rosso G, Bresque M, Romeo C, Hanusz A, Cal K, Calliari A, Sotelo Silveira J, Sotelo JR. F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-

Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves. *Cytoskeleton* (Hoboken). 2012; 69(7):486-95.

**Kuroki H**, Ikuta Y. Nerve regeneration of vascularized rat limb allograft and functional recovery of long-term graft survivals treated by short course of FK 506 or cyclosporine. *Transplant Proc.* 1995; 27(1):348-50.

**Kvist M**, Lempleis V, Kanje M, Ekberg H, Corbascio M, Dahlin LB. Immunomodulation by costimulation blockade inhibits rejection of nerve allografts. *J Peripher Nerv Syst.* 2007; 12(2):83-90.

**Lad SP**, Nathan JK, Schubert RD, Boakye M. Trends in median, ulnar, radial, and brachioplexus nerve injuries in the United States. *Neurosurgery.* 2010; 66(5):953-60.

**Lang J.** Über da bindegewebe und die gefässe der nerven. *Z Anat Entw Gesch* 1962; 123: 61-79.

**Lassner F**, Schaller G, Steinhoff G. Cellular mechanism of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation* Vol. 48, N03: 386-392, 1989.

**Lee SK**, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000; 8(4):243-52. Review.

**Leis AA**, Lancon JA, Stokic DS. Retrograde regeneration following neurotmesis of the ulnar nerve. *Muscle Nerve.* 2003; 28(4):512-4.

**Levinthal R**, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J Neurosurg.* 1977; 47(5):744-50.

**Levinthal R**, Brown WJ. Preliminary observation on the immunology of nerve allograft rejection. *Surg Gynecol Obstet.* 1976; 146: 57-58.

**Li W**, Yao Y, Mu D, Zhou M, Tang S. The changes of glutamate receptor and free Ca<sup>2+</sup> in hypoxic-ischemic cerebral injury: experimental study. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1997; 28(4):392-4.

**Licursi de Alcântara AC**, Salgado HC, Sassoli Fazan VP. Morphology and morphometry of the vagus nerve in male and female spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2008.4; 1197:170-80.

**Lieberman AR.** The connective tissue elements of the mammalian nodose ganglion. An electron microscope study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968; 89: 95-111.

**Liles JH**, Flecknell PA. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. *Lab Anim.* 1992; 26(4):241-55.

- Lindwall C**, Kanje M. Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2005; 29(2):269-82.
- Liu W**, Ren Y, Bossert A, Wang X, Dayawansa S, Tong J, He X, Smith DH, Gelbard HA, Huang JH. Allografted neurons used to repair peripheral nerve injury do not elicit overt immunogenicity. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31675.
- Liu XL**, Arai T, Sondell M, Lundborg G, Kanje M, Dahlin LB. Use of chemically extracted muscle grafts to repair extended nerve defects in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2001; 35(4):337-45.
- Llewelyn JG**, Thomas PK. Perineural sodium-potassium ATPase activity in streptozotocin-diabetic rats. *Exp Neurol* 1987; 97: 375-382.
- Low PA**; Lagelund TD, Mc Manis PG. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 1989; 31: 355-438.
- Lund LM**, Machado VM, McQuarrie IG. Increased beta-actin and tubulin polymerization in regrowing axons: relationship to the conditioning lesion effect. *Exp Neurol*. 2002; 178(2):306-12.
- Lundborg G**, Dahlin L, Dohi D, Kanje M, Terada N. A new type of "bioartificial" nerve graft for bridging extended defects in nerves. *J Hand Surg Br*. 1997; 22(3):299-303.
- Lundborg G**, Danielsen N. Injury, degeneration and regeneration. Gelberman RH (ed). Operative nerve repair and reconstruction. *Philadelphia Lippincott Comp*, 1991, 109-31.
- Lundborg G**, Hansson HA. Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue. *J Hand Surg Am*. 1980; 5(1):35-8.
- Lundborg G**, Hansson HA. Regeneration of peripheral nerve through a performed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibres and perineurium. *Brain Res* 1979; 178:573-6.
- Lundborg G**, Rosén B, Dahlin L, Holmberg J, Rosén I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J Hand Surg Br*. 2004; 29(2):100-7.
- Lundborg G**, Rosén B, Dahlin L, Nielsen N, Holmberg J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early result from a prospective, randomized clinical study. *J Hand Surg [Am]* 1997; 22-A: 99-106.
- Lundborg G**, Rosen B. Hand function after nerve repair. *Acta Physiol (Oxf)* 2007, 189:207–217.

**Lundborg G, Rosen B.** Sensory relearning after nerve repair. *Lancet* 2001, 358:809–810.

**Lundborg G.** A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg. American Volume* 2000; 25(3):391 - 414.

**Lundborg G.** Enhancing posttraumatic nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2002; 7(3):139-40.

**Lundborg G.** Ischemic nerve injury. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1970; 6: 79-90.

**Lundborg G.** Structure and function of intraneural microvessels as related to trauma, edema formation and nerve function. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57: 938-948.

**Luyet C, Constantinescu M, Waltenspül M, Luginbühl M, Vögelin E.** Transition from nerve stimulator to sonographically guided axillary brachial plexus anesthesia in hand surgery: block quality and patient satisfaction during the transition period. *J Ultrasound Med.* 2013; 32(5):779-86

**Ma W, Eisenach JC.** Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 2003; 121(3):691-704.

**MacDonald NE, Marcuse EK.** Neurologic injury after vaccination: buttocks as injection site. *CMAJ.* 1994.1; 150(3):326.

**Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP.** Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve.* 1991; 14(11):1116-22.

**Mackinnon SE, Dellon AL.** Surgery of peripheral nerves. *New York: Thieme Medical Publishers,* 1988.

**Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP.** Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plastic and reconstructive surgery.* 2001; 107(6):1419–1429.

**Mackinnon SE, Hudson AR, Bain MD.** The peripheral nerve allograft: An assesment of regeneration in the immunosuppressed host. *PlasE Reconstr Sur.* March: 436-444, 1987.

**Mackinnon SE, Hudson AR.** Cliical application of peripheral nerve transpíantation. *Annual Meeting of tite American Association of Plastic Surgeons, S. Antonio, Texas.* April, 1991.

- Mackinnon SE.** Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.* 1989; 16(3):587-603.
- Mafi P, Hindocha S, Dhital M, Saleh M.** Advances of peripheral nerve repair techniques to improve hand function: a systematic review of literature. *Open Orthop J.* 2012; 6:60-8.
- Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE.** Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003; 30(2):109-26. Review.
- Malchow RJ, Black IH.** The evolution of pain management in the critically ill trauma patient: emerging concepts from the global war on terrorism. *Critical Care Medicine.* 2008; 36(7)346–357.
- Marcarian HQ, Smith RD.** A quantitative study on the vasa nervorum in the ulnar nerve cats. *Anat rec* 1968; 161: 105-110.
- Maripuu A, Björkman A, Björkman-Burtscher IM, Mannfolk P, Andersson G, Dahlin LB.** Reconstruction of sciatic nerve after traumatic injury in humans - factors influencing outcome as related to neurobiological knowledge from animal research. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2012; 10;7(1):7.
- Mårtensson L, Gustavsson P, Dahlin LB, Kanje M.** Activation of extracellular-signal-regulated kinase-1/2 precedes and is required for injury-induced Schwann cell proliferation. *Neuroreport.* 2007. 2; 18: 957-61.
- Martín Ferrero MA, Agudo Bernal J, Vaquero Puerta C, García Cantera M, Sánchez Martín MM.** Autoinjerto de músculo estriado desnaturalizado en las pérdidas de sustancia del nervio periférico. Estudio experimental. *Revista Española de Cirugía Ortopedia y Traumatología,* 40: 77-83, 1996.
- Matsuyama T, Mackay M, Midha R.** Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2000; 40(4):187-99. Review.
- Matthews GG.** Fisiología Celular del nervio y el músculo. *Internamericana McGraw-Hill,* 1989.
- Mc Carroll HR.** Surgical repair of peripheral nerve injuries. *Lamb D (ed). The paralysed hand.* Edinburg: Churchill Livingstone, 1987, 52-75.
- McKay SE, Kaczmarek LK.** Act locally: new ways of regulating voltage-gated ion channels. *Mol Interv.* 2002; 2(4):215-8.
- McManamny DS.** Comparison of microscope and loupe magnification: assistance for the repair of median and ulnar nerves. *Br J Plast Surg.* 1983; 36(3):367-72.
- Meek MF, Coert JH.** Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2002; 18(2):97-109. Review.

- Meek MF**, Varejão AS, Geuna S. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. *Tissue Eng.* 2004; 10:1027-36.
- Mendonça AC**, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Meth* 2003; 129:183–90.
- Meng X**, Lu L, Wang H, Liu B. Differentiation between the motor and sensory fascicles of the peripheral nerves from adult rats using annexin V-CdTe-conjugated polymer. *Neurol India.* 2011; 59(3):333-8.
- Merle M**, Dautel G, Loda G. Mano traumática, París, *Masson*, 1993.
- Merzenich MM**, Jenkins WM. Reorganization of cortical representations of the hand following alterations of skin inputs induced by nerve injury, skin islands transfers, and experience. *J Hand Ther* 1993; 6:89-104.
- Michalski B**, Bain JR, Fahnstock M. Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve. *J Neurochem* 2008; 105:1244 –1252.
- Midha R**, Evans PJ, Mackinnon SE, Wade JA. Temporary immunosuppression for peripheral nerve allografts. *Transplant Proc.* 1993; 25:532-6.
- Midha R**, Mackinnon SE, Becker LE. The fate of Schwann cells in peripheral nerve allografts. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994; 53(3):316-22.
- Midha R**. Emerging techniques for nerve repair: nerve transfers and nerve guidance tubes. *Clin Neurosurg.* 2006; 53:185-90.
- Midrio M**. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol* 2006; 98: 1–21.
- Millesi H**, Meissi G, Berger A. The interfascicular nerve grafting of the median and ulnar nerve. *J Bone Joint Surg (Am)* 1972; 54-A:727-50.
- Millesi H.**, Schmidhammer R. End-to-side coaptation – controversial research issue or important tool in human patients. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:103-6.
- Mishra P**, Stringer MD. Sciatic nerve injury from intramuscular injection: a persistent and global problem. *Int J Clin Pract.* 2010; 64(11):1573-9.
- Mohammadi R**, Esmaeil-Sani Z, Amini K. Effect of local administration of insulin-like growth factor I combined with inside-out artery graft on peripheral nerve regeneration. *Injury.* 2013; S0020-1383(13)00191-5.
- Moimas S**, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, Papa G, Giacca M, Geuna S, Perroteau I, Arnež ZM, Raimondo S. Effect of vascular endothelial growth

factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther.* 2013; 30:1-8.

**Monte-Raso VV**, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Meth* 2005; 142:185–92.

**Monte-Raso VV**, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods.* 2008. 30; 170(2):255-61.

**Moore AM**, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve.* 2011; 44(2):221-34.

**Moradzadeh A**, Brenner MJ, Whitlock EL, Tong AY, Luciano JP, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Bipolar electrocautery: A rodent model of Sunderland third-degree nerve injury. *Arch Facial Plast Surg.* 2010; 12(1):40-7.

**Moragas A.** Las técnicas de análisis y su aplicación a Anatomía Patológica. *Med Clin* 1984; 83(9):373-377.

**Myckatyn TM**, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res.* 2004; 26(2):124–138.

**Narakas A.** The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am* 1988; 19:187-99.

**Nathan CF.** Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-26.

**National Institute of Health, Office of Animal Care and Use.** Guidelines on Use of Analgesic Drugs. [http://oacu.od.nih.gov/ARAC/painresprecall\\_table2.htm](http://oacu.od.nih.gov/ARAC/painresprecall_table2.htm).

**Ni HC**, Tseng TC, Chen JR, Hsu SH, Chiu IM. Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap. *Biofabrication.* 2013.23; 5(3):035010.

**Nilsson A**, Dahlin L, Lundborg G, Kanje M. Graft repair of a peripheral nerve without the sacrifice of a healthy donor nerve by the use of acutely dissociated autologous Schwann cells. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2005; 39:1–6.

**Noble J**, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1998; 45(1):116-22.

**Norris RW**, Glasby MA, Gattuso JM, Bowden RE. Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique. *J Bone Joint Surg (Br)* 1998; 70-B:530-3.

- O'Daly** JA, Imaneda T. Electron microscopy study of Wallerian degeneration in cutaneous nerves caused by mechanical injury. *Lab Invest* 1967; 17: 744-771.
- Obremski** VJ, Bunge MB. Addition of purified basal lamina molecules enables Schwann cell ensheathment of sympathetic neurites in culture. *Dev Biol.* 1995; 168: 124-37.
- Obremski** VJ, Wood PM, Bunge MB. Fibroblasts promote Schwann cell basal lamina deposition and elongation in the absence of neurons in culture. *Dev Biol.* 1993; 160: 119-34.
- Ochoa** J. The sural nerve of the human fetus electron microscope observations and counts of axon. *J Anat* 1971; 108: 231-245.
- Ohana** M, Quijano-Roy S, Colas F, Lebreton C, Vallée C, Carlier RY. Axonotmesis of the sciatic nerve. *Diagn Interv Imaging.* 2012; 93(5):398-400.
- Oldfors** A. Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropath* 1980; 49: 43-49.
- Oliveira** EF, Mazzer N, Barbieri CH, Del Bel EA. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect: an experimental study using the sciatic nerve of rats as model. *J Neurosci Meth* 2003; 133:19-26.
- Oliveira** EF, Mazzer N, Barbieri CH, DelBel EA. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect. An experimental study using the sciatic nerve of rats as model. *J Neurosci Methods.* 2004.15; 133(1-2):19-26.
- Oliveira** EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17:69-75.
- Ollsson** Y, Kristensson K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. *Acta Neuropath* 1973; 23: 105-111.
- Olsson** Y. Mast cells in human peripheral nerve. *Acta Neural Scand* 1971; 47: 357-368.
- Omer** GE Jr, Graham WP 3rd. Editorial: Development of certification in hand surgery. 1989. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 449:6-10.
- Osawa** T, Ide C. Changes in thickness of collagen fibrils in the endo and epineurium of mouse sciatic during development. *Acta Anat* 1986; 125: 245-251.

- Paetau**, Mellstrom K, Vaheri A, Haltia M.. Distribution of a major connective tissue protein fibronectin, in normal and neoplastic human nerve tissue. *Acta Neuro pathol* 1980; 51: 47-51.
- Palazzi S**, Cáceres JP, Palazzi JL. Nuestra experiencia en la neurotización cúbito-bicipital (Operación de Oberlin). *Rev Iber Cir Mano* 2000; 27:29-36.
- Papalia I**, Tos P, Stagno d'Alcontres F, Battiston B, Geuna S. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. *J Neurosci Methods*. 2003.15; 127(1):43-7.
- Pean JM**, Menei P, Morel O, Montero-Menei CN, Benoit JP. Intraseptal implantation of NGF-releasing microspheres promote the survival of axotomized cholinergic neurons. *Biomaterials* 2000; 21:2097–2101.
- Pellegrino RG**, Spencer PS. Schwann cell mitosis in response to regenerating peripheral axons in vivo. *Brain Res*. 1985.19; 341: 16-25.
- Pereira JH**, Cowley SA, Gschmeissner SE, Bowden RE, Turk JL. Denatured muscle grafts for nerve repair. An experimental model of nerve damage in leprosy. *J Bone Joint Surg Br*. 1990; 72(5):874-80.
- Perris R**, Paulsson M, Bronner-Fraser M. Molecular mechanisms of avian neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Dev Biol*. 1989; 136(1):222-38.
- Petrusz P**, Ordronneau P, Fínley JC. Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem J* 12: 333-348, 1980.
- Pfister LA**, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *J Peripher Nerv Syst*. 2007; 12(2):65-82.
- Pindrik J**, Chhabra A, Belzberg AJ. Update on peripheral nerve surgery. *Neurosurgery*. 2013; 60(1):70-7.
- Politis MJ**, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Research* 1982; 253: 1-12.
- Prodanov D**, Feirabend HK. Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol*. 2007.1; 503(1):85-100.
- Rabinovsky ED**, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, DeMayo FJ, et al. Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J*. 2003; 17:53–55.

**Rabinovsky ED.** The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004; 26:204–210.

**Rafijah G,** Bowen AJ, Dolores C, Vitali R, Mozaffar T, Gupta R. The effects of adjuvant fibrin sealant on the surgical repair of segmental nerve defects in an animal model. *J Hand Surg Am.* 2013; 38(5):847-55.

**Ray WZ,** Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2010; 223:77–85.

**Reale E,** Luciano L, Spitznas H. Zonulae occludens of the myelin lamellae in the nerve fiber layer of the retina and in the optic nerve of the rabbit: a demonstration by the freeze-fracture method. *J Neurocytol* 1975; 4: 131-140.

**Reale E,** Luciano L, Spitznas M. Freeze-fracture faces of the perineurial sheath of the rabbit sciatic nerve. *J Neurocytol* 1975; 4: 261-270.

**Rechthand E,** Horney FD. Evidence for passage of cerebrospinal fluid along spinal nerves. *Can Med Ass J* 1968; 98: 71-74.

**Recio-Pinto E,** Rechler MM, Ishii DN. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci.* 1986; 6(5):1211-9.

**Rind HB,** von Bartheld CS. Target-derived cardiotrophin-1 and insulin-like growth factor-I promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 19:58–71.

**Robertson JD.** The unit membrane of cells and mechanism of myelin formation in ultrastructure and metabolism of the nervous system. *Proc Assoc Nerv MenE Dis Baltimore,* Williams & Wilkins, p. 64. 1962.

**Robinson GA,** Madison RD. Motor neurons can preferentially reinnervate cutaneous pathways. *Exp Neurol.* 2004; 190(2):407-13.

**Robinson LR.** Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* 2000; 23(6):863-73. Review.

**Rodríguez J,** Jiménez G, Arias J, Lorente L, Aller MA, Brandau D. Experimental kidney transplant in the rat. *Actas Urol Esp.* 1988; 12(6):591-4.

**Roganovic Z,** Ilic S, Savic M. Radial nerve repair using an autologous denatured muscle graft: comparison with outcomes of nerve graft repair. *Acta Neurochir (Wien).* 2007; 149(10):1033-8.

**Rogers D,** Rowold E, Chang K, Tomlinson M, Sherman WR, Gavin J, Kilo C, Williamson JR. Effect of rapid normalization of plasma glucose levels on microvascular dysfunction and polyol metabolism in diabetic rats. *Diabetes.* 1988; 37: 1689-94.

- Ronkko H**, Goransson H, Siironen P, Taskinen HS, Vuorinen V. The capacity of the distal stump of peripheral nerve to receive growing axons after two and six months denervation. *Scand J Surg* 2011; 100:223–229.
- Rosaria R**, Daniele C, De Franco P, Erra C, Ceruso M, Padua L. Ultrasound study is useful to discriminate between axonotmesis and neurotmesis also in very small nerves: a case of sensory digital ulnar branch study. *Med Ultrason*. 2012; 14(4):352-4.
- Rosberg HE**, Carlsson KS, Cederlund RI, Ramel E, Dahlin LB. Costs and outcome for serious hand and arm injuries during the first year after trauma - a prospective study. *BMC Public Health*. 2013,24; 13:501.
- Rosberg HE**, Carlsson KS, Dahlin LB. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*;2005b, 39:360–369.
- Rosberg HE**, Carlsson KS, Hojgard S, Lindgren B, Lundborg G, Dahlin LB. Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm—analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. *J Hand Surg Br* 2005a; 30:35–39.
- Rosberg HE**, Dahlin LB: Epidemiology of hand injuries in a middle-sized city in southern Sweden: a retrospective comparison of 1989 and 1997. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2004; 38:347–355.
- Rosen B**, Lundborg G. The long term recovery curve in adults after median or ulnar nerve repair: a reference interval. *J Hand Surg*. 2001; 26B: 196 - 200.
- Rosen B**, Lundborg G. Training with a mirror in rehabilitation of the hand. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005; 39,(2)104-108(5).
- Ruijs AC**, Jaquet JB, Kalmijn S, Giele H, Hovius SE. Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 116(2):484-94.
- Rustemeyer J**, van de Wal R, Keipert C, Dicke U. Administration of low-dose FK 506 accelerates histomorphometric regeneration and functional outcomes after allograft nerve repair in a rat model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010; 38(2):134-40.
- Sackett DL**, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ*. 1996.13; 312(7023):71-2.
- Saha S**, Bindman AB. The mirage of available health care for the uninsured. *J Gen Intern Med*. 2001; 16(10):714-6.

**Saheb-Al-Zamani M**, Yan Y, Farber SJ, Hunter DA, Newton P, Wood MD, Stewart SA, Johnson PJ, Mackinnon SE. Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence. *Exp Neurol*. 2013.3; 247C:165-177.

**Saito A**, Zacks SI. Ultrastructure of Schwann and perineural sheath at the mouse neuromuscular junction. *Anat Rec* 1969; 164: 379-382.

**Saito H**, Dahlin LB. Expression of ATF3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci*. 2008; 18;9:88.

**Salonen V**. Connective tissue reactions to peripheral nerve injury. *Ann Univ Turku* 1987; 28: 1-8.

**Sánchez-Martín MM**. Traumatología y Ortopedia. *Madrid: Ed Cea*, 1987.

**Sandrock AW Jr**, Matthew WD. Identification of a peripheral nerve neurite growth promoting activity by development and use of an in vitro bioassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 6934-8.

**Santos AP**, Suaid CA, Fazan VP, Barreira AA. Microscopic anatomy of brachial plexus branches in Wistar rats. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007; 290(5):477-85.

**Sarikcioglu L**, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2009; 68(1):1-7.

**Saxena P**, Cutler L, Feldberg L: Assessment of the severity of hand injuries using "hand injury severity score", and its correlation with the functional outcome. *Injury* 2004, 35:511–516.

**Scherman P**, Lundborg G, Kanje M, Dahlin LB. Neural regeneration along longitudinal polyglactin sutures across short and extended defects in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*. 2001; 95(2):316-23.

**Schiaveto de Souza A**, da Silva CA, Del Bel EA. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma* 2004; 21:627–635.

**Schiff R**, Rosebluth J. Ultrastructural localization of laminin in rat sensory ganglia. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 1691-1695.

**Schlosshauer B**, Dreesmann L, Schaller HE, Sinis N. Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurgery*. 2006; 59(4):740-7.

**Schmalbruch H**. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*. 1986; 215(1):71-81.

**Schmidhammer R**, Zandieh S, Hopf R, Mizner I, Pelinka LE, Kroepfl A, Redl H. Alleviated tension at the repair site enhances functional regeneration: the effect of full

range of motion mobilization on the regeneration of peripheral nerves--histologic, electrophysiologic, and functional results in a rat model. *J Trauma*. 2004; 56(3):571-84.

**Schmitz C**, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 2005; 130(4):813-31.

**Schoeffl H**, Lazzeri D, Schnelzer R, Froschauer SM, Huemer GM. Optical magnification should be mandatory for microsurgery: scientific basis and clinical data contributing to quality assurance. *Arch Plast Surg*. 2013; 40(2):104-8.

**Schubert T**, Friede RL. The role of the endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40: 134-154.

**Seckel BR**, Ryan SE, Simons JE, Gagne RG, Watkins E. Vascularized versus nonvascularized nerve grafts: An experimental structural comparison. *PlasE Reconstr Surg* 78: 211-220, 1986.

**Seddon HJ**. Surgical disorders of the peripheral nerves. *Edinburg: Churchill Livingstone*, 1972.

**Selander D**, Marisson LG, Karlsson L, Svanvil J. Adrenergic vasoconstriction in peripheral nerves of the rabbit. *Anesthesiology* 1985; 62: 6-10.

**Seneviratne KN**, Peiris OA. The role of diffusion barriers in determining the excitability of peripheral nerve. *Acta Neuropath* 1985; 68: 259-262.

**Shanklín WM**, Azzam NA. Histological and histochemical studies on the incisures of Schmidt-Lanterman. *J Comp Neurol* 2006: 113-119, 1989.

**Shanta TR**, Bourne GH. The perineural epithelium. *A new concept*. Bourne GH, editor *Structure and function of nervous tissue (vol 1)*, New York: Academic Press, 1968; 379-459.

**Shantaveerappa T**, Bourne GH. Enzyme histochemical properties of the perineural epithelium following nerve transection. *Anat Rec* 1964; 150: 35-47.

**Shantaveerappa T**, Bourne GH. Perineural epithelium. A new concept of its role in the integrity of the peripheral nervous system. *Science* 1966; 154: 1464-1467.

**Shantaveerappa TR**, Bourne GH. The perineural epithelium: nature and significance. *Nature* 1963; 199: 577- 579.

**Shantaveerappa TR**, Bourne GH. The perineural epithelium; a metabolically active continuous protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. *J Anat* 1962; 96: 527-537.

**Shen CC**, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. Low-Level Laser-Accelerated Peripheral Nerve Regeneration within a Reinforced Nerve Conduit across a Large Gap

of the Transected Sciatic Nerve in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:175629.

**Shield** LK, King HM, Thomas PK. A morphologic study of human fetal sural nerve. *Acta Neuropath* 1986; 70: 60-70.

**Siemionov** M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:141-72.

**Siemionow** M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004; 24(6):468-75. Review.

**Siemionow** M, Ozer K. Advances in composite tissue allograft transplantation as related to the hand and upper extremity. *J Hand Surg Am.* 2002; 27(4):565-80. Review.

**Siemionow** M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res.* 2004; 26(2):218-25.

**Silva** DN, Coelho J, Frazílio FO, Odashiro AN, Carvalho PT, Pontes ER, Vargas AF, Rosseto M, Silva AB. End-to-side nerve repair using fibrin glue in rats. *Acta Cir Bras.* 2010; 25(2):158-62.

**Silva** DN, Silva AC, Aydos RD, Viterbo F, Pontes ER, Odashiro DN, Castro RJ, Augusto DG. Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats. *Acta Cir Bras.* 2012; 27(4):325-32.

**Sjöberg** J, Kanje M, Edström A. Influence of non-neuronal cells on regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1988.21; 453(1-2):221-6.

**Sjöberg** J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989.17; 485(1):102-8.

**Sketelj** J, Bresjanac M, Popović M. Rapid growth of regenerating axons across the segments of sciatic nerve devoid of Schwann cells. *J Neurosci Res.* 1989; 24(2):153-62.

**Soderfeldt** B, Olsson Y, Kristensson K. The peroneurium as a diffusion barrier to protein tracers in human peripheral nerve. *Acta Neuropath* 1973; 25: 120-126.

**Speth** RC, Smith MS, Brogan RS. Regarding the inadvisability of administering postoperative analgesics in the drinking water of rats (*Rattus norvegicus*). *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2001; 40(6):15-7.

**Spinner** RJ, Kline DG. Surgery for peripheral nerve and brachial plexus injuries or other nerve lesions. *Muscle Nerve.* 2000; 23(5):680-95.

**Spitzer** RL, Forman JB, Nee J. DSM-III field trials: I. Initial interrater diagnostic reliability. *Am J Psychiatry.* 1979; 136(6):815-7.

**Sternberger LA**, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970; 18(5):315-33.

**Stewart JD**. Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve.* 2003; 28(5):525-41. Review.

**Sugita N**, Ishida O, Ikuta Y, Takata H, Kajihara H, Tomita Y, Ochi M. Interposed autologous nerve segment stimulates nerve regeneration in peripheral nerve allografts in a rat model. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(2):167-74.

**Sunderland S**, Bedbrook GM. The cross-sectional area for peripheral nerve trunks occupied by the fibres representing individual muscular and cutaneous branches. *Brain* 1949; 72: 613-624.

**Sunderland S**, Bradley KC. Endoneurial tube shrinkage in the distal segment of a severe nerve. *J Comp Neurol* 1950; 93: 411-424.

**Sunderland S**, Bradley KC. The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibres. *Brain* 1949; 72: 428-449.

**Sunderland S**, Bradley KC. The perineurium of the peripheral nerves. *Anat Rec* 1952; 113: 125-142.

**Sunderland S**, Marshall RD, Swaney WE. The intraneural topography of the circumflex musculocutaneous and obturator nerves. *Brain* 1959; 82: 116-129.

**Sunderland S**, Ray LJ. The intraneural topography of the sciatic nerve and its popliteal divisions in man. *Brain* 1948; 71: 242-258.

**Sunderland S**. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951; 74:491-516.

**Sunderland S**. Blood supply of peripheral nerves. Practical considerations. *Arch Neurol Psychiat* 1945; 54: 280-282.

**Sunderland S**. Blood supply of the nerves of the sciatic nerve and its popliteal divisions in man. *Arch Neurol Psychiat* 1945; 54: 283-289.

**Sunderland S**. Blood supply of the nerves of the upper limb in man. *Arch Neurol Psychiat* 1945; 53: 91-115.

**Sunderland S**. The adipose tissue of peripheral nerves. *Brain* 1945; 68: 118-122.

**Sunderland S**. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990; 13(9):771-84.

**Sunderland S**. The connective tissues of peripheral nerves. *Brain* 1965; 88: 841-854.

**Sunderland S.** The eddect of rupture of the perineurium on the contained nerve fibres. *Brain* 1946; 69: 149-152.

**Sunderland S.** The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain* 1945; 68: 243-255.

**Sutherland CJ, Miller DH, Owen JH.** Use of spontaneous electromyography during revision and complex total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1996; 11(2):206-9.

**Tang JB.** Clinical use of autogenous nerve slices in nerve conduits for nerve repair. *J Hand Surg Am.* 2008; 33(8):1442.

**Telleria JJ, Safran MR, Harris AH, Gardi JN, Glick JM.** Risk of sciatic nerve traction injury during hip arthroscopy—is it the amount or duration? An intraoperative nerve monitoring study. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 21;94(22):2025-32.

**Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M.** Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg.* 2002; 49(4):397-403.

**Thomas PK, Jones DG.** The cellular response to nerve injury. Regeneration of the perineurium after nerve section. *J ANat* 1967; 101: 45-55.

**Thomas PK.** The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. *J Anat* 1963; 97: 34-44.

**Thomas PK.** The deposition of collagen in relation to Schwann cell basement membrane during peripheral nerve regeneration. *J Cell Biol* 23: 275-382, 1964.

**Timpl R, Brown JC.** The laminins. *Matrix Biol.* 1994; 14: 275-81. Review.

**Tomaselli KJ, Reichardt LF.** Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. *J Neurosci Res.* 1988; 21(2-4):275-85.

**Topuz AK, Eroğlu A, Atabey C, Cetinkal A.** Surgical treatment outcomes in peripheral nerve lesions due to gunshot injuries: assessment of 28 cases. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013; 19(3):235-40.

**Topuz K, Kutlay M, Simşek H, Atabey C, Demircan M, Senol Güney M.** Early surgical treatment protocol for sciatic nerve injury due to injection--a retrospective study. *Br J Neurosurg.* 2011; 25(4):509-15.

**Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneux J, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG.** Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I-experimental models. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:47-79.

**Toyota B**, Carbonetto S, David S. A dual laminin/collagen receptor acts in peripheral nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 1319-22.

**Tria MA**, Fusco M, Vantini G, Mariot R. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol* 127:178–183.

**Trumble W**, Wang H, Chadaram SR, Norton AS, Lewis R, Boyum J, Sanes JR, Laskowski MB. Positionally selective growth of embryonic spinal cord neurites on muscle membranes. *J Neurosci*. 1999.15; 19(12):4984-93.

**Tsujino H**, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci*. 2000; 15:170-82.

**Tung TH**, Mackinnon SE. Nerve transfers: indications, techniques, and outcomes. *J Hand Surg (Am)* 2010; 35:332–341.

**Urbanchek MG**, Wei B, Egeland BM, Abidian MR, Kipke DR, Cederna PS.

Microscale electrode implantation during nerve repair: effects on nerve morphology, electromyography, and recovery of muscle contractile function. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 128(4):270e-278e.

**Usbiki T**, Ide C. Three-dimensional architecture of the endoneurium with special reference to the collagen fibril arrangement in relation to nerve fibers. *Acta Histol Jap* 1986; 49: 553-563.

**Valentine HL**, Does MD, Marshall V, Tonkin EG, Valentine WM. Multicomponent T2 analysis of dithiocarbamate-mediated peripheral nerve demyelination. *Neurotoxicology*. 2007; 28(3):645-54.

**Valero-Cabre A**, Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma* 2002, 19:1475–1485.

**Van Neerven SG**, Bozkurt A, O'Dey DM, Scheffel J, Boecker AH, Stromps JP, Dunda S, Brook GA, Pallua N. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2012; 30;7(1):5.

**Vaquero C**. Manual de experimentación animal. *Universidad de Valladolid*, p:131-176, 1993.

- Vaquero J**, Arias A, Oya S, Martinez R, Zurita M. Effect of fibrin glue on postlaminectomy scar formation. *Acta Neurochir (Wien)*. 1993; 120(3-4):159-63.
- Varejão ASP**, Cabrita AM, Geuna S, Pinto PM, Filipi VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol* 2003; 183:695–9.
- Varejão ASP**, Meek MF, Ferreira A, Patrício A, Cabrita A. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 108 (2001) 1-9.
- Varejão ASP**, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004; 26: 186-94.
- Vayvada H**, Demirdöver C, Menderes A, Yilmaz M, Karaca C. The functional results of acute nerve grafting in traumatic sciatic nerve injuries. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg (Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery)* 2013; 19 (2):109-114.
- Vleggeert-Lankamp CL**. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2007; 107(6):1168-89. Review.
- Vo TN**, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 64(12):1292-309.
- Waggener JD**, Beggs J. The membranous covering of neural tissues: an electron microscopy study. *J Neuropath Exp Neurol* 1967; 26: 412-426.
- Waller AV**. Experiments on the section of the glosopharyngeal and hypogloseal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Pitil Trans R Soc* 423-429, 1850.
- Walton RL**, Brown RE, Matory WE Jr, Borah GL, Dolph JL. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 1989; 84(6):944-9.
- Wang H**, Ma F, Wang F, Liu D, Li X, Du S. Identification of motor and sensory fascicles in peripheral nerve trunk using immunohistochemistry and micro-Raman spectroscopy. *J Trauma*. 2011; 71(5):1246-51.
- Wang JQ**, Mao L, Han JS. Comparison of the antinociceptive effects induced by electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation in the rat. *Int J Neurosci*. 1992; 65: 117-29.

**Wang LC**, Dani J, Godement P, Marcus RC, Mason CA. Crossed and uncrossed retinal axons respond differently to cells of the optic chiasm midline in vitro. *Neuron*. 1995; 15(6):1349-64.

**Wang W**, Tan W, Luo D, Lin J, Yu Y, Wang Q, Zhao W, Wu B, Chen J, He J. Acute pressure on the sciatic nerve results in rapid inhibition of the wide dynamic range neuronal response. *BMC Neurosci*. 2012; 4;13:147.

**Watanabe IS**, Dias FJ, Mardegan Issa JP, dos Santos Haemmerle CA, Cury DP, Takada SH, Sosthenes MC, Pereira da Silva MC, Campos LM, Nogueira MI, Iyomasa MM. Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy (Oxf)*. 2013; 62(2):259-70.

**Weiss L**. Histología. Ed. Ateneo. 40 Ed.: 297-300, 1982.

**Welch JA**, Kraus KH, Wells MR, Blunt DG, Weremowitz. Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats. *J Am J Vet Res*. 1997; 58(9):1033-7.

**West CA**, Hart AM, Terenghi G, Wiberg M. Analysis of the dose-response of N-acetylcysteine in the prevention of sensory neuronal loss after peripheral nerve injury. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100:29-31.

**Whitlock EL**, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, Moore AM, Tong AY, Mackinnon SE, Borschel GH. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*. 2009; 39(6):787-99.

**Whitworth IH**, Doré C, Hall S, Green CJ, Terenghi G. Different muscle graft denaturing methods and their use for nerve repair. *Br J Plast Surg*. 1995; 48(7):492-9.

**Whitworth IH**, Doré CJ, Green CJ, Terenghi G. Increased axonal regeneration over long nerve gaps using autologous nerve-muscle sandwich grafts. *Microsurgery*. 1995; 16(12):772-8.

**Wiberg M**, Terenghi G. Will it be possible to produce peripheral nerves? *Surg Technol Int* 2003; 11: 303–310.

**Williams AM**, Davids K, Burwitz L, Williams JG. Cognitive knowledge and soccer performance. *Perceptual and Motor Skills* 1993; 76: 579-593.

**Windebank AJ**, Blexrud MD. Characteristics of neurite outgrowth from rat spinal ganglia: effects of serum and segmental level. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1986; 45(6):683-91.

**Witzel C**, Rohde C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 2005; 485:183–190.

**Wright II PE, Jobe MT.** Peripheral nerve injuries. *Creshaw AH (ed), Campbell Operative Orthopaedics. Vol 4. St. Louis: Mosby year Book, 1992, 2215-86.*

**Wu JJ, Lollo L, Grabinsky A.** Regional anesthesia in trauma medicine. *Anesthesiol Res Pract.* 2011; 2011:713281.

**Wu T.** Plastic surgery made easy - simple techniques for closing skin defects and improving cosmetic results. *Aust Fam Physician.* 2006; 35(7):492-6.

**Xu WD, Xu JG, Gu YD.** Comparative clinic study on vascularized and nonvascularized full-length phrenic nerve transfer. *Microsurgery.* 2005; 25(1):16-20.

**Xu X, Yee WC, Hwang PY, Yu H, Wan AC, Gao S, Boon KL, Mao HQ, Leong KW, Wang S.** Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials* 2003; 24:2405–2412.

**Yang YC, Shen CC, Cheng HC, Liu BS.** Sciatic nerve repair by reinforced nerve conduits made of gelatin-tricalcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 96(2):288-300.

**Yao D, Li M, Shen D, Ding F, Lu S, Zhao Q, Gu X.** Expression changes and bioinformatic analysis of Wallerian degeneration after sciatic nerve injury in rat. *Neurosci Bull.* 2013; 29(3):321-32.

**Yavuzer G, Selles R, Sezer N, Sütbeyaz S, Bussmann JB, Köseoğlu F, Atay MB, Stam HJ.** Mirror therapy improves hand function in subacute stroke: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008; 89(3):393-8.

**Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Li Z, Zhao B, Sui X, Wang Y, Xu W, Lu S.** Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery.* 2009; 29(4):330-6.

**Yuan Q, Wu W, So KF, Cheung AL, Pevette DM, Oppenheim RW.** Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats. *Neuroreport.* 2000; 11:2237–2241.

**Yudin D, Hanz S, Yoo S, Iavnilovitch E, Willis D, Gradus T, Vuppalachchi D, Segal-Ruder Y, Ben-Yaakov K, Hieda M, Yoneda Y, Twiss JL, Fainzilber M.** Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron.* 2008,31; 59(2):241-52.

**Zachary I.** Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signaling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005; 14: 207–221.

**Zeger M,** Popken G, Zhang J, Xuan S, Lu QR, Schwab MH, Nave KA, Rowitch D, D'Ercole AJ, Ye P. Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*. 2007; 55(4):400-11.

**Zele T,** Sketelj J, Bajrovic FF. Efficacy of fluorescent tracers in retrograde labeling of cutaneous afferent neurons in the rat. *J Neurosci Methods* 2010, 191:208–214.

**Zhu G,** Mallery SR, Schwendeman SP (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide). *Nat Biotechnol* 2000.18:52–57.



# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. 1 Anatomía del nervio ciático en el hombre. ....	54
Figura 1. 2 Disección del nervio ciático de la rata. ....	56
Figura 1. 3 Anatomía del nervio ciático en la rata.....	56
Figura 1. 4 Morfología del nervio periférico. ....	62
Figura 1. 5 Cubiertas de los nervios periféricos. ....	67
Figura 1. 6 Histología de la degeneración Walleriana.....	82
Figura 1. 7 Histología del proceso de regeneración del nervio periférico.....	84
Figura 1. 8 El muñón distal. ....	86
Figura 1. 9 La lámina basal. ....	88
Figura 1. 10 La activación del factor de transcripción 3 ATF3.....	90
Figura 1. 11 Transporte axonal retrógrado. ....	91
Figura 1. 12 Lesión (neuroma) en continuidad.....	97
Figura 1. 13 Lesión por compresión. ....	106
Figura 1. 14 Lesión térmica. ....	110
Figura 1. 15 Neuroapraxia. ....	118
Figura 1. 16 Neurotmesis. ....	119
Figura 1. 17 Sutura término-terminal. ....	129
Figura 1. 18 Sutura epineural. ....	130
Figura 1. 19 Sutura perineural. ....	131
Figura 1. 20 Injerto nervioso autólogo. ....	133
Figura 1. 21 Algoritmo de diagnóstico y tratamiento.....	138
Figura 1. 22 Rehabilitación postoperatoria.....	140
Figura 1. 23 Músculo esquelético desnaturalizado para reparar defectos nerviosos....	145
Figura 1. 24 Procedimiento de congelación-descongelación del injerto muscular .....	148

Figura 1. 25 Paso de axones a través del injerto de músculo desnaturalizado. ....	150
Figura 1. 26 La reparación nerviosa con injertos de vena rellena de músculo.....	152
Figura 1. 27 Comparación de la equivalencia de los injertos musculares y nerviosos..	154
Figura 1. 28 Injertos tipo "sándwich".....	155
Figura 1. 29 Microesferas poliméricas para su el NGF.....	158

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Figura 2. 1 Permiso para la adquisición de animales de experimentación.....	212
Figura 2. 2 Certificado de la acreditación del veterinario de la Universidad de Valladolid. ....	213
Figura 2. 3 Diseño del defecto nervioso.....	215
Figura 2. 4 Obtención de injertos musculares. ....	216
Figura 2. 5 Método biológico para la descelularización.....	217
Figura 2. 6 Colocación del animal.....	219
Figura 2. 7 Abordaje quirúrgico.....	220
Figura 2. 8 Procedimiento quirúrgico.....	221
Figura 2. 9 Sutura del injerto.....	222
Figura 2. 10 Cuidados postoperatorios.....	223
Figura 2. 11 Marcaje de las jaulas.....	224
Figura 2. 12 Metodología de la prueba del SFI.....	225
Figura 2. 13 Prueba del Índice Funcional Ciático.....	226
Figura 2. 14 Esquema de las mediciones del SFI.....	227
Figura 2. 15 Estudio de la huella plantar.....	227
Figura 2. 16 "Grasping Test".....	228
Figura 2. 17 Sacrificio de los animales.....	230
Figura 2. 18 Extracción de las piezas.....	232
Figura 2. 19 Tallaje de las piezas.....	233

Figura 2. 20 Esquema de las secciones de cada pieza.....	233
Figura 2. 21 Pieza ya tallada.....	234
Figura 2. 22 Reglas métricas para imágenes microscópicas .....	243
Figura 2. 23 Medición 5x. ....	243
Figura 2. 24 Contaje axonal.....	244

## **RESULTADOS**

Figura 3. 1 Pérdida de animales.....	252
Figura 3. 2 Atrofia muscular grupo control.....	258
Figura 3. 3 Atrofia muscular grupo de casos.....	259
Figura 3. 4 Úlceras de decúbito grupo control. ....	261
Figura 3. 5 Úlceras de decúbito del grupo de casos. ....	262
Figura 3. 6 Representación gráfica de la distribución de las úlceras.....	263
Figura 3. 7 Pérdida digital grupo control.....	264
Figura 3. 8 Pérdida digital grupo de casos.....	265
Figura 3. 9 Representación gráfica de la distribución de las pérdidas digitales.....	266
Figura 3. 10 Deambulaci3n a los 7 días.....	268
Figura 3. 11 Deambulaci3n del grupo control a los 30 días.....	269
Figura 3. 12 Deambulaci3n del grupo de casos a los 30 días.....	270
Figura 3. 13 Deambulaci3n del grupo control a los 60 días.....	271
Figura 3. 14 Deambulaci3n del grupo de casos a los 60 días.....	271
Figura 3. 15 Deambulaci3n del grupo control a los 90 días.....	272
Figura 3. 16 Deambulaci3n del grupo de casos a los 90 días.....	273
Figura 3. 17 Técnica del <i>Grasping Test</i> . ....	274
Figura 3. 18 <i>Grasping Test</i> grupo control. ....	275
Figura 3. 19 <i>Grasping Test</i> grupo de casos. ....	276
Figura 3. 20 SFI a los 30 días postoperatorios. ....	280

Figura 3. 21 SFI a los 60 días postoperatorios. ....	281
Figura 3. 22 SFI a los 90 días postoperatorios. ....	282
Figura 3. 23 Resultado funcional SFI. ....	284
Figura 3. 24 Representación gráfica de la distribución del SFI. ....	285
Figura 3. 25 Disección quirúrgica grupo control. ....	286
Figura 3. 26 Disección quirúrgica grupo de casos. ....	287
Figura 3. 27 Dimensiones de las piezas. ....	288
Figura 3. 28 Color de las piezas. ....	289
Figura 3. 29 Sección 1 (cabo proximal). ....	291
Figura 3. 30 Sección 1 (cabo proximal) 100x. ....	291
Figura 3. 31 Sección 2, 40x. ....	292
Figura 3. 32 Sección 2, cortes longitudinales. ....	293
Figura 3. 33 Sección 3, a pequeños aumentos. ....	294
Figura 3. 34 Neuroma. ....	294
Figura 3. 35 Sección 3, interfase H-E. ....	295
Figura 3. 36 Sección 3, interfase tricrómico de Masson. ....	295
Figura 3. 37 Sección 4, cortes finos del injerto, grupo control. ....	296
Figura 3. 38 Sección 4, cortes finos del injerto, grupo de casos. ....	296
Figura 3. 39 Sección 5, sutura distal, grupo control. ....	298
Figura 3. 40 Sección 5, sutura distal, grupo de casos. ....	299
Figura 3. 41 Sección 6, cortes semifinos, distal al injerto, control. ....	299
Figura 3. 42 Sección 6, cabo distal, grupo de casos. ....	300
Figura 3. 43 Cristales de grasa. ....	301
Figura 3. 44 Sección 7 distal, grupo control. ....	301
Figura 3. 45 Sección 7 distal, grupo de casos. ....	302
Figura 3. 46 Nervio degenerado. ....	303
Figura 3. 47 Hematoxilina-eosina, marcaje nuclear. ....	304

Figura 3. 48 Hematoxilina-eosina, descelularización.....	304
Figura 3. 49 Tricrómico de Masson, las estructuras.....	305
Figura 3. 50 Tricrómico de Masson, degeneración. ....	306
Figura 3. 51 Tricrómico de Masson, ausencia de reinervación.....	306
Figura 3. 52 Tricrómico de Masson, la muerte de la célula de Schwann.....	307
Figura 3. 53 Tricrómico de Masson, fagocitación.....	307
Figura 3. 54 Tricrómico de Masson, el endoneuro.....	308
Figura 3. 55 Tricrómico de Masson, inflamación. ....	308
Figura 3. 56 Tricrómico de Masson, inclusiones nerviosas en el músculo. ....	309
Figura 3. 57 Tricrómico de Masson, corte oblicuo.....	309
Figura 3. 58 Azul de toluidina, las estructuras. ....	310
Figura 3. 59 Azul de toluidina, método de descelularización. ....	311
Figura 3. 60 Azul de toluidina, trayectos nerviosos. ....	311
Figura 3. 61 Azul de toluidina, neovascularización. ....	312
Figura 3. 62 Azul de toluidina, células inflamatorias.....	312
Figura 3. 63 Azul de toluidina, cristales de grasa.....	313
Figura 3. 64 Azul de toluidina, corte longitudinal.....	313
Figura 3. 65 Número de axones grupo control, sección 2. ....	314
Figura 3. 66 Número de axones grupo de casos, sección 2. ....	315
Figura 3. 67 Número de axones grupo control, sección 4. ....	317
Figura 3. 68 Número de axones grupo de casos, sección 4. ....	318
Figura 3. 69 Número de axones grupo control, sección 6. ....	320
Figura 3. 70 Número de axones grupo de casos, sección 6. ....	321
Figura 3. 71 Representación gráfica de la distribución del total de axones. ....	322
Figura 3. 72 Representación gráfica de la distribución de la densidad de axones. ....	323
Figura 3. 73 Representación gráfica de la distribución del espesor de la mielina.....	329
Figura 3. 74 Diámetro del axón y espesor de la mielina. ....	329

Figura 3. 75 Microscopía electrónica: la fibra mielínica.....	330
Figura 3. 76 Microscopía electrónica: la célula de Schwann. ....	330
Figura 3. 77 Microscopía electrónica: <i>cisuras de schmidt lantermann</i> . ....	330
Figura 3. 78 Microscopía electrónica: la fibra amielínica. ....	330
Figura 3. 79 Microscopía electrónica: los fibroblastos endoneurales. ....	330

# ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

Tabla 1. 1 Clasificación de la lesión del nervio periférico .....	121
Tabla 1. 2 Rangos de referencia para IGF-1 (en ng/ml).....	163

## MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 2. 1 Jerarquía de los estudios por el tipo de diseño (USPSTF). .....	188
Tabla 2. 2 Establecimiento de las recomendaciones (USPSTF) .....	188
Tabla 2. 3 Significado de los grados de recomendación. ....	188
Tabla 2. 4 Niveles de evidencia (SIGN).....	189
Tabla 2. 5 Grados de recomendación (SIGN). ....	189
Tabla 2. 6 Niveles de evidencia (CEBM).....	190
Tabla 2. 7 Grados de recomendación (CEBM) .....	191
Tabla 2. 8 Significado de los grados de recomendación. ....	191
Tabla 2. 9 Niveles de calidad de la evidencia científica (AATM). ....	192
Tabla 2. 10 Número de animales utilizados en experimentos por especies. ....	203

## RESULTADOS

Tabla 3. 1 Análisis descriptivo de los resultados de la pérdida de animales.....	253
Tabla 3. 2 Análisis comparativo de los resultados de la pérdida de animales.....	253
Tabla 3. 3 Análisis descriptivo de los resultados de la variable peso grupo control. ...	254
Tabla 3. 4 Análisis descriptivo de los resultados de la variable peso grupo de casos. .	254
Tabla 3. 5 Análisis comparativo de los resultados de la variable peso ambos grupos. .	255
Tabla 3. 6 Análisis descriptivo de los resultados de la variable lateralidad .....	256
Tabla 3. 7 Análisis comparativo de los resultados de la variable lateralidad.....	257
Tabla 3. 8 Análisis comparativo de los resultados de la atrofia del grupo control.....	258

Tabla 3. 9	Análisis descriptivo de los resultados de la atrofia del grupo de casos.....	259
Tabla 3. 10	Análisis comparativo de los resultados de la atrofia en ambos grupos. ....	260
Tabla 3. 11	Análisis descriptivo de los resultados de variable úlceras grupo control. .	261
Tabla 3. 12	Análisis descriptivo de los resultados de variable úlceras grupo de casos.	261
Tabla 3. 13	Análisis comparativo de los resultados de la variable úlceras .....	262
Tabla 3. 14	Análisis descriptivo de las pérdidas digitales del grupo control. ....	264
Tabla 3. 15	Análisis descriptivo de las pérdidas digitales del grupo de casos. ....	265
Tabla 3. 16	Análisis comparativo de la pérdida digital de ambos grupos. ....	266
Tabla 3. 17	Descripción de los resultados del SFI preoperatorio del grupo control. ...	277
Tabla 3. 18	Descripción de los resultados del SFI preoperatorio del grupo control. ...	277
Tabla 3. 19	Descripción de los resultados del SFI a los 7 días postop grupo control. .	278
Tabla 3. 20	Descripción de los resultados del SFI a los 7 días postop grupo de casos.	278
Tabla 3. 21	Descripción de los resultados del SFI a los 30 días postop grupo control.	279
Tabla 3. 22	Descripción de los resultados del SFI a los 30 días postop grupo casos...	279
Tabla 3. 23	Descripción de los resultados del SFI a los 60 días postop grupo control.	280
Tabla 3. 24	Descripción de los resultados del SFI a los 60 días postop grupo casos...	281
Tabla 3. 25	Descripción de los resultados del SFI a los 90 días postop grupo control.	282
Tabla 3. 26	Descripción de los resultados del SFI a los 90 días postop grupo casos...	282
Tabla 3. 27	Análisis comparativo de los resultados del SFI, en el tiempo.....	283
Tabla 3. 28	Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, del corte 2 del grupo control.....	315
Tabla 3. 29	Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 2, del grupo de casos. ....	316
Tabla 3. 30	Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 4, del grupo control. ....	317
Tabla 3. 31	Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 4, del grupo de casos. ....	318
Tabla 3. 32	Análisis descriptivo del tamaño, densidad, número total de axones y axones/campo, de la sección 6, del grupo control. ....	319

Tabla 3. 33 Análisis descriptivo de la sección 6, del grupo de casos.....	320
Tabla 3. 34 Análisis comparativo por secciones de los dos grupos. ....	321
Tabla 3. 35 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 2 grupo control..	325
Tabla 3. 36 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 2 grupo de casos.	325
Tabla 3. 37 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 4 grupo control..	326
Tabla 3. 38 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 4 grupo de casos.	326
Tabla 3. 39 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 6 grupo control..	327
Tabla 3. 40 Análisis descriptivo del espesor de la mielina en cortes 6 grupo de casos.	327
Tabla 3. 41 Análisis comparativo del espesor de la mielina en ambos grupos. ....	328



## ABREVIATURAS Y SIGLAS

€	euro
°C	grados Celsius
AATM	Agència d’Avaluació de Tecnologia Mèdica, Catalunya
ATF3	factor de transcripción 3
ATPasa	enzimas que son capaces de producir la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) en adenosín difosfato (ADP)
BDNF	factor neurotrófico derivado cerebral
BOE	Boletín Oficial del Estado
CEBM	Oxford Centre for Evidence-Based Medicine
CEE	Comisión Económica Europea
CEEBA	Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal
c-erbB	receptor de la tirosina cinasa, participa en el crecimiento celular
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
cm	centímetro
Cmax	concentración máxima de un fármaco en sangre
DAB	diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPX	medio de montaje histológico, resina acrílica con base de xileno
DS	desviación estándar
E	experimental
EDTA	solución de ácido etilendiaminotetraacético
EFNS	European Federation of Neurological Societies
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EMG	electromiografía

EQ-5D	cuestionario europeo estandarizado de calidad de vida
Erk 1 / 2	quinasas reguladoras de señales extracelulares
Fc	fragmento cristalizante del anticuerpo
FDA	U S Food and Drug Administration
FK506	tacrolimus
Fragmento Fab	región del anticuerpo de unión al antígeno
GAP-43	Growth associated protein-43 (fosfoproteína de membrana que participan en el crecimiento axonal)
GDNF	factor neurotrófico derivado de la glía
GH	hormona de crecimiento
GHIS	insensibilidad a la hormona de crecimiento
h	hora
H <sub>0</sub>	hipótesis nula
H <sub>1</sub>	hipótesis alternativa
Hg A1C	hemoglobina glicosilada
IC	intervalo de confianza
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo I
IGF1R	receptor del IGF-1
IGF-BP	proteínas fijadoras del IGF
IgG	inmunoglobulina G
IMC	índice de masa corporal
IT	distancia entre los dedos intermedios de la huella plantar
IV	vía intravenosa
Kg	kilogramo
L	litro
l	litro
L5	quinta vértebra lumbar

M	molar
m/s	metro/segundo
mμ	milimicra
MBE	medicina basada en la evidencia
ME	microscopio electrónico
MELN	dieta animal equilibrada y medida
mg	miligramos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
mm	milímetro
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MSC	células madre mesenquimal
mU	miliunidad
mU/kg	miliunidad/kilo
N	sano
n	tamaño muestral
ng	nanogramo
NGF	factor de crecimiento neurogénico
Nm	nanometro
p/v	porcentaje masa/volumen
PAN	potencial de acción nervioso
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PDGF	factor de crecimiento dependiente de plaquetas
PGA	polímero de ácido poliglicólico
PGA-c	polímero de ácido poliglicólico revestida con colágeno reticulado
PKB	ruta de señalización dependiente de factor de crecimiento
PL	longitud de la huella hasta le dedo más largo
PLCL	polímero de polilactida-caprolactona

PTFE	politetrafluoroetileno expandido
RD	Real Decreto
rhIGF-I	forma recombinante activa humana del IGF-I
S1	primera vértebra sacra
S-100	inmunohistoquímica, marcador para la célula de Schwann
SB-16	sulfobetaína 16
SC	vía subcutánea
SFI	Índice Funcional Ciático
SIGN	Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
Técnica PAF	punción con aguja fina
Técnica PAP	técnica inmunológica peroxidasa-antiperoxidasa
TOF	distancia entre ambas huellas secuenciales
TS	distancia del 1° al 5° dedos de la huella plantar
UE	Unión Europea
USPSTF	U.S. Preventive Services Task Force
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
vs	versus
W	Watio

