



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**



TESIS DOCTORAL:

**EFFECTOS DE LA NEURREGULINA SOBRE LA REGENERACIÓN
NERVIOSA A TRAVÉS DE PRÓTESIS ACELULARES
IMPLANTADAS EN NEURECTOMÍAS**

Presentada por Eugenio Ignacio Alcalde Domínguez para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 21 del R.D. 1393/2007 de 29 de octubre y Art. 4 c) de la Normativa para la defensa de la Tesis Doctoral)

D. Manuel José Gayoso Rodríguez, con D.N.I. nº 51437450-C, profesor del departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, como Director de la Tesis Doctoral titulada EFECTOS DE LA NEURREGULINA SOBRE LA REGENERACIÓN NERVIOSA A TRAVÉS DE PRÓTESIS ACELULARES IMPLANTADAS EN NEURECTOMÍAS presentada por D. Eugenio Ignacio Alcalde Domínguez alumno del programa Neurobiología Básica y Clínica 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

Valladolid, 21 de febrero de 2012

El Director de la Tesis,



Fdo.: Manuel J. Gayoso Rodríguez

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

Impreso 1T

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO U ÓRGANO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO A LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL
(Art. 21 del R.D. 1393/2007 de 29 de octubre y Art. 4 d) de la Normativa para la defensa de la Tesis Doctoral)

El departamento de .(1).Biología Celular, Histología y Farmacología..... o
(2) La Comisión Académica del Doctorado en

.....
en su reunión de fecha 1 de marzo de 2012 y previo informe favorable de su Director o Directores, acordó dar su conformidad a la presentación de la siguiente Tesis Doctoral, al considerar que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente:

Título: EFECTOS DE LA NEURREGULINA SOBRE LA REGENERACIÓN NERVIOSA A TRAVÉS DE PRÓTESIS ACELULARES IMPLANTADAS EN NEURECTOMÍAS

.....
Autor/a: D/D^a. Eugenio Ignacio Alcalde Domínguez, con D.N.I. nº 52410443-K
Director/es: Dr. Gayoso Rodríguez Manuel José, con D.N.I. nº 51437450-C.....

.....
(Apellidos y nombre y D.N.I.)

Ponente de la Tesis doctoral en caso de que el Director de la misma no sea del Departamento (art. 19.1.b de las Normas Regulatoras)

....., D.N.I. nº

Dentro del Área de Conocimiento:

Rama de Conocimiento: (para los alumnos regulados por el R.D. 185)

X Ciencias de la Salud Ciencias Experimentales Ciencias Técnicas

Ciencias Sociales y Jurídicas Humanidades

Disciplina (4 dígitos): (Para los regulados por el R.D. 1393)

Valladolid, de de 2012

El Secretario del Departamento,

Fdo.: Manuel Garrosa García

(sello del Departamento)

Vº Bº

El Director del Departamento



Fdo.: Manuel J. Gayoso Rodríguez

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

(1) para los alumnos regulados por el R.D. 778/1998 (2) para los regulados por el R.D. 56/2005



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**



TESIS DOCTORAL:

**EFFECTOS DE LA NEURREGULINA SOBRE LA REGENERACIÓN
NERVIOSA A TRAVÉS DE PRÓTESIS ACELULARES
IMPLANTADAS EN NEURECTOMÍAS**

Presentada por Eugenio Ignacio Alcalde Domínguez para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez

Agradecimientos

Ha pasado tiempo desde el inicio de esta Tesis y la lista de personas a las que tengo que agradecer algo es larga. Una sola página no hará justicia pero no quiero olvidar cada momento que compartisteis conmigo, las conversaciones, los abrazos y los ánimos que me habéis dado, y toda la ilusión que habéis puesto en mí. Con todo el corazón...

Quiero agradecer en primer lugar al Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez la confianza y la oportunidad que me ofreció, sus importantes enseñanzas, su gran paciencia y la sabia dirección de este trabajo. Gracias también por transmitirme la pasión por la Investigación, la curiosidad y la meticulosidad en el trabajo. Pero sobre todo, gracias por su amistad, Profesor.

Al Profesor Carlos Íñiguez por mostrarme la Ciencia desde puntos de vista diferentes; a la Profesora Blanco y a la Profesora Bullón por su apoyo continuado a mi labor y su ánimo para la finalización de este trabajo; a la Profesora Carmen Martínez por los interesantes debates científicos que seguimos practicando; al Profesor Javier Agudo por sus sabias lecciones sobre la didáctica de la Histología; al Profesor José María Fidel Fernández por tenderme siempre una mano; al Profesor Ali Al-Majdalawi por todas sus enseñanzas y su cercanía y al Profesor Manuel Garrosa por su colaboración, apoyo e interés en todos los aspectos. Gracias a todos por ser los mejores compañeros. Gracias a todos por vuestra amistad.

Con gran admiración, gracias a D. Luis Santiago por su excelente y delicado trabajo, por enseñarme todos sus secretos y por ser una gran persona. A D^a. Teresa Rodríguez por su esmerada labor en las técnicas inmunohistoquímicas y por ser una compañera ejemplar. Y a D. Rogelio Martínez por su amabilidad y su profesionalidad en el desarrollo y construcción de las prótesis. Gran parte de esta Tesis es obra suya.

A D. Ángel Álvarez Barcia, gijonés de pro y director del Animalario de la Universidad de Valladolid, y al personal de mantenimiento por el cariño puesto en el cuidado de los conejos.

A mis amigos, que nunca han fallado y que se han quedado con muchas de mis penas: Patri, Rober, Pablo, Lucía, Iván, Susana, Maite, Tomás, Isa... Y a aquéllos que desde el inicio de esta Tesis han abandonando en masa el club de los damnificados: Víctor y Gemma (y Martina), Jorge y Miriam, Javi Guervós y Sandra, César y Pilar, Javier Lomo y Ana... Peter, a ver si te animas tú, amigo.

Muy especialmente, gracias a mi familia, que siempre ha estado orgullosa de mí. A mis padres, María Teresa y Nacho que tanto amor me han dado; a mi hermano David y a mi hermana Maite, que además me va a dar la mejor sobrin@ del mundo. A los amores de mis hermanos, Miguel y Pilar, que se han convertido en dos hermanos más. A todos ellos, gracias porque les ha tocado aguantar lo que me llevo para casa.

Sin duda la lista no estará completa si no añado a mi familia rusa, Sergei, Natasha y Pavel, gracias por aceptarme en vuestra vida. Os llevo en el corazón. Спасибо большое!

A ti, Elena, no sabría cómo darte las gracias por confiar siempre en mí, por darme ánimos, por quererme tanto y por mirar al futuro conmigo. Я тебя люблю!

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biología del nervio periférico	5
1.1.1. Estructura histológica del nervio periférico	7
1.1.2. La célula de Schwann	10
1.1.3. La lámina basal y la matriz extracelular	16
1.1.4. Factores de crecimiento en el sistema nervioso periférico	20
Neurotrofinas	21
Citoquinas neuropoyéticas	22
Factores de crecimiento fibroblástico	22
Otros factores de crecimiento	22
1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico	27
1.2.1. El nervio periférico lesionado	27
1.2.2. Procesos de degeneración	29
Cambios en el cuerpo celular de las neuronas y en el cabo proximal de la lesión	29
Cambios en el cabo distal de la lesión: Degeneración walleriana	33
1.2.3. Procesos de regeneración	36
Factores de crecimiento en el nervio durante el proceso de regeneración	39
1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico	43
1.3.1. Estrategias de reparación	43
Sutura	43
Trasplante autólogo	45
Trasplante alogénico y trasplante heterólogo	45
1.3.2. Ingeniería Tisular del nervio	46
Estructura y materiales	47
Componentes celulares	50
Factores de crecimiento	52
2. JUSTIFICACIÓN	55
3. HIPÓTESIS	59
4. OBJETIVOS	63
5. MATERIALES Y MÉTODOS	67
5.1. Materiales	69
5.1.1. Animales de experimentación	69
5.1.2. Productos químicos	70
5.1.3. Disoluciones	72
5.1.4. Sueros inmunológicos y sistemas de inmunodetección	74
5.1.5. Instrumentos	75
5.2. Métodos	77
5.2.1. Elaboración de la bioprótesis	77
5.2.2. Implante de la bioprótesis	79
5.2.3. Obtención y preparación del tejido	80
5.2.4. Sección y distribución de tinciones	80
Detección de marcadores mediante inmunofluorescencia	81
Detección de dos marcadores mediante inmunofluorescencia	83
Procesamiento para microscopía electrónica	84
5.2.4. Evaluación y procesamiento estadístico de los datos	85
6. RESULTADOS	87
6.1. Grupo 15 días	95
6.1.1. Grupo 1. Implantes sin NRG1 durante 15 días	96
6.1.2. Grupo 2. Implantes suplementados con NRG1 durante 15 días	105
Resumen de los resultados obtenidos 15 días tras el implante.	112
6.2. Grupo 30 días	113
6.2.1. Grupo 3. Implantes sin NRG1 durante 30 días	114
6.2.2. Grupo 4. Implantes suplementados con NRG1 durante 30 días	125

6.3. Grupo 75 días	133
6.3.1. Grupo 5. Implantes sin NRG1 durante 75 días	135
6.3.2. Grupo 6. Implantes suplementados con NRG1 durante 75 días	143
7. DISCUSIÓN	153
7.1. Diseño de la bioprótesis	155
7.1.1. Estructura y materiales	159
7.1.2. Componentes celulares: un modelo de prótesis acelular	161
7.1.3. La Neurregulina como factor de crecimiento	163
7.2. Parámetros biológicos de la regeneración	167
7.2.1. La célula de Schwann	168
8. CONCLUSIONES	173
9. BIBLIOGRAFÍA	177

1. Introducción

Las lesiones de los nervios periféricos tienen como consecuencia la pérdida total o parcial de las funciones motoras, sensoriales y autónomas correspondientes a las áreas denervadas del cuerpo. Esto es debido a la interrupción de la continuidad de los axones, a la degeneración de las fibras nerviosas distales a la lesión y a una eventual muerte de las neuronas axotomizadas. Las lesiones del sistema nervioso periférico son un problema bastante común y pueden derivar en una sustancial pérdida de funcionalidad y en la disminución de la calidad de vida debido a la permanente disminución de las funciones motoras y sensoriales. Además, pueden dar lugar a otros problemas secundarios, como son los dolores neuropáticos. Estas patologías tienen una gran repercusión social en términos de tratamiento sanitario y largos periodos de incapacidad (Jaquet *et al.*, 2001; Rosberg *et al.*, 2005). En Europa se dan más de 300.000 casos al año de lesiones del sistema nervioso periférico. A pesar de la reparación quirúrgica, la discapacidad suele perdurar durante el resto de la vida de muchos pacientes (Nicholson y Verma, 2004; Taylor, 2006).

Sin embargo, el sistema nervioso periférico, al igual que otros muchos tejidos del ser humano adulto, es capaz de repararse y de regenerarse. Ramón y Cajal ya observó que tras la axotomía, se originaban numerosas ramificaciones desde cada axón, invadiendo varios tubos de células de Schwann en el extremo distal de la lesión (Ramón y Cajal, 1928). Ramón y Cajal también demostró el fenómeno del neurotropismo (quimiotropismo), por el cual los axones en regeneración crecían preferentemente a través del segmento distal del nervio y no a través de otros tipos de tejidos (Ramón y Cajal, 1928). Los axones de las motoneuronas en el sistema nervioso periférico, al contrario que en el sistema nervioso central, tienen una gran capacidad de regeneración. Las neuronas sensitivas primarias tienen también la capacidad de regenerar su axón lesionado. Esta capacidad, sin embargo, es mucho mayor para el axón periférico de la neurona sensitiva que para la rama del axón que se dirige centralmente (Donnerer, 2003). Esto podría explicarse por los factores neurotróficos presentes en el tejido periférico que favorecen el crecimiento de las neuritas. Sin embargo, la rama del axón que se dirige hacia el sistema nervioso central se encontrará tejido glial inhibitorio en la zona de la raíz dorsal (Ramer *et al.*, 2002).

Una lesión nerviosa es diferente de la mayoría de las lesiones de otros tipos de tejidos del organismo, ya que no requiere tan sólo una reparación local. La sección de los axones tiene implicaciones en toda la longitud de la neurona (esto es, desde el cuerpo celular en la médula espinal o en el ganglio raquídeo, hasta las dianas terminales) y el proceso de

1. Introducción

reparación implica el crecimiento de neuritas a lo largo de grandes distancias. Además, al contrario que otros tipos de lesiones en el organismo, la lesión del nervio tiene consecuencias funcionales inmediatas para el cerebro en términos de rápidas reorganizaciones en la corteza cerebral (Lundborg, 2000; Navarro *et al.*, 2007).

El tejido nervioso, debido a su complejidad y a sus conexiones de larga distancia, se repara en realidad mediante una verdadera regeneración. La reparación mediante cicatrización no permitiría restablecer la correcta conectividad eléctrica (Fine *et al.*, 2000). Desde las primeras descripciones de la degeneración y regeneración del sistema nervioso por parte de August Waller (1850) y de Santiago Ramón y Cajal (1928), numerosos autores han propuesto diversas aproximaciones experimentales para la reparación quirúrgica de las lesiones por sección de los nervios periféricos (Sunderland, 1951; Swaim, 1972; Johnson *et al.*, 2005) y para la regeneración de grandes extensiones de tejido nervioso perdido (Lundborg, 2000; 2004). Desde hace unos años la Ingeniería Tisular propone nuevas aproximaciones experimentales para la reparación y regeneración de los nervios periféricos lesionados. Así, a mediados de los años 80 se empezaron a emplear materiales naturales y sintéticos para la fabricación de tubos para reparar grandes lesiones de los nervios. El concepto de prótesis tubular se apoya en tres hipótesis: A) La regeneración nerviosa puede ser favorecida si el traumatismo quirúrgico se minimiza. B) Un pequeño espacio entre los cabos seccionados dentro del tubo puede incrementar las posibilidades de actuación de los mecanismos neurotrópicos y neurotróficos. C) Un sistema cerrado permitiría la acumulación de los factores de crecimiento que son liberados por el tronco nervioso tras la lesión (Lundborg, 2000). El objetivo es utilizar materiales naturales y artificiales para obtener un tejido semejante al biológico con las propiedades adecuadas para la reparación tisular.

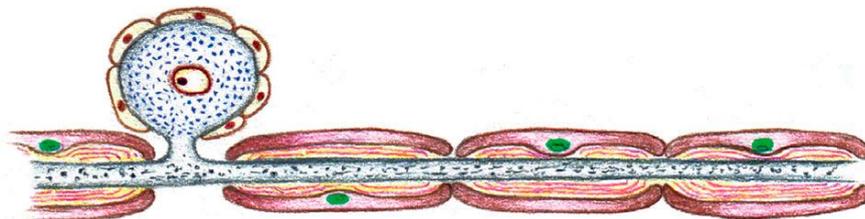
Todos los tejidos, desde un punto de vista general, están formados por células y matriz extracelular. La matriz extracelular juega un papel fundamental proporcionando un medio ambiente favorable para las células y manteniendo de la estructura propia de cada tejido. Además, numerosas moléculas bioactivas intervienen en la comunicación celular en el medio ambiente tisular. De esta manera, los tres elementos básicos que necesita la Ingeniería Tisular son: células, un armazón o matriz extracelular y señales celulares como, por ejemplo, factores de crecimiento (Johnson *et al.*, 2005).

En el primer bloque de esta Introducción se hará una breve introducción a la Biología normal del nervio periférico y seguidamente se analizarán sus componentes según las necesidades de la Ingeniería Tisular del nervio. A continuación se resumirán los eventos sucedidos en un nervio periférico en regeneración y por último se estudiarán las estrategias de la Ingeniería Tisular encaminadas a la reparación y regeneración de un nervio seccionado.

1.1. Biología del nervio periférico

El nervio periférico es una estructura en forma de cable por el cual discurren cientos o miles de axones. Los troncos nerviosos periféricos forman conexiones entre el cerebro o la médula espinal y todos y cada uno de los músculos esqueléticos del organismo a través de axones motores. También conectan los órganos sensoriales con el cerebro y la médula espinal a través de los axones sensoriales. Además, conectan el sistema nervioso central con la musculatura lisa, las glándulas sudoríparas, los vasos sanguíneos y otras estructuras del sistema nervioso autónomo (Delgado *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2005; Zochodne, 2008).

La unidad básica de un nervio periférico es la fibra nerviosa, que se define como la asociación de uno o varios axones neuronales con una serie de células de Schwann (Fine *et al.*, 2000). Los nervios raquídeos o espinales son nervios mixtos: contienen fibras aferentes sensitivas y fibras motoras eferentes que conducen impulsos relacionados con la función motora desde la médula espinal a los órganos efectores (Delgado *et al.*, 1998). El cuerpo celular de las neuronas sensitivas se encuentra en un ganglio espinal o ganglio raquídeo de un nervio espinal. Estas neuronas presentan una morfología pseudounipolar: no presentan dendritas y su axón se bifurca en dos ramas, una que se dirige a la periferia y otra hacia el sistema nervioso central (Kandel *et al.*, 2000).



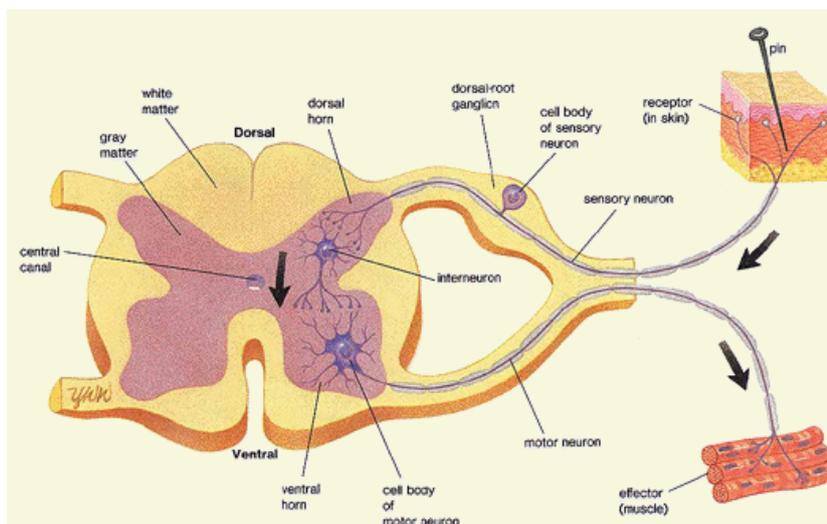
Esquema de una neurona sensitiva del ganglio raquídeo mostrando su típica morfología pseudounipolar. El pericarion está rodeado por células satélite. Ilustración de Scott Rogers para Zochodne, 2008.

Las ramas centrales de los axones sensitivos forman la denominada raíz dorsal. Estos axones van a penetrar en la médula espinal por el surco posterolateral del asta dorsal

1. Introducción

(Delgado *et al.*, 1998). La rama periférica del axón de la neurona ganglionar discurre por el nervio hasta su destino final en los diversos órganos receptores. El terminal de este axón es la única parte de la neurona sensitiva que responde a estímulos naturales. Las propiedades del terminal nervioso determinan la función sensorial de cada una de estas neuronas (Kandel *et al.*, 2000). Los mecanorreceptores y los propioceptores están inervados por neuronas ganglionares raquídeas con axones mielinizados de gran diámetro (de 5 a 12 μm), que conducen rápidamente los potenciales de acción. Los receptores térmicos y los nociceptores tienen axones de pequeño diámetro, no mielinizados o con tan solo una fina capa de mielina; estos axones conducen los impulsos más lentamente (Kandel *et al.*, 2000).

Las neuronas motoras o motoneuronas, a diferencia de las neuronas sensitivas de los ganglios raquídeos, presentan árboles dendríticos que surgen directamente del soma. El cuerpo celular de las motoneuronas se encuentra en las astas ventrales de la médula espinal, donde sus dendritas reciben información superior de carácter motor. Cada motoneurona origina un único axón, de aproximadamente 5 a 10 μm de diámetro. En el segmento inicial del axón se integran las señales recibidas de otras neuronas y se genera el potencial de acción (Kandel *et al.*, 2000). Los axones de las motoneuronas salen de la médula espinal por el surco anterolateral, formando la raíz ventral. La raíz ventral se une a la raíz dorsal a nivel del orificio de conjunción de la columna vertebral. Desde este punto el tejido conectivo envuelve ambos componentes –eferente y aferente– dándoles el aspecto de unidad anatómica que conocemos como nervio espinal o raquídeo (Delgado *et al.*, 1998).



Esquema de la localización de los elementos neuronales que forman el nervio periférico. Adaptado de Kandel *et al.*, 2000.

1.1.1. Estructura histológica del nervio periférico

Cualquiera de los grandes troncos nerviosos, como el nervio ciático, contienen una gran variedad de axones de diferentes tipos: hay axones mielinizados grandes (axones motores α y axones sensitivos $A\alpha$), axones mielinizados de pequeño calibre (axones motores γ y axones sensitivos $A\beta$ y $A\delta$), y también axones amielínicos (axones sensitivos C y autónomos). Las aproximaciones histológicas clásicas no pueden distinguir si los axones mielinizados son motores o sensitivos (Zochodne, 2008). Las técnicas de inmunodetección y los marcadores genéticos permiten diferenciar entre los distintos tipos de axones.

Desde el punto de vista estructural, los axones conductores de señales de las neuronas sensitivas y de las motoras presentan componentes similares. El interior del axón está ocupado por el axoplasma, que es la continuación citoplásmica del soma neuronal (Kandel *et al.*, 2000). El axoplasma presenta varias zonas funcionales diferentes que intervienen en el transporte de nutrientes y componentes bioquímicos esenciales desde el cuerpo celular hasta el terminal axónico. Los microfilamentos se distribuyen en la región próxima a la membrana celular, mientras que los filamentos intermedios y los neurotúbulos se reparten por el axoplasma. Los axones periféricos presentan cinco tipos de proteínas de filamentos intermedios: la periferina, la α -internexina y tres subunidades de los neurofilamentos (Lariviere y Julien, 2004). La membrana celular que limita al axoplasma se denomina axolema (Zochodne, 2008). Asociada al axón se encuentra la célula de Schwann, que proporciona soporte estructural y equilibrio químico a las neuronas del sistema nervioso periférico (Fine *et al.*, 2000). La célula de Schwann se puede reconocer a nivel de ultraestructura por su típico revestimiento externo: la lámina basal. La microscopía electrónica de transmisión pone de manifiesto un núcleo pálido, sin condensaciones nucleares o irregularidades. La mayoría de las células de Schwann también presentan el citoplasma claro y sólo una pequeña parte (menos de un 5%) tienen citoplasmas más electrodensos. En la mayoría de los casos no se observan organelas prominentes. (Morris *et al.*, 1972; Berthold *et al.*, 2005).

La célula de Schwann puede envolver uno o más axones originando así una fibra nerviosa. Una fibra nerviosa mielínica se compone de segmentos mielínicos en los que una célula de Schwann envuelve a un único axón (de un diámetro aproximado de 1 a 30 μm). La membrana plasmática de esta célula de Schwann forma una estructura lamelar en espi-

1. Introducción

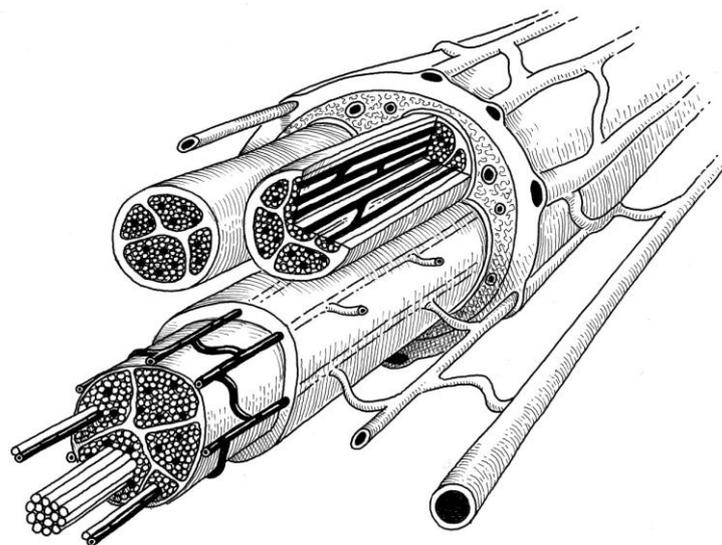
ral alrededor del axón. La vaina de mielina es una doble espiral lipoproteica que actúa como aislante y acelera la transmisión del impulso nervioso a lo largo del axón y por lo tanto, es muy importante para los movimientos reflejos rápidos, como el reflejo rotuliano (Zorick y Lemke, 1996). Tanto la estructura laminar como su composición bioquímica son consecuencia de cómo se forma la mielina a partir de la membrana plasmática. Durante el desarrollo del sistema nervioso periférico, antes de que tenga lugar la mielinización, los axones se sitúan en una depresión formada en la célula de Schwann. Éstas se disponen en hilera a lo largo del axón. La membrana plasmática de cada célula de Schwann rodea un único axón y al cerrarse forma una estructura de doble membrana llamada mesoaxón, que se alarga y se enrolla en torno al axón en capas concéntricas. El citoplasma de la célula de Schwann queda reducido al mínimo a medida que se compactan las laminillas de la mielina madura (Kandel *et al.*, 2000). Cada célula de Schwann y su vaina de mielina asociada delimitan una zona en la longitud de la fibra nerviosa. Esta región se denomina segmento o zona internodal. Los espacios entre dos zonas internodales se conocen como nodos de Ranvier. En los nodos de Ranvier se acumulan canales de Na^+ necesarios para la conducción saltatoria del estímulo nervioso (Novakovic *et al.*, 1996; Custer *et al.*, 2003).

Las fibras nerviosas amielínicas (o fibras de Remak) tienen otra organización morfológica. Numerosos axones de pequeño diámetro (de 0.4 a 1.2 μm) están rodeados por invaginaciones o pseudópodos de una célula de Schwann sin formar vainas de mielina (Navarro *et al.*, 2007; Zochodne, 2008).

Rodeando la fibra nerviosa, ya sea mielínica o amielínica, se encuentra la lámina basal formada por las células de Schwann, que es continua en los nodos de Ranvier en las fibras mielinizadas (Ide, 1996). Esta estructura sirve como límite histológico entre los elementos neurales y los del tejido conectivo del nervio periférico. Adyacente a la lámina basal está el endoneuro. El endoneuro es un estroma fibroso compuesto por fibroblastos, elementos vasculares y una doble capa de fibras de colágeno de tipos I y III (Matloub y Yousif, 1992). La envuelta endoneural interna, alrededor de las fibras más gruesas, es una estrecha zona de fibras delgadas de colágeno con orientación circular y oblicua que se extiende hacia el espacio nodal. Externamente a ésta, una capa de fibras de colágeno más gruesas con orientación longitudinal (paralela al eje mayor del tronco nervioso) forman la envuelta endoneural externa o vaina de Key y Retzius, que cruza los nodos (Thomas,

1963). Ushiki e Ide (1986) observaron que las fibras de colágeno de la envuelta endoneural interna están estrechamente asociadas con la lámina basal de las células de Schwann.

Las fibras nerviosas y sus envoltas endoneurales se asocian formando grupos llamados fascículos o funículos. Un fascículo nervioso está rodeado por una envuelta de fibras de colágeno de mayor diámetro denominada perineuro. El perineuro está constituido por entre 7 y 15 láminas de tejido conectivo en disposición circular. Las células perineurales están interconectadas mediante uniones estrechas (zónula occludens) y uniones tipo GAP (Chandross, 1998), formando capas separadas por fibras de colágeno tipo IV (Osawa y Ide, 1986). Las células perineurales presentan una lámina basal formada por colágeno, fibronectina, laminina y glicosaminoglicanos. Aunque hay una gran controversia, se acepta que son de origen fibroblástico (Bunge *et al.*, 1989). Las uniones estrechas entre las células perineurales y la presencia de los elementos vasculares forman parte de la barrera hematonerviosa (Walker *et al.*, 2004), de manera que el perineuro actúa como membrana selectiva de difusión. El perineuro se extiende hacia el interior del fascículo separando los grupos de fibras nerviosas mediante septos intrafasciculares. Englobando los fascículos está la cubierta externa del nervio, el epineuro, que es una red laxa de colágeno (sobre todo de tipo I), elastina y fibroblastos. La capacidad de los nervios para deformarse elásticamente sin llegar a romperse es debida a la resistencia a la tensión y a la elasticidad propias del epineuro (Zochodne, 2008).



Esquema de la organización jerárquica de un nervio periférico en el que se puede apreciar la rica red de aporte sanguíneo. Adaptado de Lundborg, 1988.

1. Introducción

El aporte sanguíneo a los nervios periféricos se lleva a cabo mediante pequeñas arteriolas nutricias que se arborizan en una extensa red de capilares formando los *vasa nervorum*. Las arteriolas nutricias surgen a intervalos irregulares y se extienden siguiendo el eje del tronco nervioso rodeadas por un delicado tejido conjuntivo denominado mesoneuro. Después de atravesar el epineuro, los vasos se ramifican y se alinean paralelos al eje del fascículo. Esta segunda generación de vasos corre paralela a los vasos epineurales. La ramificación terciaria nutre a cada fibra nerviosa individual por medio de un plexo axón-capilar. Numerosas anastomosis entre las ramas perineurales y los vasos de los axones aseguran el aporte vascular colateral adecuado en casos de interrupción parcial del nervio (Matloub y Yousif, 1992).

1.1.2. La célula de Schwann

La célula de Schwann es un tipo de célula glial exclusivo del sistema nervioso periférico. La mayor parte de las células gliales de un nervio raquídeo son células de Schwann. Las células de Schwann acompañan a todos los axones de los nervios periféricos: sensitivos, motores y autónomos. Dependiendo de su relación con los axones a los que acompañan, las células de Schwann se pueden clasificar en dos tipos: mielinizantes y no mielinizantes (Zochodne, 2008). Las primeras elaboran vainas de mielina alrededor de axones de gran diámetro que son comparables en estructura y función a aquéllas fabricadas por los oligodendrocitos en el sistema nervioso central (Jessen, 2004). Estas vainas de mielina funcionan como aislante y son esenciales para la conducción rápida de los potenciales de acción nerviosos (Zorick y Lemke, 1996). Las células de Schwann no mielinizantes parecen tener funciones metabólicas y de soporte mecánico (Jessen, 2004). Estas células se asocian a varios axones de pequeño calibre sin enrollarse entorno a ellos, dando lugar a fibras nerviosas de baja velocidad de conducción (Zorick y Lemke, 1996). Las células de Schwann mielinizantes y las células de Schwann no mielinizantes son fácilmente distinguibles entre si por su diferente expresión génica. Las primeras expresan altos niveles de genes específicos de la síntesis de mielina, como los genes para las proteínas P0 y para la proteína básica de la mielina (MBP)¹ (Lee *et al.*, 1997; Beirowski *et al.*, 2005; Guertin *et al.*, 2005). Por el contrario, las células de Schwann no mielinizantes generalmente no ex-

¹ MBP son las siglas inglesas de Myelin Basic Protein.

presan estos genes, y en su lugar presentan una serie de marcadores amielínicos que también se expresan en las células de Schwann inmaduras, tales como proteína glial fibrilar ácida (GFAP)² o el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (Hall *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1998). Las células de Schwann maduras, tanto mielinizantes como no mielinizantes, muestran una fuerte inmunorreactividad a la proteína ligante de calcio S100 (Stefansson *et al.*, 1982b; Sugimura *et al.*, 1989; Baimbridge *et al.*, 1992; Vega *et al.*, 1996).

Las células de Schwann de los nervios periféricos tienen su origen en las crestas neurales (Le Douarin *et al.*, 1991; Marusich y Weston, 1991; Jessen y Mirsky, 1992; Bronner-Fraser, 1993). Las células de las crestas neurales darán lugar a los precursores de las células de Schwann (Zorick y Lemke, 1996). Las crestas neurales también dan lugar a otros tipos de células gliales del sistema nervioso periférico, tales como la teloglía de los terminales motores somáticos, las células satélite asociadas a los somas neuronales en los ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, y la glía entérica de los ganglios del intestino (Pannese, 1981; Gershon *et al.*, 1993). Probablemente las crestas neurales no sean la única fuente de glía periférica. Parece ser que algunas células de Schwann de las raíces ventrales se originan en la parte ventral del tubo neural y que algunas células satélite y células de Schwann de los ganglios raquídeos surgen de células neuroepiteliales de la médula espinal antes de la conclusión de la migración de las células de las crestas neurales (Rickmann *et al.*, 1985; Loring y Erickson, 1987; Lunn *et al.*, 1987; Carpenter y Hollyday, 1992).

El origen de las células de Schwann y la morfogénesis del nervio periférico son sucesos paralelos. Antes del inicio de la gliogénesis en la médula espinal, las células de la cresta neural originan los primeros precursores de las células de Schwann (Zorick y Lemke, 1996), se mezclan entre los axones de los nervios primordiales y atraviesan los tejidos embrionarios en busca de sus dianas distales para establecer los nexos entre el sistema nervioso central y el resto del organismo (Mirsky y Jessen, 1996). El primer encuentro entre las células derivadas de la cresta neural y los axones probablemente tiene lugar en la parte anterior de los somitos que se sitúan a ambos lados del tubo neural. Los axones y las células de las crestas neurales están canalizados hacia estos lugares simultáneamente durante el desarrollo (Rickmann *et al.*, 1985; Loring y Erickson, 1987).

² GFAP son las siglas en inglés de glial fibrillary acidic protein.

1. Introducción

Todas las células de las crestas neurales expresan el factor de transcripción SOX10 (sex determining region Y box 10). Sox10 es el único gen conocido que es necesario para la generación de la sucesión glial a partir de células troncales de las crestas neurales. SOX10 parece estar presente en todas las células migratorias de las crestas neurales (Britsch *et al.*, 2001). La expresión persiste en la glía satélite en desarrollo en los ganglios raquídeos y en los precursores de las células de Schwann (PCS) de los nervios espinales, pero está muy reducida en neuronas primordiales (Le Douarin *et al.*, 1991). De acuerdo con estos datos, ratones en los que el gen Sox10 está inactivado, carecen de glía satélite y de PCS, mientras que las neuronas se presentan inicialmente en número normal (Le Douarin *et al.*, 1991; Jessen y Mirsky, 1998; Britsch *et al.*, 2001).

Los nervios embrionarios primordiales son columnas compactas construidas exclusivamente por la asociación de axones y de precursores de las células de Schwann (PCS). En la rata, a los 14 días de edad embrionaria (E 14)³ los nervios de las extremidades constan de axones y PCS (Jessen y Mirsky, 1998). Los PCS se localizan en los márgenes externos de los nervios y emiten procesos laminares hacia su interior, conectándose entre sí y englobando un gran número de axones (Jessen y Mirsky, 1998; 2002). Estos nervios son estructuras compactas: no hay espacios significativos de tejido conjuntivo ni en forma de andamiaje ni como cubierta protectora. Tampoco hay vasos sanguíneos.

Para regular su supervivencia, los PCS dependen enteramente de señales procedentes de los axones, probablemente mediadas por la β -Neurregulina 1 (NRG1) (Dong *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1999). El control de la supervivencia de los PCS por parte de los axones identifica una fase temprana del desarrollo del nervio en la que las neuronas y las células gliales dependen las unas de las otras para su supervivencia. Una posibilidad interesante es el control de la supervivencia neuronal por los PCS a través de la señalización retrógrada (“back signaling”) del dominio intracelular de la NRG1 (Bao *et al.*, 2003; Falls, 2003). Si este fuera el caso, la supervivencia mutua de neuronas y glía en los nervios embrionarios se podría asegurar por un efecto bidireccional de la misma interacción molecular, que no sería otra que la unión de NRG1 con los receptores ErbB2 y

³ En la literatura solamente hay disponibles datos concretos sobre la cronología de la formación de las células de Schwann y del nervio periférico para rata y ratón, en trabajos publicados sobre todo por Jessen y Mirsky. Sin embargo, los hitos en la gliogénesis podrían ser extrapolados al conejo, con 32 días de gestación, ya que se da una gran homología entre los primeros sucesos de la vida embrionaria de unos y otros (Edwards, 1968; Noden y de Lahunta, 1990).

ErbB3 (Citri *et al.*, 2003). Una de las funciones de los PCS y de las células de Schwann inmaduras es la de proporcionar señales esenciales de supervivencia a las neuronas en desarrollo (Aguayo *et al.*, 1981).

Los PCS se convierten en células de Schwann inmaduras entre los días E 15 y E 17 de la rata (E 13 – E 15 en ratones). La transición entre PCS y célula de Schwann está ligada a una importante fase en la organogénesis de los nervios periféricos y coincide con el principal cambio en la arquitectura celular de los nervios periféricos (Jessen y Mirsky, 1991). En este periodo se dan cambios coordinados en la expresión molecular y respuestas a señales de supervivencia y mitógenos. El control de la transición entre PCS y célula de Schwann inmadura está relacionado con la aparición de algunos factores de transcripción. La proteína activadora 2 α (AP2 α) sería un factor de regulación negativa, ya que no está presente en células de Schwann generadas *in vivo* (Jessen y Mirsky, 2002). La expresión forzada de AP2 α en PCS retrasa la aparición de las células de Schwann *in vitro*. Otro regulador negativo de la formación de las células de Schwann es la endotelina. Las endotelinas y sus receptores están presentes en los nervios embrionarios. En ratas con mutaciones en los genes para los receptores de endotelina B, las células de Schwann aparecen prematuramente (Eccleston *et al.*, 1987a). La Neuregulina 1 es un regulador positivo de la transición PCS-célula de Schwann. En experimentos *in vitro* se ha observado que la NRG1 acelera la conversión de los PCS en células de Schwann y que aumenta la supervivencia y la proliferación de los PCS (Dong *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998; Jessen y Mirsky, 1998; Garratt *et al.*, 2000). La activación de *Notch* también incrementa la generación de células de Schwann a partir de PCS *in vitro* (Li *et al.*, 2004; Woodhoo *et al.*, 2009).

El tejido conjuntivo comienza a penetrar en los nervios, que se vuelven vascularizados, y una nueva capa de perineuro aparece en la superficie externa (Jessen y Mirsky, 1998). Hacia el día E 18 los nervios están formados por fascículos irregulares de células de Schwann inmaduras que se encuentran rodeando en conjunto a grandes grupos de axones (similares a los de los individuos neonatos) que están rodeados, a su vez, por tejido conectivo que contiene fibroblastos endoneurales y vasos sanguíneos (Jessen y Mirsky, 1998). Esta es la relación básica entre el tejido nervioso, el tejido conectivo y los vasos sanguíneos que se aprecia en los nervios adultos.

1. Introducción

El punto final del desarrollo de la célula de Schwann es su especialización en células mielinizantes y no mielinizantes que envuelvan axones de gran diámetro y de pequeño diámetro respectivamente. El tipo de axón al que se asociarán determina el destino postnatal de las células de Schwann inmaduras, siendo activada la mielinización selectivamente en aquellas células que envuelvan un único axón de gran calibre (Kelly *et al.*, 1992). Como resultado del contacto axonal, las células de Schwann mielinizantes producen el glicolípido galactocerebrósido (GalC) específico de diferenciación alrededor de la edad E 18, cuando los axones de mayor calibre se empiezan a asociar en relación 1:1 con las células de Schwann, fenómeno conocido como “radial sorting” (Jessen *et al.*, 1985; Eccleston *et al.*, 1987b; Raphael *et al.*, 2011). Las células de Schwann no mielinizantes expresan GalC mucho más tarde, entre la segunda y la quinta semana de vida postnatal (Jessen *et al.*, 1985; Jessen *et al.*, 1987). El contacto íntimo con los axones es también necesario para la expresión de un segundo glicolípido, el sulfátido, el cual es identificado por el anticuerpo O4 (Sommer y Schachner, 1981; Mirsky *et al.*, 1990). Sin embargo, al contrario que GalC, el marcador O4 está presente en ambos tipos de células de Schwann en estadios tempranos del desarrollo del nervio ciático de la rata (Mirsky *et al.*, 1990). Hacia E 18, las células de Schwann también presentan otro conjunto de proteínas tales como A5E3, Ran-1 y GFAP (Jessen *et al.*, 1990). En las células de Schwann no mielinizantes la expresión de Ran-1, A5E3 y de GFAP persiste durante la edad adulta, mientras que estas tres proteínas ven disminuida su expresión en las células mielinizantes (Jessen *et al.*, 1990). Aumentan, sin embargo, las proteínas relacionadas con la síntesis de mielina, como la P0 (Morgan *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1997) o la MBP (Beirowski *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2005). De esta manera, es el axón el que determina finalmente el fenotipo de la célula de Schwann. Una isoforma transmembranaral de la NRG1 presente en el axón, la NRG1 de tipo III, es la responsable de la mielinización (Taveggia *et al.*, 2005; Nave y Salzer, 2006). El nivel de NRG1 tipo III en el axón, más que el diámetro del axón, parece ser la señal clave para la mielinización (Taveggia *et al.*, 2005). Los axones amielínicos del sistema nervioso autónomo expresan niveles bajos de NRG1 tipo III en su superficie. Sin embargo, las neuronas de los ganglios raquídeos expresan grandes cantidades de NRG1 tipo III y sus axones están fuertemente mielinizados (Nave y Salzer, 2006). Se requiere un tamaño determinado del axón para que la célula de Schwann lo mielinice. Este tamaño del axón está determinado, en parte, por la cantidad de NRG1 tipo III asociada a la membrana del axón (Nave y Salzer, 2006). La mielinización de los axones comienza en el momento

del nacimiento y se prolonga en siguientes etapas postnatales (Lai, 2005; Lemke, 2006; Jessen y Mirsky, 2008). Esto requiere un cambio radical en las relaciones celulares de los nervios embrionarios tardíos, que permita a las células de Schwann individuales asociarse a un único axón de gran diámetro y comenzar su mielinización. Al mismo tiempo, el número de las células de Schwann se ajusta controlando su supervivencia y proliferación (Grinspan *et al.*, 1996; Syroid *et al.*, 1996). Dado que el periodo de muerte neuronal programada terminó mucho antes, no parece ser el responsable de la regulación de las tasas de supervivencia y proliferación de las células de Schwann. Ya que la disponibilidad de NRG1 axonal está restringida, tan sólo aquellas células de Schwann en contacto directo con el axón sobreviven (Garratt *et al.*, 2000). El TGF β (transforming growth factor- β) también se encuentra en nervios embrionarios y la expresión de su receptor de tipo II se reduce alrededor de E 19, coincidiendo con la salida del ciclo celular de las células de Schwann (Einheber *et al.*, 1995).

La mielinización prematura parece estar evitada por la actuación de unos sistemas de señales que actúan como frenos de la mielinización. Hay varias rutas de señalización activas en las células de Schwann inmaduras que inhiben la diferenciación de la mielina. Por ejemplo, la ruta de la kinasa c-Jun (N) amino terminal (JNK) está activa en las células de Schwann entre E 18 y el nacimiento, ya que es necesaria para la señalización de NRG1 y TGF β (Eccleston *et al.*, 1989; Fan y Gelman, 1992; Einheber *et al.*, 1995). Estas rutas se suprimen al inicio de la mielinización. Si la ruta JNK continúa activa, la mielinización en cocultivos de neuronas y células de Schwann se ve bloqueada y se inhibe la expresión de genes de mielina, que normalmente se daría como respuesta a señales promielinizantes tales como KROX20 o el incremento de AMP cíclico (Morgan *et al.*, 1991; Monje *et al.*, 2006). De igual forma, la activación de la cascada de señalización de Notch promueve la proliferación de las células de Schwann inmaduras, pero es inactivada a medida que la célula comienza la mielinización, y si se evita esto, la mielinización se bloquea (Li *et al.*, 2004; Jessen y Mirsky, 2008). Un patrón análogo se observa en los factores de transcripción PAX3 y SOX2: se expresan antes de la mielinización y están involucrados en la proliferación. Su expresión se reduce en las células mielinizantes y ejerce un efecto negativo en la diferenciación de la mielina (Jessen y Mirsky, 2002; 2008).

La mielinización se activa por la inhibición de estas rutas junto con la activación de rutas promielínicas, relacionadas con los factores de transcripción KROX20 (Woodhoo *et*

1. Introducción

al., 2009), el factor de transcripción OCT6 y la proteína BRN2⁴, las proteínas ligantes de NGFI-A 1 y 2 (NAB1/2), la cascada de señalización de la fosfatidilinositol kinasa 3 (PI3K) y el oncogén homólogo al sarcoma viral v-ski (SKI) (Jessen y Mirsky, 1992).

1.1.3. La lámina basal y la matriz extracelular

Las láminas basales están constituidas por una matriz extracelular organizada en capas delgadas (40 – 120 µm) y flexibles que subyacen a las superficies y conductos epiteliales; también rodean fibras musculares y células de Schwann (Osawa y Ide, 1986; Ushiki y Ide, 1987; Ide, 1996). Las células de Schwann de los nervios maduros también están recubiertas por una lámina basal (Ide, 1996).

Originalmente la lámina basal ha sido considerada una estructura mecánica estática que proporciona funciones de soporte, de separación entre tejidos y de filtrado de sustancias (Alberts *et al.*, 2007). Sin embargo, tienen otras funciones además de las simplemente estructurales o filtrantes. Esta variedad de funciones se debe a dos características de las láminas basales: primero, el repertorio molecular exacto de la lámina basal es característico de cada tipo de célula (Erickson y Couchman, 2000); y segundo, estos componentes no sólo mantienen la integridad estructural de la lámina basal, sino que también interactúan con receptores de la membrana plasmática de la célula, llegando a desencadenar cascadas de señales intercelulares que controlan muchos de los aspectos de la función celular como la migración, la proliferación y la supervivencia celular (Yurchenco y Cheng, 1994). Además, puede inducir la diferenciación celular (Court *et al.*, 2006) y en el caso particular de las células de Schwann, intervenir en el proceso de mielinización (Chernousov y Carey, 2000; Chernousov *et al.*, 2008).

La lámina basal es sintetizada fundamentalmente por las células que se apoyan en ella; en el caso del nervio, las células de Schwann son las encargadas de fabricar los componentes de la lámina basal. La lámina basal empieza a formarse después de que las células de Schwann hayan sido originadas (Bunge *et al.*, 1986; Bunge, 1987). La observación de la ultraestructura nos muestra que la lámina basal consta de dos capas diferentes: una que muestra una baja electrodensidad (lámina lúcida), y que se encuentra adyacente a la membrana plasmática de las células de Schwann (Berthold *et al.*, 2005); y otra que mues-

⁴ BRN2 son las siglas de Brain 2 class III POU-domain protein.

tra una mayor opacidad (lámina densa) justo por el exterior de la anterior (Osawa *et al.*, 2003; Court *et al.*, 2006). La lámina lúcida es rica en laminina, mientras que la lámina densa presenta mayor proporción de fibras de colágeno (Court *et al.*, 2006). En algunos casos puede existir una tercera capa, rica en colágeno de tipo fibrilar, la lámina fibrorreticular o matriz externa fibrilar. Algunos autores se refieren a esta estructura de tres capas como membrana basal, utilizando el término lámina basal para las dos capas más internas. Otros utilizan ambos términos indistintamente (Court *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2007). Para los propósitos de esta Tesis se utilizará el término “lámina basal” para referirse a las dos capas más internas, lámina lúcida y lámina densa.

Aunque su composición exacta varía de un tejido a otro e incluso de una región a otra de la misma lámina, la mayoría de las láminas basales maduras contienen colágeno de tipo IV, numerosos proteoglicanos como el heparán sulfato y glicoproteínas como la laminina y la entactina (Osawa *et al.*, 2003).

Las lamininas son los principales componentes de la lámina basal, de manera que en las primeras etapas del desarrollo la lámina basal consta fundamentalmente de una red de laminina (Alberts *et al.*, 2007). Las lamininas son heterodímeros compuestos por cadenas α , β y γ unidas por un dominio de triple hélice (Colognato y Yurchenco, 2000). Presenta varios dominios funcionales: uno de unión al colágeno de tipo IV, otro de unión al heparán sulfato, otro a la entactina, y dos o más de unión a los receptores de la laminina situados en la superficie celular (Alberts *et al.*, 2007). Las moléculas de laminina adyacentes se pueden asociar e interaccionar con otros componentes de la matriz extracelular, conformando la arquitectura supramolecular presente en la lámina basal (Colognato y Yurchenco, 2000).

La laminina puede actuar como molécula señalizadora para dirigir neuronas en desarrollo hacia sus dianas definitivas. La laminina-1 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$) es la laminina mejor caracterizada y es el sustrato preferido para la migración neuronal a través del sistema nervioso (McKerracher *et al.*, 1996). La laminina-2 ($\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$) se produce en las células de Schwann del sistema nervioso periférico y se cree que está involucrada en la regeneración nerviosa (Kamiguchi *et al.*, 1998). Mutantes carentes de laminina-2 presentan graves alteraciones neuropáticas en los nervios periféricos (Wallquist *et al.*, 2005). La función de la laminina-8 ($\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$), también presente en las células de Schwann, es más desconocida, aunque se sabe que la ausencia de la cadena $\alpha 4$, que distingue la laminina-2 y la laminina-

1. Introducción

8, produce alteraciones en la correcta relación 1:1 entre axón y célula de Schwann⁵ y defectos en la mielinización, aunque la capacidad regenerativa de los axones no se ve alterada (Wallquist *et al.*, 2005). La laminina-3 ($\alpha1 \beta2 \gamma1$) inhibe la extensión de las motoneuronas en las sinapsis en desarrollo (McKerracher *et al.*, 1996; Powell y Kleinman, 1997).

La entactina es una glicoproteína de la lámina basal que presenta dominios para la unión a la laminina. También tiene dominios de unión al colágeno de tipo IV, por lo que se cree que actúa como puente adicional entre la red de laminina de la lámina basal y el colágeno de tipo IV (Alberts *et al.*, 2007).

El colágeno es el componente principal de la matriz extracelular de los mamíferos. Los colágenos fibrilares (tipos I, II y III) forman estructuras similares a cables y proporcionan tensión y resistencia a los tejidos como tendones y ligamentos. Los colágenos no fibrilares (como por ejemplo el tipo IV) actúan como adaptadores entre los componentes de la matriz y forman láminas estables dentro de la lámina basal (Platt *et al.*, 2003; Court *et al.*, 2006).

En el nervio periférico el colágeno no se distribuye de manera uniforme, tal y como observaron Osawa e Ide (1986). El colágeno endoneural está formado por fibras de colágeno de tipo III y se encuentra en la lámina basal de las células de Schwann durante el desarrollo, mientras que el colágeno perineural está compuesto por fibras de tipo I, más gruesas. Parece ser que las células de Schwann son las responsables de la secreción del colágeno de tipo III endoneural (Osawa y Ide, 1986). Otro tipo importante de colágeno que se expresa en el sistema nervioso periférico es el colágeno de tipo IV, constituyente de la lámina basal de las células de Schwann (Carey *et al.*, 1983). Las moléculas de colágeno de tipo IV interactúan a través de sus dominios terminales formando una red flexible de tipo laminar. La red resultante forma un andamiaje insoluble al cual se unen otros componentes de la lámina basal (Alberts *et al.*, 2007).

El colágeno no fibrilar de tipo XIII también se ha encontrado en el nervio periférico (Sund *et al.*, 2001) y presenta un dominio de unión de naturaleza no colágena que lo une a la membrana plasmática (Kvist *et al.*, 1999). Se ha propuesto que el colágeno de tipo XIII así unido, podría facilitar las interacciones célula-célula y las interacciones célula-matriz extracelular (Kvist *et al.*, 2001).

⁵ Fenómeno conocido como “radial sorting”.

Las células de Schwann también producen fibronectina que completa la red fibrilar de la lámina basal. Se cree que la fibronectina favorece la proliferación de las células de Schwann inmediatamente antes de la mielinización de los axones durante el desarrollo (Chernousov *et al.*, 1998). La fibronectina está implicada también en la correcta maduración de la unión neuromuscular durante el desarrollo embrionario (Fu *et al.*, 2001).

Otras moléculas muy abundantes en la lámina basal son los proteoglicanos, ya sea en forma de moléculas asociadas a la membrana plasmática, como componentes transmembranosos o como constituyentes de la matriz extracelular (Hartmann y Maurer, 2001). Los proteoglicanos están implicados en casi todos los procesos importantes para el correcto cableado del sistema nervioso (Margolis y Margolis, 1993; Oohira *et al.*, 1994). Algunos estudios indican que la expresión de heparán sulfato está asociada a la estimulación de la migración y la elongación de las neuritas, mientras que la inhibición de este fenómeno se atribuye a la presencia de proteoglicanos de condroitín sulfato o queratán sulfato (Bovolenta y Fernaud-Espinosa, 2000). Sin embargo, la actividad de un proteoglicano determinado parece estar relacionada con el tipo de neurona; por ejemplo, el fosfacano es un inhibidor del crecimiento de las neuritas en las neuronas del ganglio raquídeo mientras que es permisivo para las neuronas hipocámpales (Garwood *et al.*, 1999).

Los proteoglicanos participan en la unión de ciertos factores de crecimiento, confiando funciones de reservorio de factores de crecimiento a la lámina basal (Platt *et al.*, 2003). Los factores de crecimiento que se unen al heparán sulfato incluyen miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)⁶ (Faham *et al.*, 1998), la pleiotrofina HB-GAM (Li *et al.*, 1990) y la midkina (Asai *et al.*, 1997). La estructura fuertemente aniónica del heparán sulfato evita la proteólisis de los factores de crecimiento que lleve unidos. Además, los proteoglicanos interactúan directamente con receptores neuronales tales como la molécula de adhesión celular neural (NCAM)⁷ o TAG-1⁸, o presentan ligandos (como el bFGF) a sus correspondientes receptores en la membrana. También interactúan con componentes de la matriz extracelular (Milev *et al.*, 1996).

Las interacciones entre los componentes de la lámina basal y sus receptores en la membrana plasmática de la célula modifican recíprocamente la expresión y la organización de cada uno de ellos (Henry y Campbell, 1998; Colognato *et al.*, 1999; Court *et al.*,

⁶ FGF son las siglas inglesas de fibroblast growth factor.

⁷ NCAM son las siglas inglesas de neural cell adhesion molecule.

1. Introducción

2006). Por ejemplo, la correcta orientación de los conos de crecimiento se consigue por la integración de señales atrayentes y repelentes provenientes del entorno cercano y de los órganos diana. Estas señales pueden presentarse en la superficie de células vecinas o ancladas en la matriz extracelular (Goodman *et al.*, 1996). De esta manera, la lámina basal y la matriz extracelular se muestran como elementos importantes en la dirección de las migraciones de los elementos neurales tanto durante el desarrollo como en un proceso regenerativo (Pasterkamp y Verhaagen, 2001; Scarlato *et al.*, 2003; Masuda y Shiga, 2005).

Además, la lámina basal puede actuar como una barrera selectiva para el desplazamiento de las células. Así, por ejemplo, la lámina basal de las células de Schwann impide que los fibroblastos del tejido conjuntivo establezcan contacto con los elementos neurales. Sin embargo, no es obstáculo para el paso de otros elementos celulares tales como macrófagos, linfocitos o procesos nerviosos. La lámina basal constituye de esta forma un elemento importante para la regeneración de las fibras nerviosas dañadas, ya que cuando se da una lesión en una fibra y la lámina basal se mantiene, proporciona un entramado a través del cual las células de Schwann y los axones regenerados pueden migrar (Bradley *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2005).

1.1.4. Factores de crecimiento en el sistema nervioso periférico

Los factores de crecimiento pueden ser definidos en base a sus receptores y son habitualmente clasificados en tres grandes grupos: las neurotrofinas; las citoquinas neuropoyéticas (neuroquinas), que incluyen el CNTF y la interleucina-6 (IL6), y los factores de crecimiento de fibroblastos, como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Kandel *et al.*, 2000; Lundborg, 2000; Zochodne y Cheng, 2000; Zochodne, 2008). Hay otros muchos factores neurotróficos, tales como el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF)⁹, el factor de crecimiento epidérmico (EGF)¹⁰ y el factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF) (Lundborg, 2000; Zochodne y Cheng, 2000; Zochodne, 2008). Dentro de este grupo de factores de crecimiento de origen variado se encuentra la β -Neuregulina 1.

⁸ TAG-1 son las siglas inglesas de transient axonal glycoprotein 1.

⁹ IGF son las siglas inglesas de insulin-like growth factor.

¹⁰ EGF son las siglas inglesas de epidermal growth factor.

La influencia de los factores de crecimiento se ejerce mediante su unión a tipos particulares de receptores tirosina quinasa presentes en la superficie de las células de respuesta (Kandel *et al.*, 2000). Miembros de la familia de las neurotrofinas se unen a receptores tirosina quinasa de alta afinidad llamados trk y al receptor de NGF de baja afinidad llamado p75^{NTR} (Kaplan *et al.*, 1991a; Kaplan *et al.*, 1991b). La activación de un receptor viene seguida de una cascada de señalización intracelular y la consiguiente activación génica (Kandel *et al.*, 2000).

Neurotrofinas

En la familia de las neurotrofinas se incluyen el NGF, el BDNF, la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4/5, y la neurotrofina-6 (Lundborg, 2000).

Factor de crecimiento nervioso (NGF)¹¹

El NGF fue el primer factor neurotrófico identificado (Levi-Montalcini *et al.*, 1954). Se puede unir tanto al receptor p75^{NTR} como al trkA (Kaplan *et al.*, 1991a). El NGF está presente en una concentración baja en los nervios normales y sanos. (Kingham y Terenghi, 2006). Tan sólo las células con receptores de alta afinidad por el NGF (receptores trkA) pueden responder al NGF. Las motoneuronas contienen transcritos de genes de los receptores trkB y trkC, pero no del trkA, así que es de esperar que el NGF ejerza poca influencia o ninguna sobre ellas y el crecimiento de sus neuritas (Lundborg, 2000).

Factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)¹²

El BDNF fue el segundo miembro de la familia de las neurotrofinas que se identificó (Leibrock *et al.*, 1989). Comparte el 54% de su secuencia con el NGF y tiene una amplia variedad de funciones en el sistema nervioso. Los efectos del BDNF están mediados principalmente por el receptor tirosina quinasa trk-B. La autofosforilación del receptor le capacita para unirse y fosforilar a proteínas que afectan al crecimiento y diferenciación de las células. El BDNF se expresa en el músculo esquelético y es un factor trófico importante para las motoneuronas. Induce la expresión de genes colinérgicos y facilita la supervivencia celular en cultivo (Henderson *et al.*, 1993; Kingham y Terenghi, 2006).

¹¹ NGF son las siglas inglesas de nerve growth factor.

¹² BDNF son las siglas inglesas de brain-derived neurotrophic factor.

1. Introducción

Neurotrofina-3 y -4 (NT-3, NT-4)

Otras proteínas relacionadas con el NGF son las neurotrofinas, NT-3 y NT-4, cada una de las cuales presenta un patrón de unión por los receptores trk. La NT-3 actúa preferentemente a través del receptor trk-C y se expresa abundantemente en el sistema nervioso periférico, mientras la NT-4 se une al trk-B, que está presente en la mayoría de las motoneuronas. (Funakoshi *et al.*, 1993; Kingham y Terenghi, 2006).

Citoquinas neuropoyéticas

Factor neurotrófico ciliar (CNTF)¹³

El CNTF es una proteína neuroquina de 22 a 24 kDa que se expresa en todo el sistema nervioso central y periférico y también en el músculo esquelético. Se une a un receptor CNTF ligado a glicosil-fosfatidilinositol, que tiene un elevado grado de semejanza con la subunidad α del sistema del receptor de IL6. En el nervio periférico, el CNTF se expresa en grandes cantidades en las células de Schwann. El receptor CNTF se expresa en numerosos tipos de neuronas pero las motoras de los nervios craneales y las de los espinales son especialmente sensibles a la actuación del CNTF (Zochodne y Cheng, 2000; Zhang *et al.*, 2004; Kingham y Terenghi, 2006).

Factores de crecimiento fibroblástico

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Las células de Schwann producen FGF básico (bFGF), que se puede unir a los proteoglicanos de la lámina basal, como por ejemplo al heparán sulfato (Gospodarowicz *et al.*, 1987; Haynes, 1988; Walicke y Baird, 1988). Esta propiedad permite la acumulación del bFGF en la lámina basal de las células de Schwann (Ide, 1996).

Otros factores de crecimiento

Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)¹⁴

¹³ CNTF son las siglas inglesas de ciliary neurotrophic factor.

El GDNF y sus receptores correspondientes están relacionados lejanamente con la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)¹⁵. El GDNF favorece la supervivencia tanto de las motoneuronas como de las neuronas sensoriales y es abundante en el músculo esquelético. El GDNF estimula la migración de las células de Schwann, e indirectamente acelera la mielinización. Algunos experimentos recientes muestran que el GDNF activa numerosas proteínas kinasas y utiliza rutas de señalización de moléculas de adhesión celular para regular las funciones de la célula de Schwann antes de la mielinización (Yan *et al.*, 1999; Oppenheim *et al.*, 2000; Boyd y Gordon, 2003).

β-Neurregulina 1 (NRG1)

Las Neurregulinas (NRGs) son proteínas señalizadoras que intervienen en las interacciones célula-célula en el sistema nervioso, el corazón, las glándulas mamarias y otros órganos (Falls, 2003). Las primeras NRGs aisladas estaban codificadas por el mismo gen, que ahora se conoce como *NRG1*. Seguidamente a la identificación de este gen, se descubrieron otros tres genes que codificaban para proteínas relacionadas. Estas otras NRGs se denominaron NRG2, NRG3 y NRG4. Se conoce poco aun acerca de las funciones de las proteínas de NRG2, NRG3 y NRG4 (Falls, 2003). La familia de proteínas de la Neurregulina-1 presenta homologías con la familia del EGF y actúan a través de receptores tipo tirosina kinasa de la familia ErbB (Adlkofer y Lai, 2000).

La familia de la Neurregulina-1 se compone de más de 15 proteínas que se presentan tanto asociadas a membrana como secretadas (Nave y Salzer, 2006). Proviene de uno de los genes más grande que existen en los mamíferos, localizado en el cromosoma 8A3 del ratón y en el 8p11-22 del ser humano (Zhang *et al.*, 2006). Estas proteínas son generadas por splicing alternativo de los ARNm. Todas las isoformas de la NRG1 contienen un dominio de señalización similar a EGF¹⁶ (Falls, 2003).

Hay tres características estructurales que diferencian las isoformas y que determinan su función *in vivo* y sus propiedades biológicas (Falls, 2003):

- El tipo de dominio EGF-like (α o β)
- La secuencia N-terminal (tipo I, II o III)

¹⁴ GDNF son las siglas inglesas de glial cell line-derived neurotrophic factor.

¹⁵ TGF son las siglas inglesas de transforming growth factor.

¹⁶ Dominio EGF-like.

1. Introducción

- Su asociación a la membrana celular: si es una forma transmembranal o si es una proteína difusible.

Las isoformas α y β se diferencian únicamente en 6 u 8 aminoácidos del dominio EGF-like (Wen *et al.*, 1992). El dominio EGF-like presente en todas las isoformas bioactivas de NRG1 es suficiente por si mismo para activar los receptores tirosina kinasa ErbB (Falls, 2003).

También se subdividen en varios tipos según el grupo amino terminal que posean:

La NRG1 tipo I (también conocida como herregulina, factor de diferenciación neu (neu differentiation factor), o acetylcholine receptor-inducing activity (Citri *et al.*, 2003) y la NRG1 tipo II (que se conocía anteriormente como factor de crecimiento glial o GGF¹⁷) tienen dominios N-terminal semejantes a inmunoglobulina (Nave y Salzer, 2006). Las formas transmembranales de la NRG1 sufren una ruptura proteolítica por medio de metaloproteasas (Zhang *et al.*, 2006), incluyendo TACE¹⁸, ADAM10¹⁹ o BACE1²⁰ (Luo *et al.*, 2011). Como consecuencia, las NRG1 tipo I y II son desprendidas de la superficie de la neurona y funcionan como señales paracrinas. La NRG1 de tipo III presenta un dominio rico en cisteína (CRD)²¹ que funciona como un segundo dominio transmembranal. De esta manera la NRG1 tipo III permanece anclada a la superficie celular después de la ruptura proteolítica y su actuación es yuxtacrina. Las NRGs tipo I y tipo II son denominadas habitualmente como Ig-NRGs y las del tipo III como CRD-NRGs (Nave y Salzer, 2006). Además, han sido identificados exones que codifican para grupos amino-terminal más pequeños de NRG1 y formarían las NRG1 tipos IV a VI. Estas isoformas aun no han sido bien caracterizadas.

La expresión de NRG1 no es exclusiva del sistema nervioso. La NRG1 tiene un papel principal en el desarrollo de los tejidos cardíacos o de las glándulas mamarias, por ejemplo. Ratones que no presentan NRG1 o sus receptores (ErbB2, ErbB3 y ErbB4) mueren en estadíos embrionarios ya que la comunicación entre NRG1 y ErbB es esencial para el desarrollo del corazón (Adlkofer y Lai, 2000; Nave y Salzer, 2006).

¹⁷ GGF son las siglas inglesas de glial growth factor.

¹⁸ TACE son las siglas inglesas de tumor-necrosis factor- α -converting enzyme.

¹⁹ ADAM10 son las siglas inglesas de a disintegrin and metalloproteinase 10.

²⁰ BACE1 son las siglas inglesas de Alzheimer's β -secretase 1.

²¹ CRD son las siglas inglesas de cystein rich domain.

Entre las funciones de los diferentes tipos de NRG1 se incluyen: el desarrollo de las placas motoras terminales (NRG1 tipo I), la migración de las interneuronas (NRG1 tipo II), el inicio y control de la mielinización (NRG1 tipo III), la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central (Falls, 2003; Nave y Salzer, 2006). Durante el desarrollo embrionario de las células de Schwann existe una fase en la que son dependientes de la NRG1 derivada de los axones para su supervivencia y crecimiento. Esta fase coincide con la transición que sufren las células de la cresta neural hacia precursores de las células de Schwann (PCSs), y termina con la transición de los PCSs hacia células de Schwann maduras de fenotipo mielinizante o no mielinizante (Jessen y Mirsky, 2005).

Las isoformas α NRG1 y β NRG1 tienen funciones distintas en el sistema nervioso periférico. Por ejemplo, la β NRG1 actúa como un potente mitógeno sobre las células de Schwann neonatales de rata, mientras las formas α no son mitogénicas (Raabe *et al.*, 1996). Además, las β NRG1 favorecen la supervivencia de los precursores de las células de Schwann a E14 de vida embrionaria, mientras las isoformas α no tienen ningún efecto aparente (Dong *et al.*, 1995). Durante la vida postnatal, las proteínas NRG1 son indispensables para la supervivencia de las células de Schwann mielinizantes y premielinizantes (Grinspan *et al.*, 1996; Syroid *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001).

En el sistema nervioso las NRG1 tipos I y III son las formas más abundantes y se producen mayoritariamente en numerosas neuronas de proyección, especialmente en motoneuronas espinales y en neuronas de los ganglios raquídeos, pero también se produce, en determinadas circunstancias, en células giales (Raabe *et al.*, 1998; Raabe *et al.*, 2004). Cabe resaltar que en el sistema nervioso periférico, la NRG1 no tiene un origen exclusivamente neuronal. Las células de Schwann son capaces de sintetizar y liberar NRG1 (Raabe *et al.*, 1996; Rosenbaum *et al.*, 1997). Aunque la función de esta síntesis no está clara, podría estar involucrada en rutas de señalización autocrinas (Rosenbaum *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998).

Muchas neuronas que expresan NRG1 también expresan transcritos para NRG2 y NRG3, dos factores de crecimiento relacionados estructuralmente con dominios EGF-like. Su función en el sistema nervioso no se conoce (Falls, 2003).

Las isoformas de NRG1 ejercen su efecto uniéndose a receptores ErbB de la familia de los receptores PTKs, que a su vez pertenecen a la superfamilia de receptores EGF (Adlkofer y Lai, 2000). El nombre "ErbB" proviene del oncogen v-Erb-B, presente en el

1. Introducción

virus de la eritroblastosis aviar, que codifica una copia mutada del receptor de EGF (EGFR). Hay cuatro receptores ErbB: el EGFR(ErbB1/HER1), el ErbB2(neu/HER2), el ErbB3/HER3 y el ErbB4/HER4 (Adlkofer y Lai, 2000). La nomenclatura “HER” se refiere a “human epidermal growth factor” (“factor de crecimiento epidérmico humano”). En esta Tesis Doctoral se empleará la nomenclatura “ErbB”. La NRG1 se une tanto al receptor ErbB3, que no posee un dominio kinasa activo, como al ErbB4, que sí lo posee. Cada uno de ellos puede crear un heterodímero con el receptor ErbB2, el cual no puede unir NRG1 directamente pero que sí presenta un dominio kinasa activo (Atanasoski *et al.*, 2006). Los receptores ErbB dimerizan tras un cambio conformacional en el ectodominio de ErbB3 o de ErbB4 activado por un ligando. El receptor ErbB2 presenta constitutivamente un anillo de dimerización necesario para formar heterodímeros con receptores ErbB3 o ErbB4 activados por un ligando. La capacidad de ErbB2 de formar homodímeros es muy reducida y ErbB4 se expresa de manera mínima en las células de Schwann. Estos datos indican que el receptor preferente para NRG1 en las células de Schwann es un heterodímero ErbB2/ErbB3 (Jones *et al.*, 1999; Audisio *et al.*, 2008). Independientemente de los mecanismos de unión, todos los estudios indican que tanto ErbB2/ErbB3 como ErbB2/ErbB4 actúan como receptores de alta afinidad para la isoforma β de la NRG1 (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999). La unión de NRG1 induce la formación del heterodímero ErbB2/ErbB3, que conduce a la fosforilación cruzada del receptor, al reclutamiento de moléculas adaptadoras con grupos SH3 y a la activación de rutas de señalización intracelular. Mientras que las células de Schwann expresan principalmente ErbB2 y ErbB3, las células de estirpe oligodendrocítica expresan los tres receptores, además del EGFR (ErbB1), indicando una mayor complejidad a la hora de formar receptores ErbB heterodímeros y rutas de señalización intracelulares en estas células (Adlkofer y Lai, 2000).

La NRG1 puede actuar también bidireccionalmente. La unión de receptores ErbB a la NRG1 tipo III asociada a membrana, origina la ruptura proteolítica de la NRG1, desprendiendo su dominio citoplásmico C-terminal (CTD) de la membrana neuronal. El CTD rápidamente se trasloca hasta el núcleo de la neurona donde activa la transcripción y promueve la supervivencia celular (Bao *et al.*, 2003; Nave y Salzer, 2006).

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

1.2.1. El nervio periférico lesionado

Las lesiones de los nervios periféricos son comunes, incapacitantes y difíciles de tratar. El tipo de lesión experimentada por un tronco nervioso determina el grado de regeneración que se conseguirá (Lundborg, 1993; Zochodne, 2008). Existen distintas clasificaciones de las lesiones de los nervios (Tinel, 1918; Sunderland, 1951; Seddon, 1975; Sunderland, 1990), pero se hace necesario estandarizar los tipos de lesiones en la práctica clínica. La clasificación sirve como guía para la evaluación del pronóstico y para el tratamiento quirúrgico de la lesión.

La clasificación de Seddon (1975) es una de las más simples. Según Seddon, la lesión de nervio más leve se conoce como neurapraxia. Un trauma agudo en el nervio periférico conlleva la interrupción de la transmisión del impulso nervioso. La evaluación clínica revela déficits motores y sensitivos en la región inervada por el nervio lesionado. Se puede apreciar una funcionalidad parcial y no hay atrofia muscular neurogénica. La observación histológica del tejido muestra tan sólo leves alteraciones morfológicas que son de naturaleza reversible. Se ha propuesto que esta clase de lesión se produce por una alteración microvascular que origina una isquemia transitoria. La recuperación se prolonga durante un tiempo variable, aunque suele estar completamente restaurada en los 21 días siguientes a la lesión (Sunderland, 1951; Lundborg, 1993). Este tiempo es mucho más rápido que el esperado para la regeneración después del proceso de degeneración walleriana.

Si se da una interrupción física de uno o más axones sin alteraciones en el tejido estromal, la lesión se define como axonotmesis. En este tipo de lesión, el axoplasma y las

1. Introducción

membranas celulares (axolema) están dañadas. Sin embargo, la célula de Schwann y los elementos del tejido conectivo permanecen intactos. La pérdida de función motora o sensitiva dependerá del número o del tipo de axones dañados (Sunderland, 1951). Después de 90 horas de la lesión no se registran potenciales de conducción eléctrica más allá del lugar de la lesión. La atrofia neurogénica del músculo esquelético es evidente. El examen de secciones histológicas muestra la degeneración del axoplasma asociada a estructuras distales al lugar de la lesión (Lundborg, 1993). En regiones proximales al sitio de la lesión, hay cambios degenerativos retrógrados en el axoplasma hasta una distancia equivalente a dos o tres nodos de Ranvier (Bradley *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Guertin *et al.*, 2005).

La neurotmesis se define como la sección total del tronco nervioso. Tanto la inervación motora como la sensitiva están interrumpidas. Se da la pérdida completa de función del nervio. Histológicamente, se observa la degeneración de todos los axones distalmente al sitio de la lesión (Lundborg, 1993). Los axones también muestran cambios degenerativos en los dos o tres nodos de Ranvier anteriores al sitio de la lesión (Bradley *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Guertin *et al.*, 2005). Exceptuando casos muy raros, la recuperación espontánea no sucede (Sunderland, 1951).

Los términos neurapraxia, axonotmesis y neurotmesis empleados por Seddon son equivalentes, respectivamente, a los de axonopraxia, axotomía y neurectomía, que emplearemos eventualmente en esta Tesis Doctoral.

La capacidad de un nervio dañado para la regeneración depende del grado de continuidad del tronco nervioso después de la lesión (Sunderland, 1951; Lundborg, 1993). En general, las lesiones neurapráxicas tienen una gran probabilidad de regeneración en comparación con las axonotmesis o las neurotmesis. La lámina basal y las células de Schwann permanecen intactas en las lesiones más leves, de manera que no hay una solución de continuidad en la lesión. El pronóstico es más favorable para lesiones de los grados más leves (Sunderland, 1951).

En el caso de la neurotmesis se da una retracción de ambos cabos debida al tejido elástico contenido en la envuelta epineural. En los extremos seccionados pueden aparecer hemorragias y coágulos. Se observa también una tumefacción intraneural debida a edema tisular (Sunderland, 1951). La reparación se prolonga durante varios meses y la recuperación funcional no suele ser satisfactoria. El proceso de regeneración es muy desorganizado y habitualmente da lugar a la formación de neuromas que producen un gran dolor neu-

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

ropático y dificultan el progreso de los axones (Lundborg, 2000). Además, los axones crecen en todas las direcciones e inervan fibras musculares que no les corresponden. Este fenómeno se conoce como sinkinesis y provoca movimientos descoordinados de los músculos (Kingham y Terenghi, 2006).

1.2.2. Procesos de degeneración

Después de la sección de un nervio periférico, la porción del axón distal al punto de lesión queda desconectada del soma neuronal y degenera. Tanto los axones como los cuerpos neuronales reaccionan de una forma característica (Sunderland, 1951; 1990). El soma de las neuronas axotomizadas sufre una serie de cambios fenotípicos, conocidos como reacción neuronal y cromatolisis. La reacción neuronal y la cromatolisis representan los cambios metabólicos necesarios para la regeneración y la elongación axonal, mientras que la degeneración walleriana crea en el cabo distal de la lesión un microambiente favorable para el crecimiento axonal de las neuronas supervivientes (Navarro *et al.*, 2007; Deumens *et al.*, 2010).

Cambios en el cuerpo celular de las neuronas y en el cabo proximal de la lesión

Las lesiones que se producen muy cerca de la médula espinal presentan un riesgo mayor de muerte neuronal ya que se pierde un gran segmento de axoplasma. Lesiones más distales, como las que se producen en la mano o en los dedos, presentan un grado de regeneración mucho mayor (Fine *et al.*, 2000). Los efectos de una lesión cercana al soma neuronal pueden sobrepasar la capacidad biosintética de la célula, causando el fracaso de la regeneración o la muerte celular (Ygge, 1989).

El éxito de la regeneración nerviosa y de la reinervación funcional de los órganos diana depende en primera instancia de la capacidad de las neuronas axotomizadas de sobrevivir y de transformarse a un fenotipo regenerativo (Lieberman, 1971; Fu y Gordon, 1997). Una de las secuelas que siguen a la sección de un nervio periférico es la muerte de un cierto número de neuronas axotomizadas. La proporción de muerte celular entre las neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos después de una lesión en el nervio ciático se estima entre un 10 y un 30%, afectando más a las neuronas de pequeño tamaño que a

1. Introducción

las grandes (Arvidsson *et al.*, 1986; Ygge, 1989; Vestergaard *et al.*, 1997; Tandrup *et al.*, 2000; Groves *et al.*, 2003). En relación con la muerte de las motoneuronas, se ha descrito una pérdida no significativa del 0 al 10% tras una lesión en el nervio ciático (Vanden Noven *et al.*, 1993; Lowrie *et al.*, 1994; Valero-Cabre *et al.*, 2004). Por el contrario, la avulsión o la transección de las raíces ventrales en el adulto, lleva a una muerte celular retrógrada del 50 al 80% de las motoneuronas en pocas semanas (Koliatsos *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1999; Hoang *et al.*, 2008). La muerte neuronal tras la axotomía depende de varios factores, tales como la edad, la gravedad de la lesión y, como ya hemos visto, la proximidad de la lesión al soma neuronal. Las neuronas del adulto son menos susceptibles de morir que las neuronas inmaduras (Lowrie *et al.*, 1994). La vacuolización neuronal y la muerte por apoptosis después de la lesión de un nervio experimentan, en ratas, un incremento progresivo durante el primer mes que después se reduce gradualmente durante un periodo de 6 meses (Groves *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 2007).

Si el cuerpo neuronal sobrevive inicialmente a la lesión, se hincha (Fine *et al.*, 2000). Esta hipertrofia es visible durante todo el proceso de regeneración, y se vuelve a alcanzar el tamaño normal cuando la recuperación se ha completado (Fu y Gordon, 1997). Los cambios morfológicos más aparentes en el cuerpo neuronal tras la axotomía son la dispersión de los cuerpos de Nissl, la excentricidad nuclear, el crecimiento nuclear y nucleolar, la turgencia celular y la retracción de las dendritas (Lieberman, 1971; Nacimiento *et al.*, 1995). La desaparición de los prominentes gránulos basofílicos de Nissl es muy evidente. Estos gránulos son acúmulos de ribosomas y bandas ordenadas de retículo endoplásmico rugoso que no vuelven a ser observados tras la axotomía, momento en el cual se desorganizan liberando polirribosomas y ribonucleótidos en el citoplasma. Las propiedades de tinción de los orgánulos intracitoplasmáticos cambian en respuesta a la lesión, y a este fenómeno se le denomina cromatolisis (Lieberman, 1971; Deumens *et al.*, 2010).

Además, se producen cambios destinados a retirar la mayor parte del aparato de síntesis de proteínas original por acción autofágica lisosómica. Inicialmente se da un incremento en el ARN citoplásmico que está parcialmente asociado al incremento de la síntesis de fosfatasa ácida lisosomal, lo que es seguido de la dispersión de los cuerpos de Nissl (Gordon *et al.*, 2003). La desorganización de los acúmulos de ribosomas está relacionada con el aumento de la síntesis de proteínas, sugiriendo que la cromatolisis representa los cambios morfológicos en el soma de la neurona lesionada asociado a una respuesta anabó-

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

lica (Lieberman, 1971; Fu y Gordon, 1997). Esta interpretación está apoyada por los cambios bioquímicos en las neuronas axotomizadas, que muestran un incremento de síntesis de ARN y un aumento en el contenido de proteínas de la célula (Watson, 1974). Los cambios bioquímicos se desarrollan en las primeras horas después de la axotomía, coincidiendo con los cambios tempranos de la cromatolisis. La concentración de enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, requeridas para la síntesis de ARN, también está aumentada (Harkonen y Kauffman, 1974), mientras que la producción de neurotransmisores y de proteínas del citoesqueleto disminuye (Frizell y Sjostrand, 1974; Hoffman y Lasek, 1980). Las neuronas axotomizadas cambian de un estado “transmisor” a un estado “regenerativo” (Richardson *et al.*, 2009), dirigidas por importantes cambios en la expresión génica, que lleva a disminuir la síntesis de productos relacionados con los neurotransmisores y a aumentar la síntesis de proteínas asociadas al crecimiento y a componentes estructurales de la membrana (Fu y Gordon, 1997; Richardson *et al.*, 2009).

Por otro lado, la cromatolisis se puede prolongar si después de la axotomía no hay regeneración (Guntinas-Lichius *et al.*, 1996). Se ha descrito una marcada cromatolisis en motoneuronas después de la avulsión de la raíz ventral, y eventualmente, algunas de ellas sufren apoptosis, sugiriendo que podría existir una continuidad en la respuesta neuronal después de la axotomía, comenzando por la cromatolisis y derivando bien en un proceso de supervivencia y regeneración o bien en la apoptosis de las neuronas (Martin *et al.*, 1999; Ricart *et al.*, 2006). La transición entre cromatolisis y apoptosis coincide con la acumulación de mitocondrias metabólicamente activas en la región perinuclear, produciendo un daño oxidativo a los ácidos nucleicos y a las proteínas en las neuronas axotomizadas (Martin *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando los axones son capaces de regenerar y reinervar sus dianas, las neuronas vuelven lentamente a recuperar una función y una morfología normales (Richardson *et al.*, 2009; Deumens *et al.*, 2010). De esta manera, las motoneuronas espinales que regeneran sus axones muestran una distribución y unas propiedades morfológicas normales 5 meses tras un aplastamiento del nervio ciático en la rata. Sin embargo, a los 10 ó 12 meses estas motoneuronas pueden mostrar alteraciones morfológicas, tales como un agrandamiento del cuerpo celular, un engrosamiento de las dendritas y un agrupamiento en el asta ventral, si lo comparamos con el lado contralateral (Bowe *et al.*, 1992). Esas alteraciones parecen deberse a cambios retardados y progresivos en las neuronas que reinervan sus dianas periféricas eficazmente.

1. Introducción

En las neuronas sensitivas, la lesión axonal lleva a cambios adicionales en la expresión de neuropéptidos y de citoquinas (Stoll y Muller, 1999; Donnerer, 2003). Así, el ARNm de IL6 y su proteína aparecen en el primer día en las neuronas ganglionares grandes y de mediano tamaño, y tienen una expresión máxima después de 2 ó 4 días. Disminuye por debajo del umbral de la detección en una semana. Además, hay una sobreexpresión de los ARNm de IL1 β y TNF α ²² (Ruohonen *et al.*, 2005). Hay evidencias de que la citoquina LIF²³ está involucrada en el desencadenamiento de parte de la reacción del cuerpo celular en las neuronas sensitivas. Además, el daño axonal induce una marcada sobreexpresión de la sintasa del óxido nítrico en las neuronas sensitivas primarias (Thippeswamy *et al.*, 2001; Keilhoff *et al.*, 2003).

Las motoneuronas axotomizadas responden incrementando los niveles de ARNm y proteína del receptor de NGF, así como del ARNm del trkB, que es el receptor de BDNF y de NT-4. El incremento es máximo en el tercer día y vuelve a los valores normales alrededor de la tercera semana (Funakoshi *et al.*, 1993; Boyd y Gordon, 2001). Otros cambios incluyen modificaciones de la expresión del receptor de glutamato y un incremento transitorio de la inmunorreactividad a CGRP²⁴ (Verdú y Navarro, 1997; Stoll y Muller, 1999).

En el extremo proximal del nervio seccionado se da un fenómeno degenerativo similar a una degeneración walleriana (Yudin *et al.*, 2008). La extensión de la degeneración en el cabo proximal está relacionada con la etiología de la lesión. En cualquiera de los casos tiene lugar una degeneración neurofibrilar en las primeras 24 – 72 horas (Beirowski *et al.*, 2005). Esta degeneración progresa una distancia de uno a tres nodos de Ranvier. Hay una rápida pérdida de componentes axoplásmicos (Raff *et al.*, 2002). La vaina de mielina comienza a perder su apariencia laminar y forma un tejido granular homogéneo alrededor de los axoplasmas degenerados. Estas estructuras huecas son conocidas como cámaras de digestión o bolas de degeneración (Chen *et al.*, 2005). Los macrófagos infiltrados comienzan a digerir y a retirar la mielina degenerada del tejido nervioso dañado. Las células de Schwann responden proliferando y formando densos cordones de células a lo largo del eje del espacio que ocupaba el axoplasma degenerado (Zochodne y Cheng, 2000; Cheng y Zochodne, 2002). Estos cordones poseen propiedades fagocíticas e ingieren restos de axones degenerados, fragmentos de mielina y otros residuos celulares (Fernandez-Valle *et*

²² TNF α son las siglas inglesas de tumor necrosis factor α .

²³ LIF son las siglas inglesas de leukemia inhibitor factor.

²⁴ CGRP son las siglas inglesas de calcitonin gene-related peptide.

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

al., 1995; Hirata y Kawabuchi, 2002). Las células mesenquimales proliferan en respuesta al proceso de inflamación e inician la producción y deposición de colágeno en el extremo del cabo proximal. Esto, junto con la fibrina remanente de la hemorragia inicial, puede llevar a la formación de un neuroma, un denso ovillo de axones, que puede ocasionar fuerte dolor neuropático (Zochodne, 2008).

Cambios en el cabo distal de la lesión: Degeneración walleriana

En el extremo distal de la lesión se da un proceso degenerativo conocido como degeneración walleriana, descrito originalmente por August Waller en 1850. Los primeros signos de degeneración se observan en 24 horas tras la lesión del nervio y se prolongan durante una o dos semanas siguiendo una progresión proximal-distal (Beirowski *et al.*, 2005). Comienza con la desintegración y la fragmentación del axoplasma y el axolema, que se completa a las 24 horas en nervios pequeños y a las 48 horas en nervios más grandes (Stoll *et al.*, 1989). La degeneración del axón está mediada por el incremento de Ca^{2+} y la activación de proteasas axonales (Schlaepfer y Bunge, 1973; George *et al.*, 1995). Es un proceso intrínseco que guarda semejanzas con el fenómeno de la apoptosis (Deckwerth y Johnson, 1994; Buckmaster *et al.*, 1995; Raff *et al.*, 2002).

Cuando las células de Schwann mielinizantes pierden el contacto axonal se desdiferencian y adquieren un fenotipo de célula premielinizante (inmadura) o de célula no mielinizante (Stoll y Muller, 1999). Expresan el receptor $p75^{NTR}$, la proteína GFAP, el factor β de maduración glial y las moléculas de adhesión celular L1 y NCAM (Mirnics *et al.*, 2005). Los factores de transcripción Pax3, SKI, c-jun y Krox-20 están involucrados en la regulación de la desdiferenciación y rediferenciación de la célula de Schwann (Jessen y Mirsky, 1992). Las células de Schwann denervadas vuelven a expresar altos niveles de Pax3 y c-jun, pero disminuyen la expresión de Krox-20. Pax3 se expresa en células de Schwann embrionarias y en células de Schwann no mielinizantes, pero es escaso en las células de Schwann mielinizantes. En los dos primeros días después de la lesión, las células de Schwann mielinizantes también disminuyen los niveles normales de ARNm de componentes de MBP, de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG)²⁵, de la proteína P0, de la proteína mielínica periférica-22 (PMP-22) y de la periaxina (Stoll y Muller, 1999; Kury *et al.*, 2001).

²⁵ MAG son las siglas inglesas de myelin associated glycoprotein.

1. Introducción

La activación del receptor tirosina kinasa erbB2 en las células de Schwann se ha relacionado con la fragmentación de sus propias vainas de mielina (Guertin *et al.*, 2005). Durante los dos primeros días tras la lesión fagocitan pequeños ovillos de mielina y forman gotitas de lípidos hasta que los macrófagos penetran en los nervios degenerados (Stoll *et al.*, 1989; Fernandez-Valle *et al.*, 1995; Hirata y Kawabuchi, 2002). Desde el segundo día, y más notablemente entre el cuarto y el séptimo, los macrófagos hematógenos penetran en el cabo distal y migran hacia los residuos de mielina (Bruck *et al.*, 1995; Stoll y Muller, 1999). Los macrófagos hematógenos son la principal vía para la eliminación de residuos de mielina y de axones (Tanaka *et al.*, 1992). Los macrófagos son atraídos hacia el nervio en degeneración por citoquinas secretadas por las células de Schwann reactivas, tales como la proteína quimioatrayente de monocitos-1, el factor LIF y la interleucina 1 (Tofaris *et al.*, 2002). El reclutamiento de los macrófagos lleva a una rápida eliminación de los residuos de mielina, que contienen inhibidores del crecimiento axonal como la glicoproteína asociada a la mielina (Bruck *et al.*, 1995; Bruck, 1997), y de este modo se facilita la regeneración nerviosa (Stoll *et al.*, 2002).

En la degeneración walleriana los niveles de transcritos y proteínas para citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias están muy aumentados. La inducción de las citoquinas sucede en ausencia de inflamación mediada por células T (Ahmed *et al.*, 2005; Ruohonen *et al.*, 2005). En las primeras 24 horas después de la lesión, los niveles de ARNm de la IL1 β se incrementan y se mantienen en altos valores durante la primera semana. Se ha comprobado que la IL1 induce la síntesis de NGF en las células de Schwann. Simultáneamente a la inducción de IL1, elevados niveles de ARNm de IL6 y de IL10 y sus proteínas, son detectables el día siguiente de la lesión del nervio (George *et al.*, 2004). Las células de Schwann expresan ARNm de IL10. La proteína IL6 ha sido localizada tanto en células de Schwann como en fibroblastos y macrófagos (Reichert *et al.*, 1996). Con un retraso de unos días respecto a la lesión, hay una inducción significativa de ARNm para las citoquinas proinflamatorias IFN γ y IL12 (Eccleston *et al.*, 1989). La máxima expresión de ARNm de IL12 se localiza entre los días 7 y 14, cuando el proceso de fagocitosis de la mielina por los macrófagos es más intenso. Las células de Schwann expresan TNF en condiciones normales pero tras una lesión, los macrófagos infiltrados expresan gran cantidad de TNF α , que es el responsable de dolor neuropático durante la degeneración walleriana (Ruohonen *et al.*, 2005). En el citoplasma de las células de Schwann de los nervios ciáticos normales de animales adultos se expresan TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3.

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

La axotomía incrementa los niveles de ARNm de TGF β 1, mientras que disminuyen los de TGF β 3 (Eccleston *et al.*, 1989; Einheber *et al.*, 1995; Ribeiro-Resende *et al.*, 2009). Estos datos muestran que hay una inducción significativa de citoquinas que ocurre en el nervio periférico a pesar de la ausencia de respuesta de los linfocitos T.

Durante la degeneración walleriana las células de Schwann se dividen estimuladas por la pérdida del contacto axonal, probablemente a través de proteínas liberadas por los axones en desintegración (Karanth *et al.*, 2006), y más tarde por citoquinas secretadas por los macrófagos (Navarro *et al.*, 2007). Las células de Schwann se dividen rápidamente durante las siguientes 2 ó 3 semanas, llegando a triplicarse su número (Salonen *et al.*, 1988). Esto puede deberse en parte a la aparición a los tres días de NRG1, relacionada con la proliferación y supervivencia de las células de Schwann por medio de circuitos auto-crinos (Carroll *et al.*, 1997).

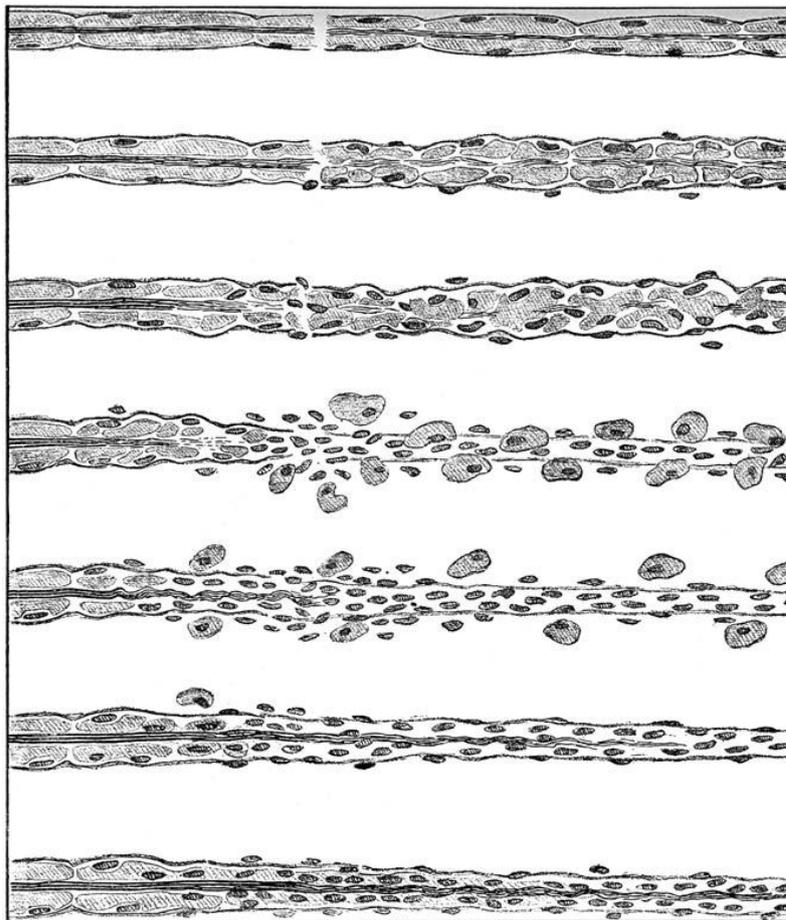


Ilustración de la secuencia de eventos de la degeneración walleriana y de las etapas iniciales de la regeneración en una fibra mielínica aislada. Reproducida a partir de la monografía clásica de Tinel (Tinel, 1918).

1. Introducción

Las células de Schwann que han proliferado se organizan en columnas ordenadas denominadas bandas de Büngner o tubos endoneurales (Yang *et al.*, 2008). Las columnas de células de Schwann en el cabo distal presentan un alto grado de alineamiento y se piensa que esta propiedad topográfica es importante para la dirección del crecimiento axonal (Thompson y Buettner, 2004; 2006). Además, proporcionan un sustrato óptimo para la adhesión del cono de crecimiento y para la elongación axonal (McKerracher *et al.*, 1996).

1.2.3. Procesos de regeneración

En cuestión de horas después del daño axonal, la bioactividad en el cabo distal, así como los niveles de ARNm del NGF aumentan drásticamente y presentan un segundo pico de expresión a los 2 ó 3 días de la lesión (Griffin y Letourneau, 1980; Zochodne y Cheng, 2000). Además, hay un continuo y lento aumento de ARNm del BDNF que empieza a los 3 días postlesión y que alcanza su máximo nivel alrededor de la tercera o cuarta semana (Funakoshi *et al.*, 1993). Al contrario que con las neurotrofinas, la expresión de CNTF requiere que las interacciones entre la célula de Schwann y el axón estén intactas. Sus niveles de ARNm y de proteína se reducen en la degeneración walleriana (Zochodne y Cheng, 2000; Zhang *et al.*, 2004). La célula de Schwann produce NGF y BDNF tras la lesión del nervio. Los cambios en la expresión de neurotrofinas están acompañados por el aumento de los correspondientes receptores (DiStefano *et al.*, 1992; Funakoshi *et al.*, 1993; Boyd y Gordon, 2001). El factor de crecimiento IGF1 es otro factor neurotrófico producido por la célula de Schwann en las primeras etapas de la degeneración Walleriana (Syroid *et al.*, 1999; Pellitteri *et al.*, 2006). Las células de Schwann también expresan el receptor correspondiente. Después del día 7 postlesión, los macrófagos infiltrantes se convierten en la principal fuente de IGF1 del cabo distal, sugiriendo que las células inflamatorias también colaboran en el aporte neurotrófico (Kanje *et al.*, 1989; Sjoberg y Kanje, 1989; Fansa *et al.*, 2002).

En el cabo proximal la proteína asociada al crecimiento (GAP43)²⁶ y la proteína de filamentos intermedios periferina están sobreexpresadas desde el primer día después de la lesión axonal y están involucradas en la elongación axonal. Los tres genes de los neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H) se presentan reprimidos (Hoffman y Lasek, 1980; Hoffman *et al.*, 1983), mientras que el ARNm de las tubulinas β de tipo II y III y sus pro-

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

teínas correspondientes son mucho más numerosos tras la axotomía (McQuarrie y Lasek, 1989; Stoll y Muller, 1999).

Al inicio de la regeneración, varias ramificaciones emergen de cada axón. La ramificación de los axones siempre ocurre a nivel de los nodos de Ranvier (Witzel *et al.*, 2005). Estas ramas podrían avanzar hacia el cabo distal; de esta manera, el número total de axones en el segmento distal podría exceder el número de axones originales del cabo proximal durante bastante tiempo (Jenq *et al.*, 1988). En el extremo de los axones en regeneración aparecen los conos de crecimiento. Los conos de crecimiento son evaginaciones móviles de los axones seccionados que se aplanan y se dispersan cuando encuentran un medio adecuado. Emergen desde los axones seccionados estimulados por factores locales (Kato e Ide, 1994), y emiten numerosas proyecciones citoplasmáticas (filopodios) que se extienden en todas las direcciones hasta que una de ellas encuentra un sustrato favorable. La primera ramificación que lo encuentre tendrá mayor probabilidad de estabilizarse y sobrevivir. Las demás se retraerán en un proceso de degeneración (Fine *et al.*, 2000; Zochodne, 2008).

En ausencia de una estructura que sirva de guía, como el cabo distal, los axones en regeneración siguen una ruta tortuosa y pueden formar un neuroma, compuesto por ramificaciones axonales inmaduras y tejido conjuntivo (Swaim, 1972; Okuda *et al.*, 2006). Si los axones en regeneración llegan al cabo distal, crecen a lo largo de los tubos endoneurales formados por las células de Schwann y la lámina basal, constituyendo unidades de regeneración (Zochodne, 2008). Los materiales para el crecimiento del axón son proporcionados principalmente por el soma neuronal mediante transporte axonal (Hoffman y Lasek, 1980; McQuarrie y Lasek, 1989), aunque se ha descrito una síntesis local en el axón, así como procesos de degradación de proteínas (Verma *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005; Willis y Twiss, 2006). La velocidad de la regeneración axonal es muy lenta al principio y alcanza un valor estable a los 3 ó 4 días de la lesión con alrededor de 1 a 3 mm por día (Fu y Gordon, 1997; Lundborg, 2004). Los factores que estimulan y controlan la regeneración axonal provienen de múltiples fuentes, pero la influencia más importante deriva del entorno local de la lesión. El crecimiento axonal requiere un sustrato adecuado de factores tróficos y tróficos proporcionados por las células de Schwann reactivas y por la matriz extracelular en el cabo nervioso degenerado (Verdú y Navarro, 1997).

²⁶ GAP43 son las siglas inglesas de growth associated protein 43.

1. Introducción

Los fenómenos de proliferación y migración de las células de Schwann pretenden conectar el cabo proximal con los elementos del cabo distal. Las células de Schwann tratan de crecer a la vez que el axoplasma, de esta manera proporcionan un almacén para la regeneración axonal (Cheng y Zochodne, 2002; Corfas *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

A medida que el crecimiento del axón progresa hacia el cabo distal, tiene lugar la mielinización por parte de las células de Schwann (Zochodne, 2008). Los lípidos derivados de la degradación de la mielina durante la degeneración walleriana se reutilizan para la regeneración y la remielinización. Las apolipoproteínas D y E (ApoD y ApoE) son proteínas ligantes de lípidos que se acumulan en el cabo distal después de la axotomía (Boyles *et al.*, 1990; Ganfornina *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). ApoE es producida por los macrófagos infiltrados mientras que ApoD es expresada por los fibroblastos endoneurales y por células gliales del nervio periférico (Ganfornina *et al.*, 2010). Las lipoproteínas son asimiladas por los conos de crecimiento de los axones y por las células de Schwann (Stoll y Muller, 1999). La presencia de vainas de mielina es notable 6 ó 7 días después de que el frente de regeneración haya llegado a un lugar determinado. Los nodos de Ranvier aparecen alrededor del día 14 en los procesos regenerativos. La deposición de mielina se prolonga hasta un periodo de un año después del proceso de reparación (Zochodne, 2008).

Cuando los axones alcanzan dianas sinápticas en el tejido periférico, las ramificaciones axonales supranumerarias son eliminadas gradualmente. Las fibras nerviosas que regeneran a través de canales erróneos en el segmento distal del nervio hacia dianas que no les corresponden, tales como axones motores hacia la piel, son eliminadas (Brushart, 1993; Brushart *et al.*, 1998). El significado biológico de la regeneración es reemplazar el segmento distal del nervio perdido durante la degeneración y reinervar los tejidos diana. Sin embargo, lo más común es que los procesos regenerativos no reconstituyan una estructura nerviosa normal ni consigan una recuperación funcional satisfactoria, especialmente cuando la lesión es severa (Jaquet *et al.*, 2001; Guntinas-Lichius *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005). Después de un proceso de lesión de un nervio y su reparación, el diámetro de los axones regenerados, su velocidad de conducción y su excitabilidad, permanecen por debajo de los niveles normales durante largos periodos de tiempo (Fields y Ellisman, 1986), y consecuentemente, la recuperación de los órganos reinervados es incompleta y a menudo inadecuada (Ijkema-Paassen *et al.*, 2001). La limitación de la regeneración nerviosa es mayor cuando la lesión crea una discontinuidad en el nervio, y la

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

regeneración es menor cuanto mayor es el espacio entre los cabos seccionados, tanto cuando se deja el nervio sin reparar como después de una reparación quirúrgica (Butí *et al.*, 1996; Krarup *et al.*, 2002).

Factores de crecimiento en el nervio durante el proceso de regeneración

La supervivencia de los cuerpos celulares de las neuronas después de la axotomía es requisito previo para la regeneración de sus axones y está facilitada por una colección de factores neurotróficos de variadas procedencias (Lundborg, 2000). Asimismo, el enriquecimiento trófico en el cabo distal seccionado facilita la regeneración de las fibras nerviosas lesionadas (Ramón y Cajal, 1928; David y Aguayo, 1981; Fawcett y Keynes, 1990).

Factor de crecimiento nervioso (NGF)

La expresión de NGF aumenta rápidamente tras una lesión. Se ha observado que las células satélite de los ganglios raquídeos aumentan los niveles de NGF después de una axotomía, lo que induce a la ramificación de los axones después de la lesión (Zochodne y Cheng, 2000; Kingham y Terenghi, 2006; Navarro *et al.*, 2007). Las células de Schwann del área lesionada también pueden aumentar los niveles de NGF rápidamente, posiblemente para compensar la pérdida de aporte desde el mismo nervio. El papel del NGF en la recuperación de la función de las motoneuronas puede ser limitado, ya que estas células no presentan el receptor de alta afinidad *trkA* en sus membranas. Estudios *in vitro* en neuronas aisladas han demostrado un efecto muy reducido en la producción de neuritas en respuesta a NGF (Boyd y Gordon, 2001). Los niveles del receptor de baja afinidad de NGF $p75^{NTR}$ se incrementan en los somas y los axones de las motoneuronas, así como en las células de Schwann, durante la degeneración walleriana (Boyd y Gordon, 2001; Hirata *et al.*, 2001). Usando dos modelos diferentes de lesión de motoneuronas en ratones mutantes $p75^{NTR-/-}$ se ha demostrado, sin embargo, que este incremento en la expresión de $p75^{NTR}$ no es necesario para la supervivencia de las motoneuronas, y en cambio sí parece aumentar la sensibilidad a la muerte celular (Ferri y Bisby, 1999; Boyd y Gordon, 2001).

En el extremo distal de la lesión, la expresión de ARNm de neurotrofinas después de la sección de un nervio periférico está regulada diferencialmente. El NGF es detectable tan sólo 6 horas después de la lesión y sus niveles se incrementan hasta llegar a un máximo a las dos semanas (Funakoshi *et al.*, 1993).

1. Introducción

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Los ganglios raquídeos presentan altos niveles de BDNF después de una axotomía, lo que puede inducir localmente una proliferación de los retoños de los axones como en el caso del NGF, o puede ser transportado en sentido anterógrado para aumentar su concentración en el extremo proximal de la lesión. La expresión de trkB es crucial para la regeneración axonal y los altos niveles hallados después de una axotomía hacen pensar en una función protectora en respuesta a la lesión (Funakoshi *et al.*, 1993; Boyd y Gordon, 2001). Además, parece ser que la sobreproducción de BDNF y trkB puede provocar cambios en la expresión de otros genes relacionados con la regeneración (Funakoshi *et al.*, 1993; Boyd y Gordon, 2002; Kingham y Terenghi, 2006).

Numerosos estudios *in vivo* demuestran su participación en la regeneración nerviosa. El nivel de BDNF aumenta en las células de Schwann denervadas entre los 7 y los 14 días postlesión (Funakoshi *et al.*, 1993). Estos niveles contrastan con la situación en el nervio sano, en la que los niveles de BDNF son imperceptibles (Funakoshi *et al.*, 1993). Si se neutraliza el BDNF utilizando anticuerpos bloqueantes se observa que este incremento endógeno es necesario para la adecuada regeneración y mielinización del nervio ciático.

Neurotrofina-3 y -4 (NT-3, NT-4)

La NT-4 es necesaria para iniciar el crecimiento de los axones en regeneración. Alo-trasplantes de animales knockout para la NT-4 producen una elongación axonal significativamente menor que en los animales de fenotipo silvestre (Zochodne y Cheng, 2000).

Se han estudiado las variaciones de la expresión de neurotrofinas en el nervio periférico después de diferentes tipos de lesiones. Los niveles de ARNm de NT-3 en el nervio ciático disminuyen notablemente tras una lesión por transección pero no por una contusión o pinzamiento (Kingham y Terenghi, 2006). Después, en el caso de la sección, los niveles de NT-3 aumentan de nuevo hasta los niveles del nervio normal a las dos semanas (Funakoshi *et al.*, 1993). La cantidad de ARNm de NT-4 también disminuye considerablemente en los primeros días tras una neurotmesis (Funakoshi *et al.*, 1993). Los niveles de ambas proteínas aumentan de una manera importante después de todos los tipos de lesiones. Este incremento de producción de proteínas parece responder a la invasión de la zona lesionada por parte de células inflamatorias. Así, las grandes concentraciones de NT-3 parecen estar relacionadas con la extensión de la infiltración macrofágica más que con

1.2. Lesión y regeneración del nervio periférico

el grado de daño axonal (Ahmed *et al.*, 2005). Además, al contrario que el transporte anterógrado de BDNF después de una lesión, la NT-3 se sobreexpresa temporalmente en el cabo proximal y desde allí es transportada al soma neuronal (DiStefano *et al.*, 1992).

Factor neurotrófico ciliar (CNTF)

Disminuye tras la lesión. Esta disminución se lleva a cabo a través de la ruta de señalización de ERK (kinasa Ras regulada por señales extracelulares). El receptor de CNTF se expresa en las motoneuronas espinales (Zochodne y Cheng, 2000). Estas neuronas exhiben un rápido y potente incremento en fosfo-STAT3 en sus dendritas, somas y núcleos después de ser estimuladas con CNTF. La activación de STAT3 por liberación de CNTF es una señal retrógrada temprana en motoneuronas axotomizadas. De este modo, la sobreexpresión del receptor CNTF tras una lesión parece ser una respuesta de protección (Zhang *et al.*, 2004). Los ratones knockout para CNTF no tienen capacidad de recuperación después de una lesión de pinzamiento en el nervio ciático (Kingham y Terenghi, 2006).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF básico (bFGF) tiene efectos tróficos sobre el crecimiento y la regeneración de los axones en el sistema nervioso periférico (Laquerriere *et al.*, 1994). Las células de Schwann producen bFGF, que se puede unir a los proteoglicanos de la lámina basal como el heparán sulfato (Gospodarowicz *et al.*, 1987; Haynes, 1988; Walicke y Baird, 1988). Esta propiedad permite la condensación del bFGF en la lámina basal de las células de Schwann, haciendo que el bFGF esté rápidamente disponible para los axones en regeneración que están directamente en contacto con la lámina basal (Ide, 1996). El bFGF estimula el crecimiento de los axones en regeneración en la situación experimental en la que se usan trasplantes de segmentos de nervio en los cuales se han eliminado todos los elementos celulares (Fujimoto *et al.*, 1997).

Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)

Una lesión en el nervio ciático de una rata adulta provoca un rápido incremento del ARNm de GDNF en las células de Schwann del área dañada. También se da una regulación diferencial de los receptores de GDNF en los somas de las neuronas sensoriales. Los receptores GDNF- α y c-ret también aumentan en el núcleo facial tras la sección de los

1. Introducción

axones de las neuronas motoras (Oppenheim *et al.*, 2000). El GDNF estimula la migración de las células de Schwann, e indirectamente acelera la mielinización (Oppenheim *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1999; Oppenheim *et al.*, 2000). Las células de Schwann denervadas crónicamente tienen una expresión baja de GDNF; esto se relaciona con incapacidad en la regeneración (Boyd y Gordon, 2003).

β-Neurregulina 1

El proceso de desdiferenciación y proliferación de las células de Schwann es un requisito previo para la regeneración de los axones después de una lesión. El ARNm de la NRG1 aparece en el nervio periférico 3 días después de la axotomía y este hecho coincide con la síntesis de ADN en las células de Schwann (Carroll *et al.*, 1997). La expresión de los receptores de Neurregulina ErbB2 y ErbB3 aumenta también rápidamente, alcanzando un máximo entre los 5 y los 7 días después de la lesión (Carroll *et al.*, 1997; Adlkofer y Lai, 2000; Kingham y Terenghi, 2006). A partir del quinto día se observan los receptores ErbB2 activados en células de Schwann del cabo distal seccionado (Kwon *et al.*, 1997).

Se ha descrito que las células de Schwann mantenidas *in vitro* son capaces de producir y secretar polipéptidos de 42, 60 y 80 kDa correspondientes a formas inmaduras de proNRGs (Raabe *et al.*, 1998). Durante la degeneración walleriana, la NRG1 producida por las células de Schwann es una de las señales que activan la proliferación de las células de Schwann en ausencia del estímulo de los axones (Carroll *et al.*, 1997). Además de actuar como mitógeno, la NRG1 derivada de las células gliales podría actuar como factor de supervivencia evitando la apoptosis (Grinspan *et al.*, 1996; Syroid *et al.*, 1996; Trachtenberg y Thompson, 1996). Este hecho sustenta la hipótesis de que las células de Schwann tienen un circuito autocrino de supervivencia basado en la NRG1 (Carroll *et al.*, 1997). Además, la NRG1 liberada por las células de Schwann parece estar involucrada en la acumulación de canales de Na⁺ en los nodos de Ranvier de los axones en regeneración (Novakovic *et al.*, 1996).

Otros factores tróficos involucrados en la regeneración nerviosa del sistema nervioso periférico son, por ejemplo, el IGF (Glazner *et al.*, 1993; Edbladh *et al.*, 1994) o el factor de crecimiento derivado de los hepatocitos (Horie *et al.*, 1991).

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

1.3.1. Estrategias de reparación

El método más utilizado para solucionar lesiones producidas por la sección de un nervio es la coaptación quirúrgica de los dos cabos, siempre que el espacio entre ellos sea pequeño (Bellamkonda, 2006). Cuando la distancia entre los cabos es grande (más de 20 mm en humanos), la técnica estándar de reparación es el trasplante autólogo de segmentos de nervio sensitivo (Nichols *et al.*, 2004).

Sutura

La clase más simple de reparación quirúrgica desde un punto de vista técnico es la reparación cabo a cabo (end-to-end). En este método quirúrgico, todo el tronco nervioso es suturado como una unidad mediante la aplicación de suturas en el epineuro o por la aplicación de una única sutura a través del eje central del tronco nervioso dañado. La técnica más común, la neurorrafia, consiste en la aplicación de una serie de suturas simples a través del epineuro (Millesi, 1984; McQuarrie, 1985). Con el progreso de las técnicas microquirúrgicas, se consiguió la reparación por sutura de cada una de las subunidades del nervio periférico. Se colocan una o dos suturas de 10-0 en el perineuro para unir fascículos individuales (Millesi *et al.*, 1972; Haase *et al.*, 1980; Harris, 1980). Este tipo de reparación quirúrgica permite la anastomosis definitiva de los fascículos y elimina la posibilidad de crecimiento centrífugo aberrante que puede ocurrir con la sutura epineural. La reparación fascicular puede ser combinada con la sutura epineural para reforzar la línea de

1. Introducción

sutura en el lugar de la lesión. Un dato interesante es que la reparación perineural no resulta significativamente mejor que la epineural (Deumens *et al.*, 2010).

Sin embargo, la técnica ideal en la reparación del nervio es aquella en la que no se utilicen suturas. Todas las suturas provocan reacciones inflamatorias y formación de tejido cicatricial localmente, que pueden llevar a la producción excesiva de tejido de granulación e impedir el progreso de los axones (Fine *et al.*, 2000; Zochodne, 2008). Algunas estrategias alternativas incluyen la utilización de pegamento de fibrina (Sunderland, 1990; Suri *et al.*, 2002) para reparar secciones de troncos nerviosos. La mayor desventaja de estas prácticas es la dificultad técnica y la escasa fuerza de cohesión en el lugar de la sección, que es la zona de máxima tensión (Fine *et al.*, 2000). Se han probado también cementos de cianocrilato pero se observó una gran reacción del tejido y daño en elementos neurales que desaconsejaban su uso clínico (Elgazzar *et al.*, 2007; Landegren *et al.*, 2010).

En grandes lesiones, la pérdida de tejido nervioso puede ocasionar la aparición de un espacio entre los dos cabos seccionados. Los cabos nerviosos se pueden estirar hasta un límite para intentar su aproximación (Lee y Wolfe, 2000; Hara *et al.*, 2004). Cualquier grado de estiramiento disminuye la tasa de éxito de la reparación del nervio. Generalmente no se puede estirar un nervio para cubrir un espacio de 2 ó 3 cm. Este estiramiento daña la vascularización externa del nervio y predispone a un fallo de la reparación debido a una excesiva tensión en el sitio de la sutura (Abe *et al.*, 1996). En estudios experimentales se ha demostrado que la regeneración nerviosa a través de líneas de sutura en tensión es menor que en condiciones normales (Sunderland *et al.*, 2004). De esta manera, es necesario buscar métodos alternativos para cubrir este espacio. Al igual que con otros órganos, los nervios periféricos también son susceptibles de ser trasplantados. Una de las primeras aproximaciones a la reparación de un nervio seccionado utilizando segmentos de nervio autólogo fue desarrollada por Albert (1885). Desde entonces, y sobre todo a raíz de los avances en microcirugía en la segunda mitad del siglo XX, el trasplante de segmentos de nervio autólogo se ha implantado como la técnica de referencia (“gold standard”) para la reparación de lesiones nerviosas (Sunderland, 1951; Millesi *et al.*, 1972; Swaim, 1972; McQuarrie, 1985; Lundborg, 2000). Para maximizar el potencial de éxito de las técnicas de trasplante, se han formulado unas directrices: En primer lugar, el diámetro del injerto debe ser lo más parecido posible al del tronco nervioso receptor. Un diámetro inadecuado puede predisponer a un crecimiento axonal incompleto debido a la insuficiencia del

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

número de tubos de células de Schwann (bandas de Büngner) en el injerto. Además, la longitud del injerto debe ser de un 15 a un 25% mayor que el espacio entre los cabos. Este margen es suficiente para permitir el acortamiento del injerto debido a su propia degeneración y evita la tensión en las líneas de anastomosis (Harris, 1980; Lundborg, 2000; Jaquet *et al.*, 2001; Sunderland *et al.*, 2004).

Trasplante autólogo

La técnica más utilizada en la reparación de grandes lesiones es la del autotrasplante de segmentos de nervio periférico (Dellon y Mackinnon, 1988; Lundborg, 2000). Un trasplante autólogo es aquel en el que el donante y el receptor son el mismo organismo biológico. Este tipo de trasplante evita la posible activación inmunológica y el consiguiente rechazo, lo que llevaría a la destrucción del implante. Esta técnica proporciona a los axones en regeneración un canal de guía natural poblado de células de Schwann funcionales y rodeadas de su lámina basal (Deumens *et al.*, 2010). Sin embargo, la recuperación funcional es escasa. Tan sólo el 40 – 50 % de los pacientes que reciben un trasplante de este tipo consiguen un grado aceptable de recuperación funcional (Lee y Wolfe, 2000). Además, los trasplantes autólogos presentan una serie de inconvenientes, tales como la escasez de tejidos donantes, la desigualdad en el tamaño del nervio implantado y el nervio receptor o la complicación añadida debida a la necesidad de una segunda intervención quirúrgica (Lee y Wolfe, 2000; Nichols *et al.*, 2004). En los cabos seccionados del nervio utilizado como donante se puede dar la formación de neuromas muy dolorosos. Además, el área denervada queda privada de su función nerviosa (Deumens *et al.*, 2010). El tipo de nervio implantado también es importante (Brushart, 1993). Los segmentos de nervios mixtos son los que mejores resultados presentan, muy por encima de los sensitivos. Sin embargo, se suelen emplear segmentos de nervio sensitivo para no reducir otras funciones motoras. Tal es el caso del nervio sural que es el más comúnmente utilizado (Nichols *et al.*, 2004).

Trasplante alogénico y trasplante heterólogo

Un trasplante alogénico es aquel en el que intervienen un donante y un receptor distintos inmunológicamente pero de la misma especie. Los trasplantes heterólogos o xenotrasplantes son aquéllos en los que el donante y el receptor son de distinta especie. La dis-

1. Introducción

ponibilidad de una fuente de tejidos cadavéricos o de otras especies compensaría la escasez de tejidos autólogos para trasplantes, así como los inconvenientes producidos por la mutilación de un nervio donante, la pérdida de funcionalidad en la zona o la desigualdad en los tipos y tamaños de nervios implantados (Deumens *et al.*, 2010). Sin embargo, tanto los tejidos alogénicos como los heterólogos predisponen al receptor a una reacción inmune adversa a menos que los componentes celulares de la respuesta inmune sean destruidos durante el procesado del implante o sean suprimidos en el organismo receptor (Zochodne, 2008; Deumens *et al.*, 2010).

La supresión de la respuesta inmune incluye la utilización de una drogas inmunosupresoras tales como el Tacrolimus (FK506) o la Ciclosporina A (Sugita *et al.*, 2004). El uso de estas drogas combinado con el tratamiento de irradiación de implantes heterólogos ayuda a la recuperación de la función en numerosos casos a las pocas semanas de la intervención (Trumble, 1992; Berger *et al.*, 2007). Una alternativa para evitar la utilización de drogas inmunosupresoras es el tratamiento por “freeze-thawing” del tejido donante. Este proceso consiste básicamente en rápidas repeticiones de congelación y descongelación del tejido, con lo que se consigue eliminar cualquier elemento celular del injerto preservando únicamente la estructura y los componentes de la matriz extracelular (Evans *et al.*, 1999). La lámina basal de las células de Schwann y la estructura fibrilar de colágeno endoneural permanecen intactas. Estos armazones facilitan la regeneración axonal a través de injertos de hasta 3 cm (Evans *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2005).

1.3.2. Ingeniería Tisular del nervio

La Ingeniería Tisular es una nueva área de la Biotecnología cuyo objetivo es la fabricación de equivalentes tisulares orgánicos que puedan ser utilizados para la sustitución de tejidos y órganos dañados (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Sambanis, 1995). El gran desarrollo que ha sufrido esta disciplina durante las últimas décadas se justifica por la escasez de tejidos donantes para las cirugías de trasplantes. Además, la utilización de prótesis artificiales elimina el riesgo de rechazo inmunológico del injerto y evita la utilización de inmunosupresores tras su implantación (Sher *et al.*, 1983).

El material ideal para la construcción de un equivalente tisular tiene que tener propiedades físicas y bioquímicas similares a las de los nervios originales. La estructura de un

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

implante artificial debe simular la arquitectura de la matriz extracelular del nervio original, conteniendo una serie de canales longitudinales alineados con diámetros definidos y con estructuras de conexión interna (Hadlock *et al.*, 1998). Diversos factores de crecimiento liberados desde estas estructuras artificiales podrían estimular los procesos biológicos de la regeneración nerviosa (Heath y Rutkowski, 1998).

En general, la ingeniería Tisular para la reparación de las lesiones de los nervios periféricos se basa en tres componentes básicos: matrices para el soporte mecánico, elementos celulares y factores de crecimiento (Kim *et al.*, 2004).

Estructura y materiales

Es necesario desarrollar un modelo tridimensional (constructo) en el que las células puedan organizarse en una estructura espacial, con características funcionales similares a las del tejido que queremos sustituir. Los materiales para confeccionar conductos nerviosos artificiales deben tener las siguientes propiedades (Hudson *et al.*, 2000):

- 1.- Deben poder adoptar la forma de un tubo con un diámetro y un espesor de su pared definidos.
- 2.- Deben ser fácilmente implantables utilizando técnicas de microcirugía.
- 3.- Deben ser esterilizables.
- 4.- Deben ser biodegradables.

Hay dos fuentes de materiales utilizables para la construcción de un nervio artificial: Naturales y artificiales.

Materiales naturales

Se ha puesto énfasis en la utilización de materiales naturales a modo de estructura para construir conductos. En este sentido, se pueden fabricar conductos para la reparación de lesiones nerviosas a partir de tejidos autólogos o procedentes de cadáveres. Los tejidos deben favorecer el crecimiento de los axones en su interior y presentar una organización lineal que dirija el avance de las fibras nerviosas. Además, deben evitar las reacciones inmunogénicas con el tejido receptor. La preparación de un tronco nervioso de cadáver para su posterior uso como alotrasplante comprende una mezcla de congelación (proceso

1. Introducción

de “freeze-thawing”) e irradiación del tejido donante para eliminar cualquier evidencia de elementos celulares presentes (Evans *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2005). Los implantes pueden ser almacenados hasta 6 meses a -40° C antes de su utilización, aunque sus resultados mejoran cuanto menor es el tiempo de espera (Evans *et al.*, 1999; Fansa *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que varios tejidos autólogos permiten la regeneración del nervio cuando se usan como conductos. Entre ellos están las cubiertas epineurales (Frerichs *et al.*, 2002; Fansa *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004), tendones, fibras musculares, venas (Geuna *et al.*, 2003; Lundborg, 2004; Keilhoff *et al.*, 2005; Raimondo *et al.*, 2005) y láminas basales extraídas de tejido muscular decelularizado (Schmidt y Leach, 2003). Estos tejidos autólogos han sido también empleados en combinación con factores de crecimiento o revestidos de colágeno para estimular el crecimiento axonal y la migración de las células de Schwann (Fansa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Raimondo *et al.*, 2005). La utilización de materiales inertes reduce el riesgo de toxicidad y aumenta el grado de biocompatibilidad. Sin embargo, estos implantes acelulares, aunque no son inmunogénicos, tienden a producir un grado significativo de inflamación, principalmente porque el proceso de decelularización es incompleto y permanecen restos celulares o porque resultan alterados los elementos de la matriz extracelular (Chalfoun *et al.*, 2006).

Materiales sintéticos

Los materiales sintéticos permanentes, no reabsorbibles, tales como polímeros basados en poli-tetrafluoretileno (Gore-Tex[®]) o en silicona (Williams *et al.*, 1983; Lundborg, 1993; Stanec y Stanec, 1998; Braga-Silva, 1999; Lundborg, 2004) no son deseables ya que suelen aparecer reacciones fibróticas permanentes en el implante y se da una pérdida de funcionalidad causada por la compresión de los axones en el interior del conducto (Lietz *et al.*, 2006). Además, conlleva un mayor riesgo de infección (Chalfoun *et al.*, 2006).

Sin embargo, se han empleado con éxito numerosos materiales sintéticos reabsorbibles en la regeneración de los nervios periféricos. Los constructos basados en Ingeniería Tisular están diseñados para degradarse a una determinada velocidad para permitir la colonización del tejido formado de novo (Sheridan *et al.*, 2000). Los materiales ideales deben tener una estructura porosa adecuada, unas propiedades mecánicas resistentes y unas

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

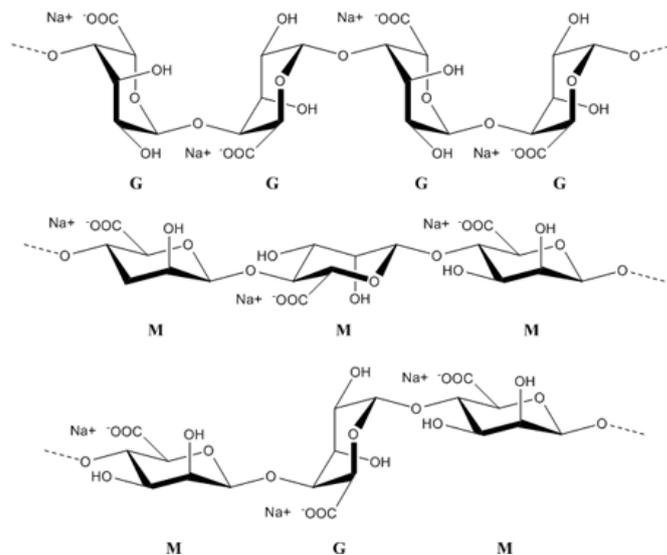
condiciones de cinética de liberación de moléculas determinada (Sheridan *et al.*, 2000). El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina que posee propiedades antitumorales y antibacterianas y se ha demostrado que estimula la proliferación y la migración de las células de Schwann, influyendo así en la regeneración del nervio (Yuan *et al.*, 2004). El poli-3-hidroxi-butarato es un polímero natural que se ha utilizado para cubrir espacios de hasta 4 cm en el nervio ciático del conejo (Young *et al.*, 2002). Poliésteres como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y copolímeros de ambos (ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) están siendo empleados en investigación por su amplia disponibilidad y porque su utilización está aprobada en humanos por la Food and Drug Administration (FDA) del gobierno de los EEUU (Hudson *et al.*, 2000). Aunque existe una gran variedad de materiales adicionales, la aprobación del PLGA para uso clínico ha incrementado el interés por estos polímeros. Sus propiedades físicas, tales como la posibilidad de fabricar un conducto de dimensiones adecuadas, el tamaño de poro de la pared, la textura de la superficie y una serie de propiedades eléctricas inherentes, influyen positivamente en la regeneración del nervio (Hudson *et al.*, 2000). Estas propiedades afectan directamente a la difusión de nutrientes a través de la pared del conducto. Además, se acelera el crecimiento axonal gracias a una superficie lisa, y podría inhibir la proliferación de células no deseables como los fibroblastos, que pueden causar la formación de procesos cicatriciales (Evans, 2003).

La luz del conducto podría completarse, en términos de Ingeniería Tisular, con materiales que simulasen la apariencia y funcionalidad de la matriz extracelular presente en el interior del nervio periférico (Sheridan *et al.*, 2000). En los casos más simples, el material no tiene por qué ser bioactivo y simplemente rellena los espacios. Estos materiales son utilizados, por ejemplo, como relleno en cirugía plástica o reconstructiva (Sheridan *et al.*, 2000). Sin embargo, a menudo se pretende imitar la función interactiva de la matriz extracelular. De este modo, se han empleado numerosas moléculas insolubles de la matriz extracelular para estimular la regeneración axonal: laminina, fibronectina, fibrina y algunas formas de colágeno (Madison *et al.*, 1985; Satou *et al.*, 1986; Madison *et al.*, 1987; Rosen *et al.*, 1992).

Puede rellenarse también con otras sustancias naturales de distinto origen. El alginato es un polisacárido natural extraído de algas pardas como *Laminaria hyperborea* y *L. lessonia*, es bioabsorbible y tiene la capacidad de formar hidrogeles (Martinsen *et al.*, 1989; Martinsen *et al.*, 1992; Amsden y Turner, 1999). Está formado por un copolímero de áci-

1. Introducción

do β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico. Como biomaterial, el alginato tiene varias ventajas incluyendo que es biocompatible y que no produce reacción inmunológica (Klöck *et al.*, 1997; Shapiro y Cohen, 1997). Una propiedad interesante es su capacidad para formar geles, lo que permite la encapsulación de diversas sustancias (Martinsen *et al.*, 1989; Amsden y Turner, 1999), así como la liberación controlada de factores de crecimiento (Bouhadir *et al.*, 2001; Augst *et al.*, 2006). También se han utilizado los geles de alginato como vehículos para la transferencia de células en Ingeniería Tisular (Shapiro y Cohen, 1997; Sheridan *et al.*, 2000; Novikova *et al.*, 2006). El alginato no se degrada enzimáticamente de forma natural en los mamíferos y de esta manera su degradación está poco controlada (Lansdown y Payne, 1994). Además, las células no se adhieren correctamente al alginato (Smetana, 1993). Modificaciones en la proporción de cada uno de los polímeros que lo forman pueden subsanar estos inconvenientes (Augst *et al.*, 2006).



Tres estructuras diferentes del alginato sódico mostrando los dos monómeros que lo componen: β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G). Adaptado de (Augst *et al.*, 2006).

Componentes celulares

La inclusión de células de soporte neuronal parece imprescindible para la proliferación axonal (Rath *et al.*, 1995). Aunque no se conocen todos los mecanismos que regulan la dinámica de la relación axón/célula de Schwann, numerosos experimentos apoyan el concepto de que las células de Schwann ofrecen un sustrato preferente para la migración axonal y liberan factores bioactivos que incrementan la migración nerviosa (Rath *et al.*,

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

1995; Sobol *et al.*, 2003). En el nervio normal, las células de Schwann parecen permanecer quiescentes; sin embargo, tras una lesión en el nervio, las células de Schwann del cabo distal sufren numerosos cambios relacionados con la degeneración axonal, por ejemplo, colaborando en la fagocitosis de residuos celulares y mielina (Stoll *et al.*, 1989; Hirata y Kawabuchi, 2002). Además, las células de Schwann desempeñan una labor importante en la regeneración de los nervios periféricos mediante la liberación de factores de crecimiento (Fu y Gordon, 1997; Rosenbaum *et al.*, 1997; Mirsky y Jessen, 1999; Bampton y Taylor, 2005; Hayworth *et al.*, 2006) y, quizás una función mecánica, cubriendo el espacio entre el desplazamiento del cono de crecimiento axonal y la lámina basal (Ide, 1996; Wallquist *et al.*, 2005; Court *et al.*, 2006). A pesar del papel que las células de Schwann puedan jugar en el crecimiento axonal en un conducto sintético, ha de resolverse el problema de la disponibilidad de una fuente de células de Schwann para su utilización en Ingeniería Tisular. La utilización de células de Schwann autógenas requeriría coleccionar segmentos de nervios sensitivos para obtener cultivos celulares y expandir la población de células de Schwann *in vitro* hasta un número adecuado, antes de su implantación. No se conoce realmente si estas células presembradas en el interior del conducto permanecerán viables durante el proceso de transporte e implantación.

Se deben explorar fuentes de células alternativas. Los datos obtenidos en el laboratorio de Chalfoun y cols. demuestran la capacidad de los fibroblastos para actuar como células de Schwann, liberando NGF para la proliferación axonal (Patrick *et al.*, 2001; Chalfoun *et al.*, 2006). La utilización de fibroblastos dérmicos modificados genéticamente permite su fácil recolección (a través de una biopsia de piel), expansión y crecimiento. Sin embargo, la aparición de procesos cicatriciales masivos hace rechazar este tipo celular. Otros tipos celulares como HEK-293 se han usado recientemente con similar eficacia en el crecimiento axonal pero sin la formación de cicatriz fibrótica (Jimenez *et al.*, 2004; McConnell *et al.*, 2004; McConnell *et al.*, 2005). Aparte de inducir una pequeña reacción inmunológica, esta línea celular es humana y embrionaria, haciendo de ella un prometedor sistema de liberación para inducir la expresión de factores de crecimiento (Jimenez *et al.*, 2004; McConnell *et al.*, 2004; McConnell *et al.*, 2005).

Además, hay una gran variedad de posibilidades de desarrollar líneas celulares para la diferenciación nerviosa utilizando diferentes fuentes de células madre, tales como células madre embrionarias, células madre derivadas de la médula ósea, células madre pluripo-

1. Introducción

tenciales somáticas, células madre derivadas de tejido adiposo, las células madre mesenquimales, y células progenitoras (Dezawa, 2002; Knight y Evans, 2004). La ventaja de utilizar estas líneas celulares reside en que su potencial de diferenciación puede ser estimulado por los axones en progresión. Por otro lado, y además de las células de Schwann, otras células podrían ser responsables del crecimiento axonal. Las células madre pluripotenciales podrían permitir múltiples patrones de diferenciación, creando un ambiente adecuado para estimular la regeneración axonal. Murakami y cols trasplantaron células progenitoras neuronales derivadas del hipocampo fetal en un modelo de implante en rata y demostraron que se diferenciaban a células de Schwann que ayudaban a estimular la regeneración a través de una lesión en un nervio (Murakami *et al.*, 2003). Las células madre neurales han sido identificadas en el sistema nervioso central del ser humano adulto, pero la obvia dificultad que entraña su extracción y la dificultad que presenta su expansión, las hace inviables para su uso terapéutico (Morrison *et al.*, 1999). Las células madre de los folículos pilosos, que son fácilmente accesibles, se han transdiferenciado con éxito a células de Schwann y ya se han aplicado a un modelo de regeneración de nervio periférico (Amoh *et al.*, 2005). Las células madre de la médula ósea o las células madre mesenquimales tienen semejantes ventajas en cuanto a la accesibilidad, y se han obtenido resultados parecidos en la regeneración del nervio, principalmente porque muestran características similares a las células de Schwann (Dezawa *et al.*, 2001; Cuevas *et al.*, 2002; Cuevas *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). Las células madre de la médula ósea se pueden diferenciar *in vitro* a células de tipo glial vía inducción con varios mitógenos. Tohill y Terenghi han demostrado que estas células pueden aportar algunos efectos beneficiosos al crecimiento de las células de Schwann, indicando un papel tanto estimulador como de aporte trófico (Tohill *et al.*, 2004; Tohill y Terenghi, 2004).

Factores de crecimiento

La capacidad de los conductos artificiales para facilitar la regeneración axonal depende, en gran medida, de la recolonización de la prótesis por parte de células promotoras de crecimiento (tales como células de Schwann y células endoteliales vasculares). Numerosos factores neurotróficos solubles se pueden incorporar directamente a los conductos artificiales para estimular y regular el desarrollo de un nuevo tejido (Haynes, 1988; Mahanthappa *et al.*, 1996; Sheridan *et al.*, 2000; Zochodne y Cheng, 2000; Whitaker *et*

1.3. Reparación de lesiones en el sistema nervioso periférico

al., 2001). Algunos de ellos son el NGF, el BDNF, IGF-1 e IGF-2, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, los FGFs y el CNTF (DiStefano *et al.*, 1992; Funakoshi *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1999; Zochodne y Cheng, 2000; Boyd y Gordon, 2002). Varias moléculas neurotróficas (NGF, BDNF, NT-3 o NT-4/5) actúan directamente para estimular la supervivencia, e indirectamente sobre la regeneración de los axones vía células no neuronales. El NGF administrado exógenamente evita la muerte de las neuronas sensoriales axotomizadas (Yip *et al.*, 1984; Rich *et al.*, 1987; Thippeswamy *et al.*, 2005).

Los factores de crecimiento pueden ser liberados a través de numerosos mecanismos. Tradicionalmente, los factores de crecimiento se administraban exógenamente aplicados mediante tubos o inyecciones (Mohiuddin *et al.*, 1999; Whitaker *et al.*, 2001; Piotrowicz y Shoichet, 2006; Zochodne, 2008). Este sistema de administración permite el registro del efecto de un único pico de actividad. Sin embargo, la liberación de los factores de crecimiento en una concentración deseada en la interfase axón/célula de Schwann, no puede ser controlada. Se han empleado otros métodos para la liberación de moléculas, como la utilización de microesferas (Schmidt y Leach, 2003). El problema es que la degradación de las microesferas es variable. La liberación comienza inmediatamente después del inicio de la degradación, aunque se han registrado datos que demuestran que la liberación continúa durante largos periodos de tiempo (Piotrowicz y Shoichet, 2006). Otra estrategia es unir los factores de crecimiento a los materiales sintéticos con los que se construyen los conductos protésicos reabsorbibles. También pueden unirse a los materiales de relleno (Sheridan *et al.*, 2000; Bouhadir *et al.*, 2001; Whitaker *et al.*, 2001; Csaba *et al.*, 2009). Los protocolos deben tener en cuenta la secuencia, la dosificación, la velocidad de liberación y la duración de la terapia (Whitaker *et al.*, 2001; Rose y Oreffo, 2002).

2. Justificación

Las lesiones nerviosas en la Unión Europea afectan a más de 300.000 pacientes cada año. Estas lesiones tienen un grado limitado de recuperación y suponen una gran afectación de la calidad de vida del paciente y de su familia, un elevado coste humano para el sistema sanitario y, en muchas ocasiones, la incapacidad motora del sujeto.

Los métodos estándar de reparación de lesiones con pérdida de tejido nervioso, basados en el trasplante autólogo de un segmento de nervio periférico, no ofrecen resultados satisfactorios en un gran número de casos. Además, para ello es necesario disponer de tejido nervioso donante en suficiente cantidad, lo que implica una complicada intervención quirúrgica adicional y la mutilación de un segmento de nervio sano.

En los últimos años se han desarrollado estrategias alternativas basadas en la utilización de materiales biológicos o artificiales a modo de conducto que facilite la regeneración nerviosa y la reconexión de los cabos nerviosos separados. En este sentido se crea la necesidad de desarrollar un modelo experimental de regeneración nerviosa a través de un conducto artificial biocompatible y acelular, para estudiar los parámetros biológicos que intervienen en la regeneración y evaluar su posible utilización en la práctica clínica.

3. Hipótesis

Nuestra hipótesis general es que el implante de un conducto de material biocompatible con un gel en su interior que contenga y libere un factor de crecimiento neural, puede favorecer la regeneración de un nervio seccionado, sin la necesidad de añadir elementos celulares trasplantados.

Para confirmar esta hipótesis nos hemos planteado los objetivos siguientes:

4. Objetivos

Los objetivos que se pretenden alcanzar en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Elaborar una prótesis artificial biocompatible y absorbible para implantar en una neurectomía de 3 cm.
2. Diseñar la estructura interior de la prótesis para evitar su colapso y que además actúe como medio ambiente extracelular capaz de inmovilizar y liberar un factor neurotrófico como la β -Neurregulina 1 de tipo I.
3. Determinar la velocidad de la regeneración de los nervios seccionados a través de las prótesis sin β -Neurregulina 1 y con β -Neurregulina 1.
4. Establecer los cambios fenotípicos detectables con métodos inmunohistoquímicos, de los elementos celulares que participan en la regeneración nerviosa.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Animales de experimentación

El animal empleado para la elaboración de esta Tesis Doctoral es el conejo, *Oryctolagus cuniculus* L. 1758 (Leporidae, Lagomorpha, Mammalia) de la raza New Zealand. La colonia de conejos New Zealand utilizada en la elaboración de esta Tesis Doctoral fue desarrollada y mantenida en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid a partir de reproductores procedentes de la Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra). Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas y fueron alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para conejos (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., S.L. Molins de Rei, Barcelona).

Se emplearon un total de 30 conejos divididos en 6 grupos experimentales según el tiempo de supervivencia tras el implante de la prótesis (15 días, 30 días, 75 días) y la presencia o no de factor de crecimiento.

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron animales de ambos sexos. Los ejemplares tenían edades de entre 90 y 120 días y un peso corporal entre 3 y 3,5 Kg en el momento de la intervención quirúrgica; no se apreciaron diferencias en las dimensiones de los nervios ciáticos ni en los parámetros de la regeneración entre los ejemplares.

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.

5. Materiales y métodos

5.1.2. Productos químicos

Se han utilizado los siguientes compuestos químicos con pureza analítica. Se indica primero la abreviatura o nombre común, a continuación la fórmula química, y por último el número de serie del fabricante.

Acetona. CH_3COCH_3 #8222511000 Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido acético glacial. CH_3COOH #100063 Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido cítrico, anhidro. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ #818707.1000 Merck, Darmstadt, Alemania.

Ácido clorhídrico. HCl 37% #20255.290 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Ácido pícrico. $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ #80452 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Ácido poli(DL-láctico-co-glicólico) (85/15). $[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$ #B6006-1 Lactel Absorbable Polymers (antes Birmingham Polymers Inc.).

Ácido sulfúrico. H_2SO_4 #20690.293 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

APTES, (3-aminopropil)triethoxysilane. $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ #A-3648 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Azul de Toluidina. $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{S}\cdot 0.5\text{ZnCl}_2$ #89640 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Butorfanol tartrato. Torbugesic[®]. Fort Dodge Animal Health, Overland Park (KS), EEUU.

Calcio cloruro. CaCl_2 #22317.297 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Solución antibiótica-antimicótica para cultivos celulares (penicilina, estreptomicina y anfotericina) #15240-062 Gibco, Invitrogen.

4',6-diamino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). # D1306 Molecular Probes, Eugene (OR), EEUU.

di-Potasio hidrógenofosfato. K_2HPO_4 #26930.362 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

di-Sodio hidrógenofosfato. Na_2HPO_4 #28026 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

D (+) Sacarosa. $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ #27478.296 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). #31885 Gibco, Invitrogen.

Entellan[®]. Medio de montaje para microscopía. #107961.0100 Merck, Darmstadt, Alemania.

Etanol absoluto. C₂H₆O #100983.1011 Merck, Darmstadt, Alemania.

Etanol 96°. C₂H₆O·nH₂O, Dávila Villalobos, S.L., (Dueñas), Valladolid.

Formaldehído 35-40%. CH₂O #20910.294 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Gentamicina. #G1397 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Glutaraldehído 25%. #104239.100 Merck, Darmstadt, Alemania.

Heregulin-β1. Neuregulina recombinante humana #H7660 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Hierro cloruro, hexahidrato. FeCl₃·6H₂O #24214.295 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

H₂O destilada en nuestro laboratorio.

Ketamina clorhidrato. Imalgène[®] 500, Merial S.A., Lyon, Francia.

Osmio (VIII) óxido. OsO₄ #124505.0500 Merck, Darmstadt, Alemania.

Óxido de propileno. C₃H₆O #110205 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Parafina tipo 6. #8336E Richard-Allan Scientific, Kalamazoo (MI), EEUU

Paraformaldehído. (CH₂O)_n #104005.1000 Merck, Darmstadt, Alemania.

Plomo nitrato. Pb(NO₃)₂ #L019 TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Reino Unido.

Potasio cloruro. KCl #26759.291 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Potasio dicromato. K₂Cr₂O₇ #26781.297 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Potasio dihidrógenofosfato. KH₂PO₄ #26925.295 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Resina Spurr. # S024/D TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Reino Unido.

Sodio acetato. CH₃COONa #27650.292 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Sodio alginato (alta viscosidad). #A7128 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Sodio cloruro. NaCl #27800.291 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

5. Materiales y métodos

Sodio dihidrógenofosfato, dihidrato. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ #28011.291 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Sodio hidróxido. NaOH #28244.295 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Sodio pentobarbital. Dolethal[®], Vetoquinol S.A., Lure, Francia

Sodio tetraborato. $\text{Na}_5\text{B}_4\text{O}_7$ #229946 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

Sodio trifosfato pentabásico. $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ #T5883 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.

tri-Sodio citrato, dihidrato. $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ #106448.1000 Merck, Darmstadt, Alemania.

Triton[®] X-100. #28.817.295 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

Uranilo acetato. $\text{UO}_2(\text{OCOCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ #U001 TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Reino Unido.

Vectashield[®]. Medio de montaje para microscopía de fluorescencia. #H-1000 Laboratorios Vector, Burlingame (CA), EEUU.

Xilacina clorhidrato 2%. Rompun[®], Bayer Health Care, Kiel, Alemania.

Xileno (mezcla de isómeros). $\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_3)_2$ #28973.363 BDH-Prolabo, Briare, Francia.

5.1.3. Disoluciones

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_2O , calentando hasta 60°C. Se añade 1 ml de NaOH 1 N. La mezcla se vuelve transparente una vez despolimerizado 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_2O .

Fijador de Palay para microscopía electrónica. Está compuesto por 1% (p/v) paraformaldehído y 1% (v/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_2O , calentando hasta 60°C. Se añade 1 ml de NaOH 1 N. La mezcla se vuelve transparente una vez despo-

limerizado el paraformaldehído. Se enfría rápidamente y se filtra. Se añaden 4 ml de CaCl_2 al 0.5% y 40 ml de glutaraldehído al 25% (comercial). Añadimos 250 ml de tampón fosfato 0.4 M, pH 7.4 y ajustamos el volumen hasta 1 l con H_2O destilada.

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 K_2HPO_4 en 1 l de H_2O y ajustando el pH a 7.4.

Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 a 25° C. Se prepara diluyendo la solución anterior 1:4 con H_2O .

Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 a 25° C. Para obtener 1 litro se mezclan los siguientes componentes: 8 g de NaCl , 0.2 g de KCl , 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 . Se ajusta el pH a 7.4 a 25°C con NaOH 1 N y el volumen a 1 litro con H_2O .

Tratamiento de adherencia con Silane para portaobjetos. Previamente se someten los portaobjetos a un tratamiento previo con mezcla sulfocrómica durante 10 min. La mezcla sulfocrómica se compone de 100 ml de H_2SO_4 y 50 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ mezclados en 1 l de H_2O . Después se lavan los portaobjetos con H_2O durante 5 min y se sumergen en acetona 100° durante otros 5 min. Finalmente se sumergen durante 10 min en una solución de APTES al 4% en acetona 100°, se lavan en H_2O durante 2 min y se dejan secar a temperatura ambiente.

HCl 1 N. Se mezclan en el siguiente orden 91.38 ml de H_2O destilada y 8.62 ml de HCl concentrado (HCl 37 %).

Solución 0.1 M de ácido cítrico. Se obtiene disolviendo 1.921 g de ácido cítrico anhidro en 100 ml de H_2O destilada.

Solución 0.1 M de citrato sódico. Se prepara disolviendo 2.94 g de tri-sodio citrato dihidrato en 100 ml de H_2O destilada.

Tampón citrato 0.1 M, pH 6.0 a 25° C. Se obtiene mezclando 9 ml de una solución 0.1 M de ácido cítrico y 41 ml de una solución 0.1 M de citrato sódico en 400 ml de H_2O destilada y ajustando el pH a 6.0 con NaOH 1 N. Por último se ajusta el volumen a 500 ml con H_2O destilada.

Solución de citrato de plomo. Se disuelven 1.33 g de nitrato de plomo en 30 ml de H_2O utilizando el sonicador. Se añaden 1.76 g de tri-sodio citrato dihidrato y se

5. Materiales y métodos

mantiene 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 H₂Odd.

NaOH 10 N. Se disuelven 40 g de NaOH en 60 ml de H₂O destilada. Después se ajusta el volumen a 100 ml con H₂O destilada La reacción es exotérmica.

NaOH 1 N. Se obtiene mezclando 10 ml de NaOH 10 N y H₂O destilada hasta un volumen total de 100 ml.

Solución de uso de DAPI. Solución de 0.2 µg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro.

5.1.4. Sueros inmunológicos y sistemas de inmunodetección

Anti-neurofilamentos 200 kD. IgG de conejo anti-neurofilamentos 200 kD, N4142 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU). Este anticuerpo policlonal está dirigido contra neurofilamentos 200 kD de médula espinal de bovino. Tiene reacción cruzada con otras especies, incluyendo el humano.

Anti-S100A1. IgG de ratón anti-S100A1, WH0006271M1 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU). Anticuerpo monoclonal (1D5) dirigido contra la proteína recombinante S100A1. Presenta reacción cruzada con proteínas de humano.

Anti-p75^{NTR}. IgG de ratón anti-p75^{NTR}, ab54322 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Este anticuerpo monoclonal (SPM299) está dirigido contra el receptor de NGF de baja afinidad p75 de células de melanoma A875. Tiene reacción cruzada con otras especies, incluyendo el humano.

Suero normal de cabra. #S-1000 Laboratorios Vector, Burlingame (CA), EEUU.

Albúmina sérica bovina (BSA). #SP-5050 Laboratorios Vector, Burlingame (CA), EEUU.

Anti-IgG de ratón fluorescente AlexaFluor 488. #A11029 Molecular Probes, Eugene (OR), EEUU.

Anti-IgG de ratón fluorescente AlexaFluor 594. #A11031 Molecular Probes, Eugene (OR), EEUU.

Anti-IgG de conejo fluorescente AlexaFluor 488. #A11034 Molecular Probes, Eugene (OR), EEUU.

Anti-IgG de conejo fluorescente AlexaFluor 594. #A11037 Molecular Probes, Eugene (OR), EEUU.

5.1.5. Instrumentos

Arcón de congelación. Temperatura controlada entre -70° C y -82° C. Revco Ultima II; Asheville, NC, EEUU.

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.

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.

Material quirúrgico esterilizado en nuestro laboratorio.

Microscopio quirúrgico de baja magnificación Optomic OP-C12. Optomic Spain, S.A., Madrid, España.

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

Microtomo de rotación. Microm HM. Microm International GmbH, Walldorf, Alemania.

pHmetro Radiometer PHM82; Copenague, Dinamarca.

Pipetas de precisión con rango entre 1.000 - 0.1 µl Eppendorf Research; Alemania.

Procesador de tejidos biológicos Leica TP1020. Leica Microsystems, GmgH, Alemania.

5.2. Métodos

5.2.1. Elaboración de la bioprótesis

La prótesis tiene un diseño tubular de 30 mm de longitud y un diámetro interior de 3 mm. Está fabricada con ácido poli(láctico-glicólico). La proporción relativa de cada polímero es de 85/15. En su interior se hallan insertadas dos láminas del mismo material que funcionan a modo de andamiaje. Además, se ha rellenado con un hidrogel de alginato suplementado, en su caso, con β -Neuregulina 1 como factor de crecimiento.

Para la fabricación del tubo se elaboró una solución de ácido poli(láctico-glicólico) al 10% en ácido acético glacial, en agitación moderada y a temperatura ambiente durante 24 horas. A esta solución se le añadió un 0.1% de sodio trifosfato pentabásico (TPP) como cross-linker (Chen *et al.*, 2006; Csaba *et al.*, 2009).

Una vez disuelto, se elaboraron láminas finas extendiendo 500 μ l de la solución sobre un portaobjetos en posición horizontal. Tras la evaporación del exceso de ácido acético (el proceso lleva aproximadamente 24 horas), una fina película de ácido poli(láctico-glicólico) cubre toda la superficie del portaobjetos de forma uniforme. Introduciendo el portaobjetos en un recipiente con H_2O durante unos segundos, la lámina se despegó del portaobjetos y se obtiene una membrana de biopolímero de 500 x 200 mm. Estas membranas, una vez lavadas en DMEM con gentamicina al 1% para su esterilización, servirán para elaborar la prótesis tubular de la siguiente manera:

Dos membranas unidas se enrollan a lo largo de su eje mayor formando un tubo hueco de 3 mm de diámetro interno aproximadamente. La pared se compone de dos capas. Se recortan los extremos para dejar una longitud total de 300 mm. Otras láminas se recortan a la medida de 300 x 3 mm y se introducen en el interior del tubo. Estas láminas servirán como armazón de la estructura tubular y dividirán la luz del tubo.

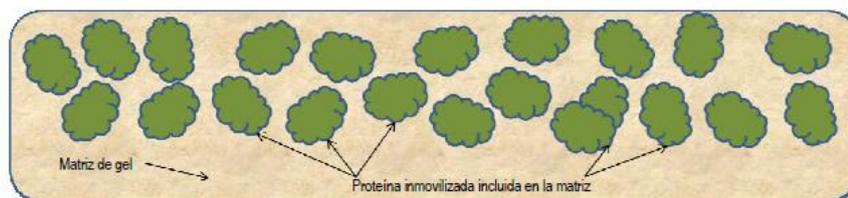
5. Materiales y métodos

En el interior del tubo se inyecta, como material de relleno, un hidrogel de alginato sódico al 4%. El gel de alginato se elabora disolviendo 4 g de alginato sódico (previamente esterilizado) en 100 ml de medio definido, en agitación moderada y a temperatura ambiente. De esta manera se consigue la gelificación de la solución. Para uno de los grupos experimentales, se añade β Neurregulina 1 10 nM a la solución durante el proceso de gelificación, consiguiendo que la sustancia quede inmovilizada en el gel de alginato (ver ilustración). El gel se introduce en la prótesis tubular y al enfriarse, se vuelve más compacto y desaloja las burbujas de aire del interior del conducto.

		Referencia
L-carnitina	2 μ g/ml	C-0283
L-glutamina	2 mM	G-8540
Hepes	15 mM	H-6147
Putrescina	8 μ g/ml	P-5780
Taurina	4 μ g/ml	T-8691
Penicilina-estrep	50 UI/ml	A-5955
Gentamicina	40 μ g/ml	1570-037
Albúmina bovina	1 mg/ml	A-1470
Ác ascórbico	1 μ g/ml	A-4034
MEM amino acid	1 ml/100 ml	M-7145
MEM vitamin	1 ml/100 ml	M-6895
ITS	1 ml/100 ml	I-1884
Ác lipoico	100 ng/ml	T-1395
Retinol	200 ng/ml	R-7632
Biotin	20 ng/ml	B-4639
Ác linoleico	1 μ g/ml	L-5900
Ác linolenico	1 μ g/ml	L-2376
Tocoferol	1 μ g/ml	T-3251
Progesterona	6,3 ng/ml	P-8783
Vit B12	1 μ g/ml	C-3607

Composición del medio definido utilizado para la disolución del alginato sódico. Todos los productos son de Sigma excepto la gentamicina que es de Gibco.

La bioprótesis así elaborada se conserva a 4° C hasta su implantación *in vivo*, durante un tiempo no superior a 4 horas.



Esquema del modelo de inmovilización de proteínas en una matriz de hidrogel de alginato. Adaptado de (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011).

5.2.2. Implante de la bioprótesis

Se anestesia profundamente al conejo mediante inyección intramuscular de una mezcla de ketamina, xilacina y butorfanol (35 mg/kg de ketamina, 5 mg/kg de xilacina y 0.1 mg/kg de butorfanol). Esta dosis permite de 60 a 90 minutos de sedación quirúrgica. Una vez comprobada la eficacia de la anestesia por ausencia de reflejo palpebral, se practicó un corte en la piel del muslo de la pata derecha de 4 cm de longitud y se separaron los paquetes musculares. Para ello se rasgan las fascias musculares sin alterar la integridad de los músculos. Una vez expuesto el nervio ciático, se limpió de mesoneuro y se liberó de adherencias a los tejidos circundantes. Después se seccionó un segmento de nervio de 2.5 cm (longitud siempre inferior a la de la prótesis bioabsorbible para evitar tensiones en los puntos de sutura) y en su lugar se interpuso una prótesis de 3 cm de longitud. El implante se sutura al epineuro con la ayuda de un microscopio quirúrgico de baja magnificación (4x). De esta manera se asegura que la sutura atraviesa solamente el epineuro. El epineuro es traccionado y tensado con unas pinzas de relojero (Dummont nº 5). Se colocan todas las suturas y después se atan todas al mismo tiempo. Esto minimiza el exceso de tracción en un sólo punto del nervio. Para empezar, se colocan dos suturas de monofilamento 10-0 (Ethilon) en el cabo nervioso proximal separadas 180°. Estas suturas mantienen el cabo y la bioprótesis alineados. Una sutura adicional se coloca en la parte superior del nervio. En este momento se sujetan los extremos de las suturas y se hace girar el tronco nervioso para exponer su parte inferior. Se da un punto de sutura más en este lado. Los nudos se inspeccionan para comprobar si todos tienen la misma tensión. Se repite el proceso de la misma manera en el cabo distal.

La sutura se realizó a aproximadamente 1 mm del borde del nervio seccionado. La dirección de la sutura va desde la superficie del nervio y emerge subepineuralmente. Es llevada al extremo libre y el proceso continúa en el extremo de la prótesis. El segundo pase perfora la bioprótesis por su cara interior y emerge por la superficie. Esto completa una sutura simple interrumpida. Es deseable un número pequeño de suturas para que la reacción inflamatoria causada por el material de sutura sea mínima. Swaim determinó que cuatro suturas equidistantes son suficientes para una adecuada reparación en el caso de la coaptación de dos cabos nerviosos seccionados (Swaim, 1972).

5. Materiales y métodos

Una vez implantada la prótesis, se cerró el campo operatorio suturando la fascia muscular con CatGut 5-0 y la piel con Nylon 6-0. Se revisaron las suturas exteriores cada 24 horas durante la primera semana postoperatoria y se retiraron los puntos a los 15 días de la cirugía.

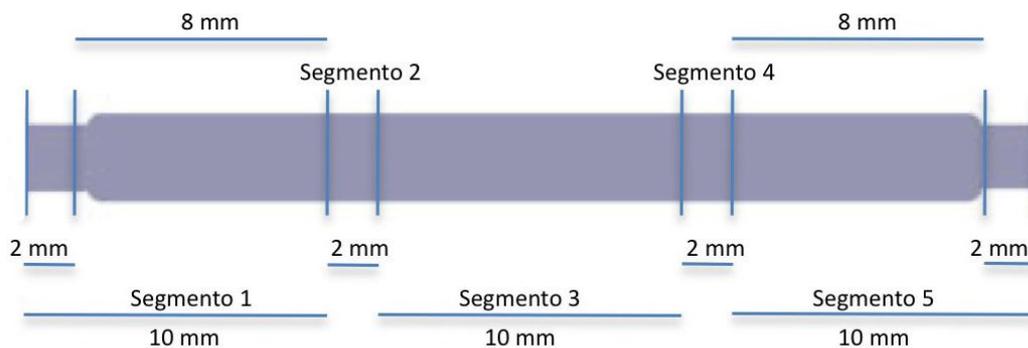
5.2.3. Obtención y preparación del tejido

Una vez anestesiado profundamente el animal con una mezcla de ketamina y xilacina (35 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilacina), se le aplicó la eutanasia utilizando una dosis letal de pentobarbital sódico (Doletal[®]) por vía intravenosa. Se comprobó la muerte del animal por la aparición de midriasis, la ausencia respiración y de latido y la ausencia de pulso arterial.

Se disecó la extremidad inferior derecha para extraer el segmento implantado más una porción de 1 cm de nervio ciático antes y después de la bioprótesis.

5.2.4. Sección y distribución de tinciones

El nervio ciático conteniendo la bioprótesis, se dividió en varios segmentos según el gráfico siguiente:



Segmentos impares:

Los segmentos impares se fijaron por inmersión con paraformaldehído tamponado al 4% durante 24 horas a 4° C. Se lavaron en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 en agitación moderada durante 1 hora para eliminar el exceso de fijador y se procesaron para ser incluidos en parafina y seccionados con un microtomo de rotación siguiendo un plano longitudinal:

En un procesador de tejidos biológicos, los bloques de tejido fueron deshidratados en una batería de alcoholes de gradación creciente, acabando en dos baños de etanol absoluto y dos de xilol. Posteriormente fueron embebidos en parafina mediante dos baños consecutivos de parafina líquida a una temperatura de 62° C. Los bloques de tejido fueron encastados después en moldes para su seccionamiento. Las secciones, de 5 μ m de grosor fueron destinadas a la realización de técnicas de inmunofluorescencia para demostrar diferentes marcadores de elementos neurales.

Secciones seriadas de cada uno de los bloques pares se procesaron con las siguientes técnicas:

Tinciones inmunofluorescentes para los siguientes marcadores:

- Neurofilamentos 200 kD (NF)
- Proteína ligante de Calcio S100A1 (S100)
- Receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR})
- Inmunofluorescencia doble NF + p75^{NTR}

Detección de marcadores mediante inmunofluorescencia

Después de desparafinar e hidratar las secciones, se sometieron los cortes a un tratamiento para desenmascarar antígenos sumergiéndolos en tampón citrato pH 6.0 a 60° C durante 1 hora. Se enfriaron las secciones y se lavaron 3 x 10 min en PBS pH 7.4. Seguidamente se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario incubando las secciones durante 15 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente, en un medio compuesto por:

- PBS
- BSA al 1%
- Suero normal de cabra al 10%

Se eliminó el medio de bloqueo lavando las secciones 3 x 10 min en PBS y se incubaron en el anticuerpo primario durante 12 horas en cámara húmeda y a 4° C. El suero de incubación estaba compuesto por:

- PBS

5. Materiales y métodos

- Anticuerpo primario en la dilución adecuada (ver tabla I)

Se lavaron las secciones 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron en el medio del anticuerpo secundario durante 1 hora en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. El medio contenía:

- PBS
- Anti-IgG de ratón fluorescente en dilución 1:200

Las secciones se lavaron 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Por último, se realizó una tinción de los núcleos sumergiendo las secciones en solución de DAPI durante 10 min en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad, y se montaron los cortes con Vectashield[®] y cubreobjetos.

Controles de especificidad

- Eliminación del anticuerpo primario en el primer suero de incubación para detectar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario al tejido.
- Incubación de las secciones únicamente con PBS para detectar posibles elementos endógenos autofluorescentes.

En ninguno de los casos se observaron elementos marcados, aunque sí una tinción de fondo inespecífica muy leve. Los eritrocitos, muy escasos y en pocos animales, se marcaban intensamente ya que poseen autofluorescencia debida al grupo hemo, pero eran fácilmente identificables por su morfología.

TABLA I: SUEROS INMUNOLÓGICOS

Anticuerpo primario	Concentración	Antisuero secundario
Anti-neurofilamentos 200 kD	1: 100	Anti-IgG de conejo
Anti-p75 ^{NTR}	Prediluido	Anti-IgG de ratón
Anti-S100A1	1: 50	Anti-IgG de ratón

Detección de dos marcadores mediante inmunofluorescencia

Esta variación del protocolo anterior se realizó para comprobar la colocalización de dos marcadores. Se realizaron dos técnicas de inmunofluorescencia de manera secuencial: primeramente con uno de los anticuerpos y seguidamente con el otro.

De la misma forma que en el caso anterior, tras desparafinar e hidratar las secciones, se sometieron los cortes a un tratamiento para desenmascarar antígenos seguido del bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Después se eliminó el medio de bloqueo lavando las secciones 3 x 10 min en PBS y se incubaron las secciones en el primer antisuero primario durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. El medio de incubación estaba compuesto por:

- PBS
- Anticuerpo anti-p75^{NTR} RTU

Se lavaron las secciones 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron en el medio del primer anticuerpo secundario durante 1 hora en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad.

El medio contenía:

- PBS
- Anti-IgG de ratón fluorescente en dilución 1:200

Las secciones se lavaron 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo.

En este momento los cortes se incubaron con el segundo anticuerpo primario durante 12 horas en cámara húmeda y a 4° C. El medio de incubación estaba compuesto por:

- PBS
- Anticuerpo anti-NF en dilución 1:100

Se lavaron las secciones 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron en el medio del segundo anticuerpo secundario durante 1 hora en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. El medio contenía:

- PBS
- Anti-IgG de conejo fluorescente en dilución 1:200

5. Materiales y métodos

Las secciones se lavaron 3 x 10 min en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Por último, se realizó una tinción de los núcleos sumergiendo las secciones en solución de DAPI durante 10 min en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad, y se montaron los cortes con Vectashield® y cubreobjetos.

Segmentos pares:

Los segmentos pares se procesaron para microscopía electrónica de transmisión y para la obtención de secciones semifinas. Para ello necesitaron una fijación por inmersión de 24 horas en fijador de Palay a 4° C. Después de un lavado de 1 hora en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 en agitación moderada y a temperatura ambiente, estos bloques de tejido se incluyeron en resina Spurr y se seccionaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome, obteniéndose secciones semifinas (1 μ m de grosor) para su observación mediante microscopía de luz. También se obtuvieron secciones ultrafinas (30 – 40 nm de grosor) para su estudio mediante microscopía electrónica de transmisión.

Procesamiento para microscopía electrónica

Los bloques de tejido se refijaron en OsO₄ al 1% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 durante 2 horas en agitación continua y a temperatura ambiente. Se lavaron los bloques en PB frío 2 x 2 min para eliminar el exceso de OsO₄ y se deshidrataron en una serie de acetona de gradación creciente: 50° - 70° - 80° - 96° - 96° - 100° - 100°, acabando finalmente con dos baños de 15 min de óxido de propileno. Para preparar el tejido para la inclusión en resina, se sumergieron los bloques en una mezcla al 50% de óxido de propileno y resina Spurr durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se incluyeron los bloques orientados en moldes de plástico que contenían resina Spurr y se dejaron polimerizar durante 12 horas a 60° C. Una vez endurecida la resina, se tallaron los bloques y se obtuvieron los cortes con el ultramicrotomo, eligiendo las secciones que presentaban un color plateado.

Para observar la estructura general del corte a microscopía óptica se realizaron cortes semifinos (de 1 μ m de espesor). La sección semifina se recogió sobre un portaobjetos y se tiñó con solución de azul de Toluidina (1% de azul de Toluidina en solución de tetraborato sódico al 1%).

Para el estudio de la ultraestructura, se seleccionó una zona de interés y se retalló bloque. Se realizaron cortes ultrafinos de unos 300 Å. Los cortes se recogieron sobre rejillas de cobre electrolítico de 3 mm de diámetro y 200 - 300 mallas, sin ningún recubrimiento de soporte. Por último, se contrastaron las secciones mediante una doble tinción con acetato de uranilo durante 30 min y una solución de citrato de plomo durante 5 min. Para finalizar, se lavaron las rejillas 10 veces en H₂O y se dejaron secar sobre un papel secante.

5.2.4. Evaluación y procesamiento estadístico de los datos

Se tomaron imágenes con un microscopio Zeiss Axiophot que tiene acoplada una cámara digital y un filtro tricromático secuencial, controlados por el programa Spot[®], versión 2.0.7 (C.R.I. Cambridge Research Incorporated). Además, para la obtención de las imágenes panorámicas de la sección 6.1 de esta Tesis Doctoral se utilizó un microscopio Leica DM6000 equipado con epifluorescencia, cámara digital Leica DFC310FX y platina motorizada en los ejes X, Y y Z. Mediante el programa Leica AF6000 (Leica Microsystems, GmbH) se escanearon las preparaciones capturando imágenes contiguas que después se fusionaron automáticamente formando una composición de entre 64 y 96 imágenes, dependiendo de las dimensiones de la preparación. Posteriormente, todas las imágenes se procesaron digitalmente con el programa Adobe[®] Photoshop[®] CS3 (Adobe Systems Incorporated, <http://www.adobe.es>) para igualar el brillo, el contraste y el balance de color, y eliminar posibles artefactos del fondo.

El análisis histomorfométrico de las imágenes se realizó con el programa Image J 1.40g (National Institute of Health, EEUU). Para evaluar el progreso de la regeneración se calculó la distancia total en longitud recorrida por los axones NF⁺ desde el extremo del cabo nervioso proximal. La migración de las células de Schwann desde el cabo proximal se evaluó de manera análoga en secciones longitudinales inmunomarcadas para p75^{NTR}. Asimismo, se cuantificó el número total de axones mielinizados contando semiautomáticamente las figuras mielínicas de cuatro campos elegidos al azar correspondientes a secciones semifinas transversales. Estas secciones semifinas eran inmediatamente siguientes a la sección longitudinal. Para estimar la migración de las células de Schwann p75^{NTR} desde el cabo distal, se tomaron como referencia las figuras positivas en una franja 0.5

5. Materiales y métodos

mm anterior al nervio del cabo distal. Todas las medidas morfométricas fueron realizadas con el método doble ciego mediante la identificación de las secciones con un código no relacionado con su origen.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando test no paramétricos y el estadístico U de Mann-Whitney. Los resultados se expresan como medias \pm SEM. Se utilizó el programa InStat 3.1 para el análisis estadístico (GraphPad Software, Inc.).

El contenido impreso de esta Tesis Doctoral se elaboró con el procesador de texto Microsoft® Word® 2008 de Microsoft Corporation para Macintosh (<http://www.microsoft.com>) y con el gestor de referencias bibliográficas EndNote X3 (Thomson Reuters ©1998–2009).

6. Resultados

Una serie de experimentos previos a la elaboración de esta Tesis Doctoral y una exploración extensiva de la literatura existente en el momento, sirvieron para establecer el diseño de la bioprótesis para la reparación de lesiones de nervio periférico. Se evaluaron las propiedades físicas de los materiales empleados y su comportamiento como sustrato para la adhesión celular. A continuación se comentan brevemente algunos de los resultados obtenidos.

Para la construcción de la estructura tubular se eligieron inicialmente tres polímeros sintéticos bioabsorbibles: el quitosano, la ϵ -caprolactona, el ácido poli(L-láctico) y el ácido ácido poli(láctico-co-glicólico). El quitosano, aunque demostró un buen rendimiento como sustrato para la adhesión celular, se volvía rígido y deformable frente a diferentes condiciones de hidratación. De esta manera, la construcción de la estructura tubular presentaba grandes dificultades y evolucionaba modificando su forma original. Por el contrario, la ϵ -caprolactona tenía unas propiedades de maleabilidad y estabilidad estructural más convenientes. Este material era compatible en cultivo con numerosos tipos celulares, siendo un sustrato adecuado para la adhesión de cultivos primarios de células de Schwann de conejo neonato y de células RN 22 (figura 1A), una línea celular de schwannoma de rata, adquirida a ECACC (European Collection of Cell Culture). Sin embargo, la viabilidad de los cultivos era escasa pasados pocos días. El ácido poli(L-láctico) no presentó un buen comportamiento en cultivo, debido posiblemente, a la citotoxicidad de elevadas concentraciones de ácido láctico en el medio de cultivo por la hidrólisis del polímero. Por otro lado, el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) mostró un mejor rendimiento en cultivo a largo plazo que la ϵ -caprolactona (figura 1B).

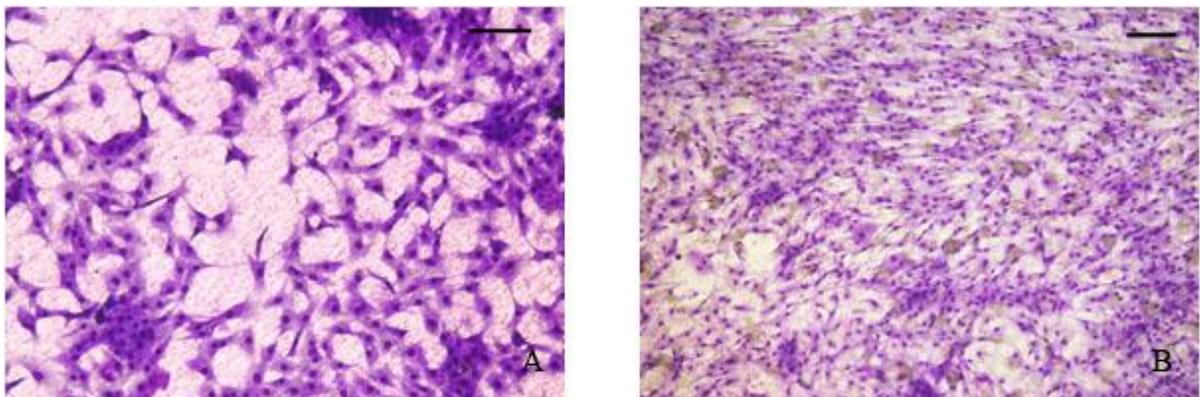


Figura 1: Ejemplos de cultivos de células RN 22 sobre láminas de ϵ -caprolactona (A) y PLGA (B). (Barras de escala: A 25 μ m y B 75 μ m).

6. Resultados

Las propiedades físicas del PLGA eran fácilmente modificables gracias a su estructura copolimérica. Variando la concentración de cada uno de los polímeros se conseguían las propiedades deseadas de plasticidad, resistencia a la rotura y rigidez. Estudiamos combinaciones de ácido láctico y ácido glicólico de 50/50, 75/25 y de 85/15, siendo esta última la elegida para la construcción de la estructura tubular. La superficie de las láminas de copolímero 85/15 presentaban un aspecto liso y poroso a microscopía electrónica de barrido (figura 2).

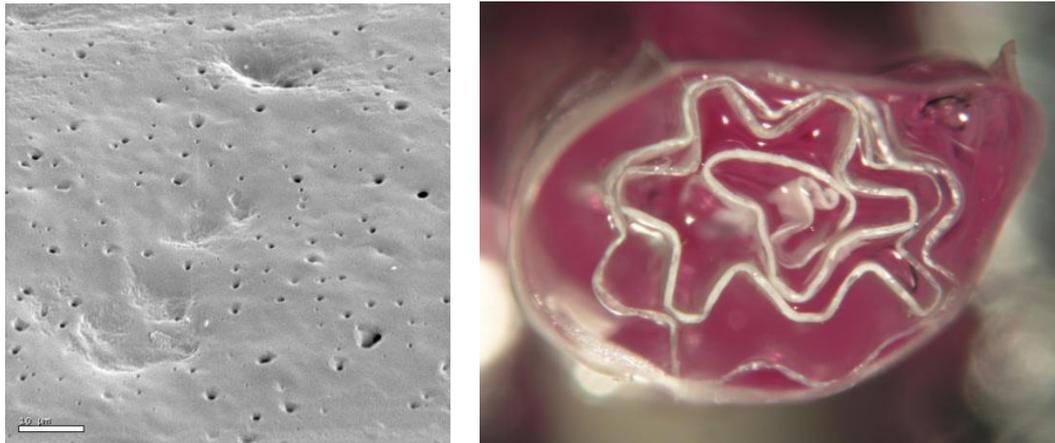


Figura 2: En la micrografía de la izquierda, aspecto a microscopía electrónica de barrido de la superficie de una lámina de PLGA 85/15 (barra de escala: 10 μm). La imagen de la derecha muestra la sección transversal de un modelo de prótesis construida con láminas plegadas de PLGA arrolladas en el interior para formar compartimentos semejantes a fascículos nerviosos.

Decidimos crear la pared exterior del conducto de manera que tuviera dos capas de PLGA, para dotarla de mayor resistencia a la torsión. En el interior del conducto introducimos dos láminas de 30 mm de largo x 3 mm de anchura a modo de andamiaje interno para evitar el colapso del tubo. Además, estas láminas internas crean cámaras interiores que pretenden imitar los compartimentos fasciculares de un nervio. Para llegar a elegir este modelo, previamente realizamos experimentos de corta duración implantando distintos diseños de conducto en neurectomías de nervio ciático de rata. Los conductos sin estructura interna se colapsaban con frecuencia debido al movimiento del animal y la regeneración estaba interrumpida. Diseñamos una estructura interna de láminas de PLGA plegadas y enrolladas sobre si mismas, que imitaba la compartimentalización en fascículos de un nervio periférico y aumentaba la superficie adhesiva para las células (figura 2). Aunque el diseño era bueno, los espacios creados entre las láminas se obstruían con facilidad, retrasando la regeneración nerviosa. Este modelo fue finalmente desechado.

Como materiales para la matriz interna del conducto se probaron también diferentes estrategias, como la utilización de coágulos de fibrina, Matrigel® o los hidrogeles de alginato. La fibrina es un buen sustrato para el crecimiento de los axones, aunque su estructura amorfa puede inducir a una mala orientación de las fibras nerviosas. Además, la contracción del coágulo a temperatura fisiológica y su rápida reabsorción podrían causar la desaparición de la matriz antes de la progresión de la regeneración, suprimiendo sus efectos beneficiosos como sustrato. Tampoco obtuvimos buenos resultados utilizando Matrigel® como material de relleno. Decidimos incluir el alginato sódico como matriz porque no es hidrolizable y permanece estable en el interior del conducto. Además, protege de la hidrólisis a los factores de crecimiento que se le añaden, manteniéndolos disponibles durante largos periodos de tiempo.

La colocación de las prótesis no supuso ningún problema una vez dominadas unas sencillas técnicas microquirúrgicas. Pudimos comprobar que, durante el proceso quirúrgico, el constructo mantenía íntegra su estructura. La pared exterior de ácido poli(láctico-co-glicólico), consistente en dos vueltas de lámina de polímero, no se desenrollaba al ser colocada. Tampoco observamos que las láminas internas de PLGA fueran extruídas a consecuencia de la manipulación, ni que la matriz interna de hidrogel de alginato tendiera a salir. No se observaron comportamientos higroscópicos en el constructo cuando se ponía en contacto con soluciones de lavado. Además, el PLGA era fácilmente atravesado por la aguja de sutura y presentaba una relativa plasticidad y gran resistencia a la rotura en los puntos de tensión producidos por las suturas (figura 3D).

Con nuestra técnica de abordaje, que respeta la integridad de los paquetes musculares, conseguimos evitar la aparición de hemorragias en el campo quirúrgico. La presencia de sangre era mínima como se puede observar en las figuras 3B y 3C. La recuperación postquirúrgica de los conejos fue rápida y el aspecto externo de la cicatriz epitelial era de completa reparación pocos días después (figura 3E).

Los conductos permanecieron intactos sin romperse hasta el momento de ser extraídos. Los extremos proximal y distal del nervio mantuvieron su adherencia al conducto mediante las microsuturas. No se identificaron reacciones inflamatorias significativas y no hubo neuromas aparentes. La extracción del implante requirió la disección de tejido muscular firmemente adherido, indicando una incorporación tisular, vascularización y degradación del polímero (figura 3F).

6. Resultados

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron únicamente con secciones obtenidas de las partes centrales del conducto (segmentos 2 y 4). En los grupos de 15 días no se realizaron estudios de microscopía electrónica ya que el tejido nervioso en regeneración no había alcanzado aún las cotas elegidas para el estudio.

A continuación se describen los patrones de distribución de los marcadores empleados en cada uno de los grupos temporales.

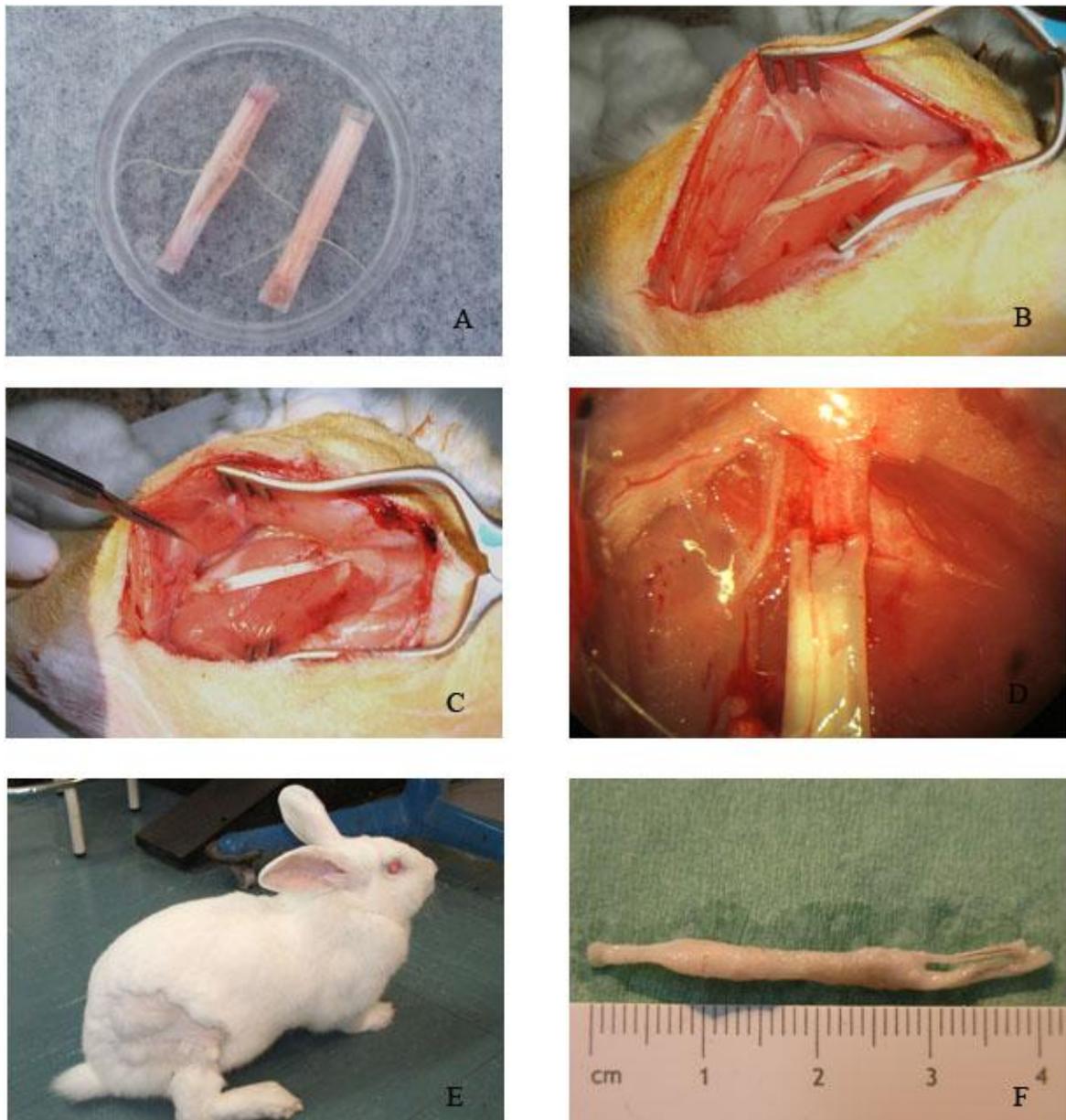


Figura 3: Dos prótesis de ácido poli(láctico-co-glicólico) y gel de alginato en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro, preparadas para ser implantadas (A). Se anudan para facilitar su manipulación y para mantener su forma tubular al principio. En el momento de la cirugía estas ligaduras se retiran y el conducto no se desorganiza. En B, el nervio ciático del conejo expuesto al nivel de la sección. Los paquetes musculares no se desgarran y el campo quirúrgico es limpio. En C se observa la prótesis una vez implantada cubriendo un espacio de 30 mm entre los cabos nerviosos seccionados. Detalle de las suturas entre el epineuro y la pared polimérica del conducto en el extremo proximal de la lesión (D). A los pocos días de la cirugía el miembro operado presenta un aspecto exterior totalmente cicatrizado y sin rastros de inflamación (E). El conejo adopta una posición normal y apoya la pata, ligeramente desplazada, ya que no es capaz de moverla voluntariamente más allá de la rodilla. F: Injerto extraído al cabo de 75 días. El polímero está degradado y ha sido reabsorbido en parte. Los cabos nerviosos muestran una vascularización recuperada.

6.1. Grupo 15 días

La observación macroscópica de los implantes extraídos tras 15 días de supervivencia reveló que la estructura polimérica exterior de la prótesis permanecía prácticamente intacta. Sin embargo, se presentaba totalmente rodeada de tejido fibroso que anclaba la prótesis al tejido muscular circundante a modo de mesoneuro. La región del conducto donde se practicaron las suturas se presentaba también cubierta por una capa de tejido fibroso y no se observaron discontinuidades en las zonas de unión. Asimismo, no se observaron señales de hemorragias o coágulos.

Por otro lado, los tejidos circundantes no presentaron signos de inflamación debida a la práctica quirúrgica ni se observaron signos de reacción a cuerpo extraño. A los 15 días de supervivencia, en ninguno de los casos se consiguió la colonización completa del conducto, quedando su parte central vacía, ocupada tan sólo por el hidrogel de alginato.

Explicaremos los resultados de esta sección comenzando por la región proximal a la lesión y siguiendo el crecimiento de los elementos neurales en sentido anterógrado. En segundo lugar se comentarán los fenómenos sucedidos en el cabo distal de la lesión, siguiendo su progresión hacia el interior de la prótesis, en sentido retrógrado.

6.1.1. Grupo 1. Implantes sin NRG1 durante 15 días

En el extremo proximal del tronco nervioso se observaron evidencias de los mecanismos de degeneración y degradación sufridos después de la neurotmesis. A los 15 días del implante de los conductos no suplementados con NRG1, se apreciaron en el tronco nervioso signos de degeneración de las fibras nerviosas en la zona seccionada. Al ser seccionadas, las fibras nerviosas (en su mayoría mielinizadas) sufrieron un proceso degenerativo en el cabo proximal que afectó aproximadamente a la distancia de dos o tres segmentos internodales. El axoplasma desorganizado ha sido fagocitado rápidamente por células de Schwann o por macrófagos residentes. A su vez, la célula de Schwann se desdiferencia y mantiene en su interior la mielina desorganizada hasta la llegada de los macrófagos hematógenos, evitando así el efecto tóxico de la mielina en el microambiente neural. A los 15 días de la lesión, en nuestro estudio no se encontraron restos de estos mecanismos fagocitarios en el tronco nervioso y sí fueron apreciables signos de reparación y regeneración. Las células de Schwann que perdieron el contacto axonal proliferan rápidamente. Estas células pierden la expresión detectable de la proteína S100 y expresan marcadores presentes en CS inmaduras y en CS no mielinizantes, tales como p75^{NTR} y GFAP. En nuestro estudio, hemos utilizado p75^{NTR} como marcador de las células de Schwann no mielinizantes e inmaduras (figura 4).

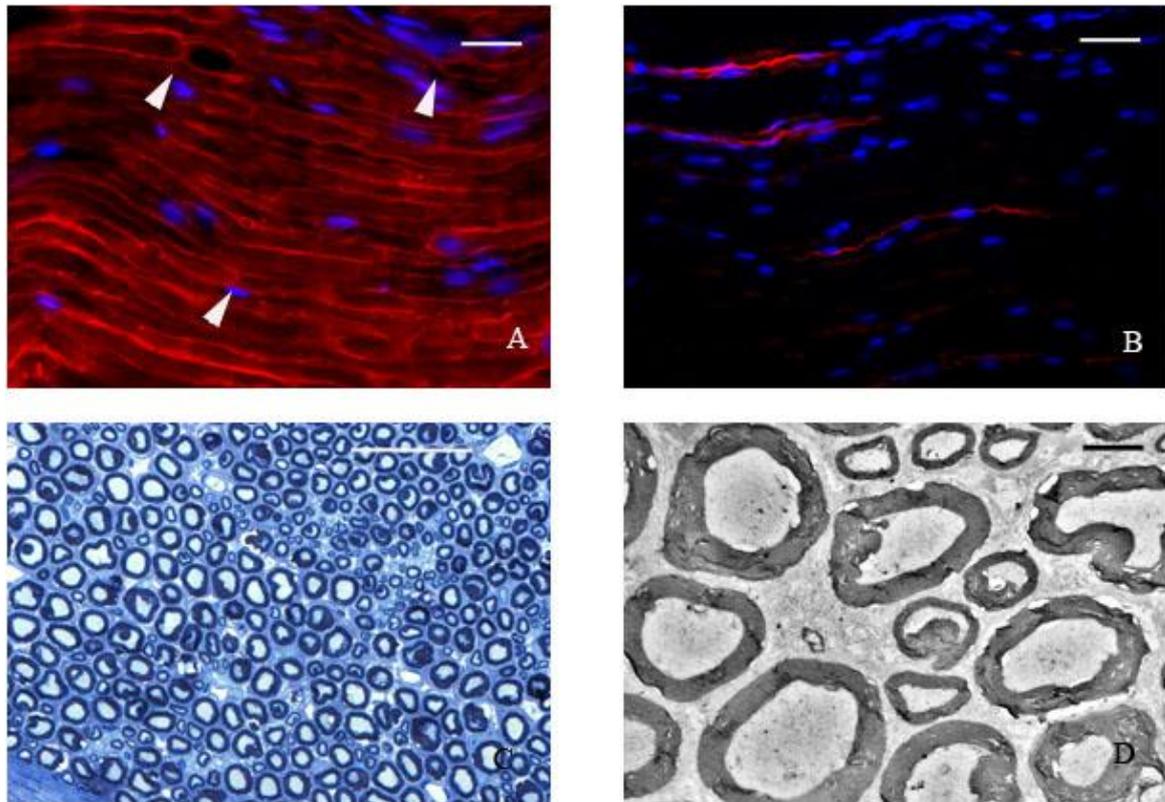


Figura 4: Nervio periférico no dañado. En A, aspecto general del nervio ciático del conejo demostrado con anticuerpos contra la proteína S100. La proteína se acumula en el citoplasma y está desplazada a la periferia. Se observan nodos de Ranvier (puntas de flecha) característicos de las fibras nerviosas mielinizadas. En B, algunas células de Schwann amielínicas son positivas para el anticuerpo anti-p75^{NTR}. C: Sección transversal semifina de un nervio de conejo en la que se aprecian los axones como lagunas claras rodeados por una vaina de mielina oscura. También pueden observarse vasos sanguíneos. D: Detalle de la sección anterior tomado con microscopía electrónica de transmisión. Entre las fibras mielinizadas se encuentran numerosas fibras amielínicas. (Barras de escala: A y B 25 μm , C 50 μm y D 5 μm).

Los axones seccionados comienzan a emitir múltiples ramificaciones a partir del último nodo de Ranvier intacto. Esta zona en el nervio constituye un límite que separa la porción de nervio no afectado por la lesión de la porción en proceso de regeneración. Ambas pudieron ser distinguidas fácilmente a los 15 días por el fenotipo de las células de Schwann presentes. Encontramos que en la porción de nervio no afectado, la inmensa mayoría de las células de Schwann expresaban la proteína S100, estaban asociadas a un único axón y su morfología era la esperada para una fibra nerviosa mielinizada: se observaron fácilmente los nodos de Ranvier y las características formas alargadas y cilíndricas de las CS. Las fibras nerviosas se disponían ordenadamente unas junto a otras formando haces (figura 5A). Sin embargo, en la porción regenerativa encontramos CS en un número muy elevado. Estas células no presentaban niveles detectables de S100 en su citoplasma pero se marcaron intensamente con el anticuerpo contra p75^{NTR}. Estas CS se encontraron

6. Resultados

asociadas a las ramificaciones de los axones que crecían en dirección al conducto (figura 5C). Se encontraron escasísimas células $p75^{NTR+}$ en la porción de nervio no afectado (figura 5B).

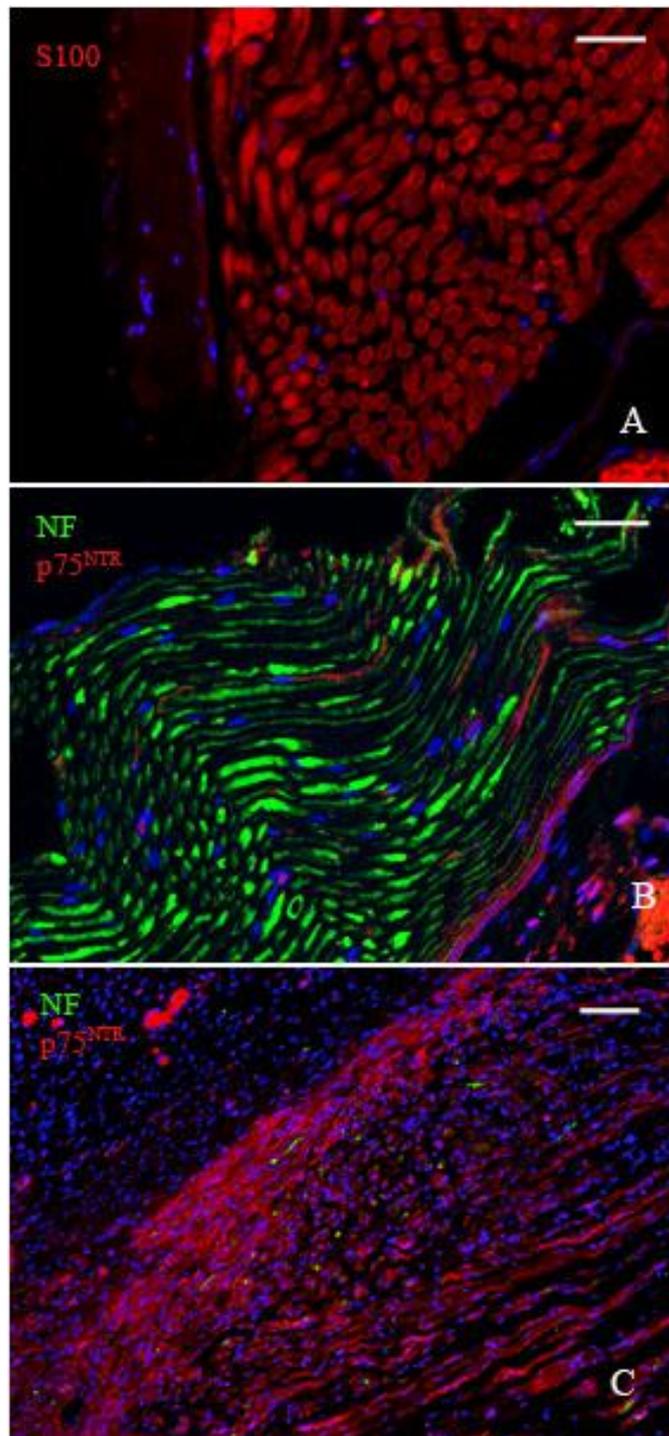


Figura 5: Región no afectada por la degeneración en el cabo nervioso proximal de un animal no tratado con NRG1 (A). El marcaje $S100^+$ está restringido al tejido del nervio y representa fibras nerviosas no afectadas por la degeneración. En B, una sección similar muestra la distribución normal de los axones (NF^+) y escasos elementos $p75^{NTR+}$. En el tejido regenerativo del extremo proximal se encuentran numerosas células de Schwann $p75^{NTR+}$ acompañando a axones en regeneración (D). (Barras de escala: 75 μm en A y C y 50 μm en B).

Tras 15 días de supervivencia, observamos la creación de un nuevo tejido ocupando el espacio entre el extremo del nervio (suturado por el epineuro al borde del conducto) y el armazón interno del conducto. Se trata de un tejido conjuntivo con abundantes fibroblastos y bien vascularizado que también contiene elementos del tejido nervioso en regeneración. Estos tejidos se habrían generado a partir del tronco nervioso y de los tejidos adyacentes. Aunque se diseñaron las prótesis biosintéticas para que fueran de un diámetro uniforme y similar al del nervio ciático del conejo (aproximadamente 3 mm), se permitió un pequeño margen para favorecer la coaptación quirúrgica, de manera que el extremo del tronco nervioso quedara adecuadamente embocado hacia el interior del tubo. Esta pequeña diferencia se puede apreciar en algunas secciones histológicas en las que es patente el mayor grosor del tejido neoformado en comparación con el del tronco nervioso.

En este estadio, se eligieron dos criterios para la evaluación de la regeneración nerviosa: el progreso en distancia de los axones y la migración de las células de Schwann desde el nervio hacia la luz de la prótesis biosintética. Se midieron tomando como punto de origen el límite entre la porción intacta y la porción regenerativa del nervio.

El examen de las secciones longitudinales procesadas para inmunofluorescencia (segmento 1) reveló que los axones, identificados por su inmunoreactividad a NF 200 kD, se ramifican inicialmente y avanzan en direcciones aleatorias. A medida que avanzan tienden a alinearse con el eje mayor del nervio y a orientarse en dirección a la luz del conducto. El avance total observado de las fibras NF⁺ en el grupo de los implantes sin NRG1 fue de 4.24 ± 0.15 mm (media \pm SEM) desde la zona de desorganización de las fibras nerviosas. Este cálculo supone una velocidad aproximada de crecimiento de los axones de 0.28 mm por día durante los 15 primeros días. El diámetro de los axones en regeneración es notablemente menor que el diámetro de los axones de un nervio no dañado (figura 5B). Numerosas células de Schwann en migración acompañaban a los axones en regeneración en su trayecto hacia el conducto. Estas células resultaron positivas para p75^{NTR} y no expresaban la proteína S100. En la región más cercana al nervio las CS se asocian a varios axones y forman delgados cordones. En regiones más alejadas (más próximas al inicio del conducto) las CS p75^{NTR+} presentaban un aspecto filiforme y se encontraron adyacentes a prolongaciones axonales de pequeño calibre. Algunas CS p75^{NTR+} fueron observadas ais-

6. Resultados

ladas en las regiones más cercanas al conducto, sin que se apreciase ningún axón asociado.

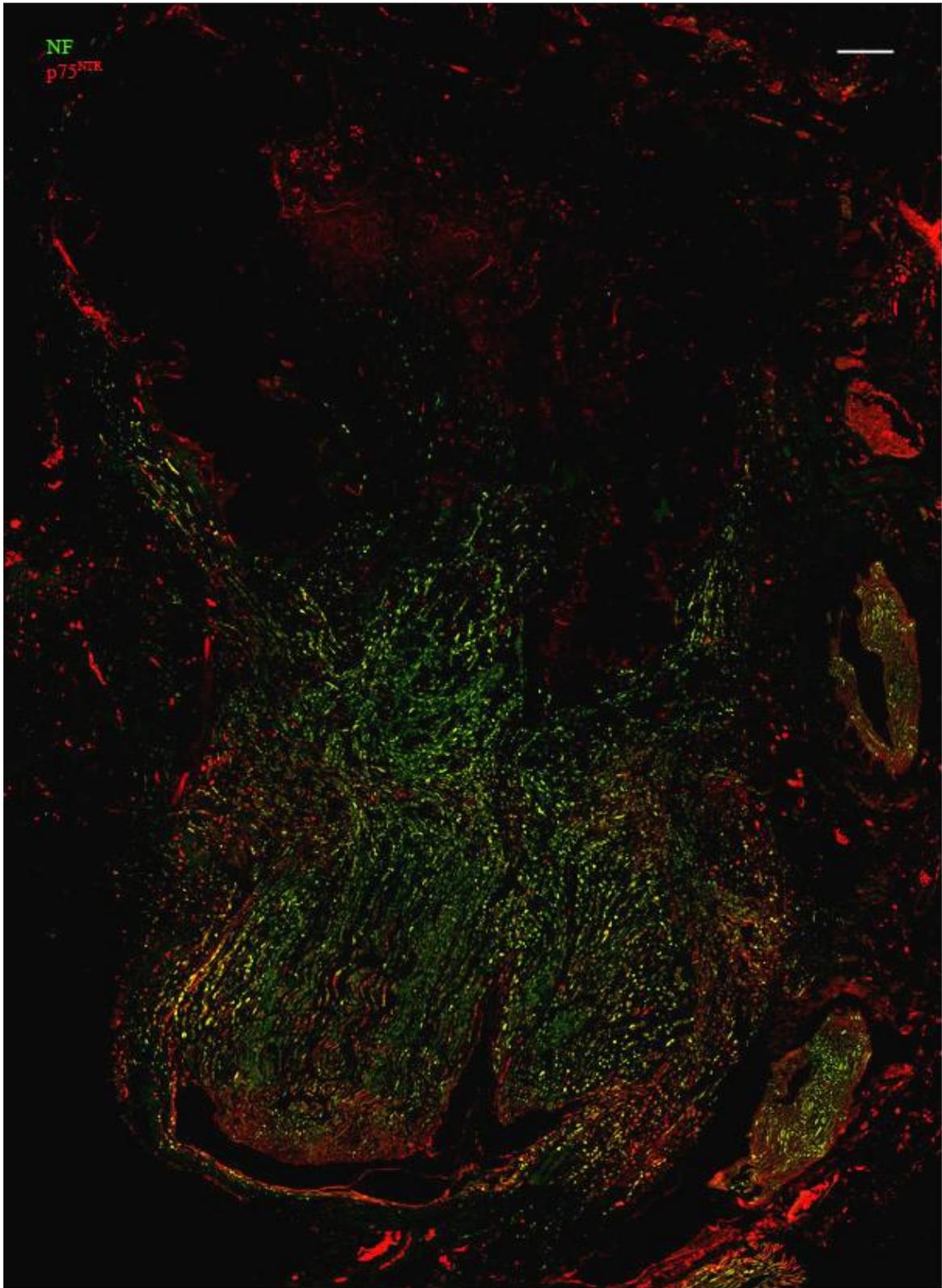


Figura 6: Composición de micrografías mostrando en su total longitud el primer segmento de uno de los injertos no suplementados con NRG1 extraídos tras 15 días. La parte inferior de la imagen es la más cercana al cabo nervioso proximal. En la parte superior se pueden apreciar tabiques de polímero no colonizados por células y cavidades correspondientes a la luz del conducto. Los axones NF^+ avanzan un total de 4.24 ± 0.15 mm. Se observa una extensión similar de las células de Schwann $p75^{NTR+}$. (Barra de escala: 250 μm).

6. Resultados

Más allá del frente de avance de los axones, la observación de secciones transversales semifinas del conducto a 8 mm de la sutura proximal (segmento 2) reveló que la prótesis se encontraba prácticamente vacía, invadida por escasos elementos celulares que formaban un tejido laxo. En este tejido, probablemente construido por fibroblastos (con núcleos oscuros y nucleolos prominentes), se encontraron algunos capilares sanguíneos. Además, algunas células con núcleo pálido y citoplasma claro podrían ser identificadas como células de Schwann. La mayor parte de la luz del tubo, sin embargo, estaba ocupada por masas de hidrogel de alginato aun sin degradar con aspecto de materia amorfa. Entre las masas de alginato o adheridos a las láminas de PLGA, se observaron numerosos monocitos y polimorfonucleares que podrían representar elementos extravasados. No se apreciaron axones en regeneración mielinizados en ninguna de las secciones estudiadas (figura 7).

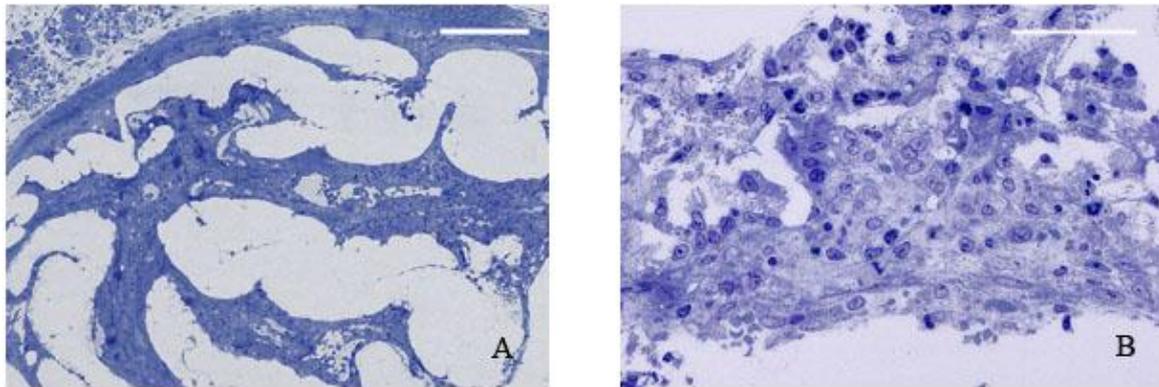


Figura 7: Vista general de la sección transversal del injerto al nivel del segmento 2 (A). El interior del conducto está parcialmente ocupado por tabiques de tejido en formación. Las cavidades representan el espacio ocupado por las láminas internas de ácido poli(láctico-co-glicólico). En B se puede apreciar que el tejido está formado en su mayoría por fibroblastos (núcleos oscuros) y otras células de núcleos pálidos que podrían ser células plasmáticas. (Azul de toluidina. Barras de escala: A: 200 μ m y B: 50 μ m).

En la parte central del tubo (segmento 3) no se encontraron elementos celulares de ningún tipo a excepción de una cubierta conjuntiva exterior a la prótesis. En todo caso, la luz del tubo contenía monocitos o neutrófilos dispersos en la matriz de alginato.

En el cabo distal (segmento 5) se observaron los eventos típicos de la degeneración walleriana. En la parte final del injerto extraído, donde se localiza el extremo distal del nervio seccionado, se apreciaron numerosas estructuras que contenían restos de elementos neurales en degeneración, lo que se conoce con el nombre de cámaras de digestión o bolas de degeneración. Estas cámaras son residuos de mielina y axoplasma englobados por

macrófagos o por células de Schwann con funciones autofágicas. Los residuos de axones en degeneración se identificaron gracias a su inmunoreactividad al anticuerpo anti-neurofilamentos 200 kD (NF). En el cabo distal denervado se produce la desdiferenciación y la proliferación masiva de las células de Schwann y la formación de bandas de Büngner. De esta manera, encontramos un cambio en el patrón de expresión de las células de Schwann en el nervio degenerado a lo largo del tiempo. En un tronco nervioso mixto no dañado la mayoría de las células de Schwann se asocian a un único axón al que rodean con una vaina de mielina (CS mielinizantes) y expresan la proteína S100 en su citoplasma de manera característica. Una pequeña población de CS (no mielinizantes) se asocian a axones de pequeño calibre y expresan preferentemente marcadores como $p75^{\text{NTR}}$ y GFAP (figura 4). Sin embargo, encontramos que en el cabo distal seccionado, 15 días después del implante, las CS pierden casi por completo la expresión de la proteína S100 (registrable con métodos inmunohistoquímicos), mientras que la inmensa mayoría de ellas podían ser detectadas con el anticuerpo anti- $p75^{\text{NTR}}$. Estas células de Schwann desdiferenciadas, que han perdido el contacto axonal, experimentaron un incremento significativo en su número, como se puede apreciar comparando el número de núcleos de CS en el cabo distal del nervio tras 15 días de lesión (núcleos teñidos con DAPI correspondientes a células $p75^{\text{NTR}+}$) con el número de núcleos de células de Schwann $S100^+$ de un nervio no dañado (ver figuras 4A y 8).

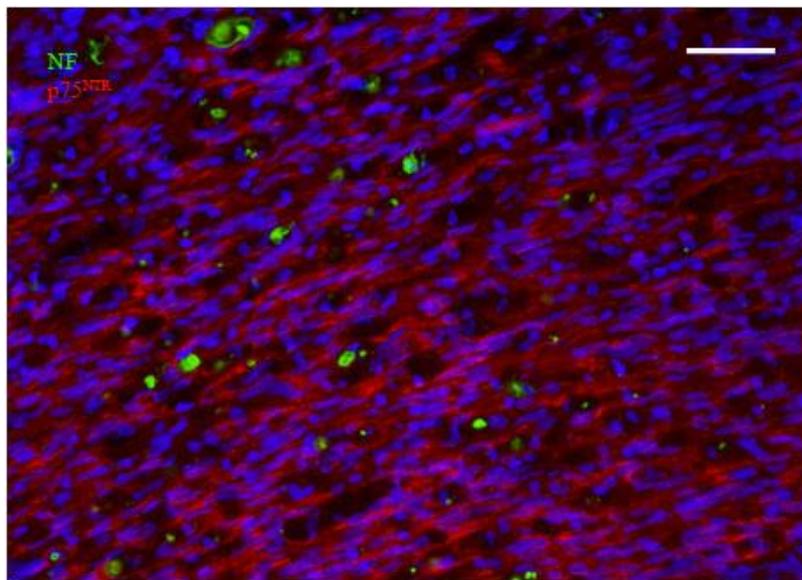


Figura 8: En el nervio distal degenerado se observan signos de la degeneración walleriana. Los residuos de axones (NF^+) se encuentran aislados en cámaras de digestión. Las células de Schwann han perdido la morfología típica de las células mielinizantes. Ahora tienen un aspecto filamentososo y presentan el receptor $p75^{\text{NTR}}$ en su superficie. La densidad de células de Schwann en el ner-

6. Resultados

vio se ha multiplicado (comparar con figura 2A). (Cabo nervioso distal de un injerto de 15 días no suplementado con NRG1. (Barra de escala: 50 μm).

En secciones semifinas posteriores (en sentido anterógrado), se encontraron numerosos macrófagos en el tejido nervioso lesionado identificables por su citoplasma basófilo cargado de grandes vesículas digestivas. También se pudieron observar grandes cámaras de digestión que contenían ovillos oscuros de material lipídico correspondientes a vainas de mielina en degeneración.

Además, desde el cabo nervioso distal y los tejidos adyacentes se generó un tejido nuevo que se extendía, en sentido retrógrado, hacia la prótesis tubular. Este tejido estaba compuesto en su mayor parte por fibroblastos y presentaba vasos sanguíneos. También fueron observadas células de Schwann inmaduras $p75^{\text{NTR}+}$ en este estroma fibroso en las cercanías del cabo nervioso. En esta región las CS se asociaban en forma de haces o cordones de 3 a 4 células. No se halló marcaje para S100 en ninguno de los casos estudiados. Las células de Schwann identificadas no se encontraban en las proximidades de la prótesis. En esta región neoformada tampoco se detectaron restos de neurofilamentos correspondientes a cámaras de digestión. El crecimiento del tejido conjuntivo y el avance de las CS hacia el interior del conducto no alcanzaron en ningún caso la cota del segmento 4. En estas secciones semifinas tan sólo fueron observados algunos macrófagos entre el hidrogel de alginato o cerca de las láminas de PLGA. El interior del conducto a este nivel se encontraba totalmente vacío de otros elementos celulares (figura 9).

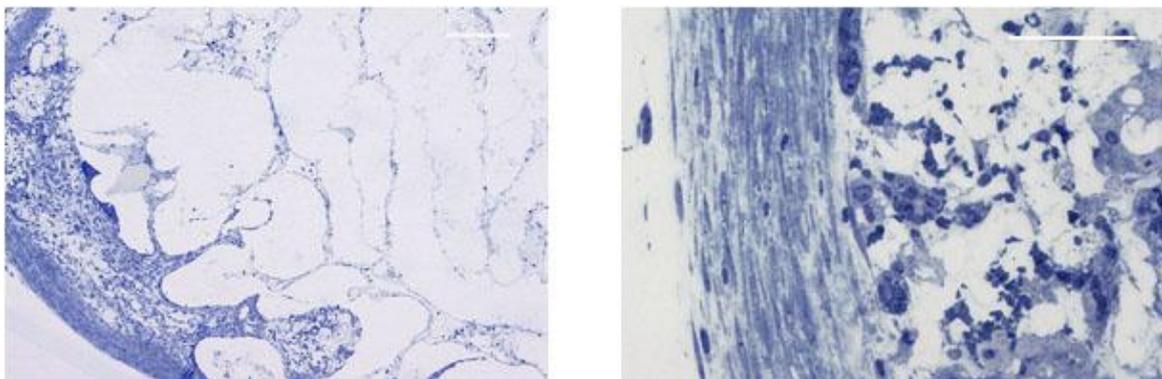


Figura 9: Secciones semifinas correspondientes al segmento 4 de prótesis sin NRG1 implantadas durante 15 días. En A, vista general de la sección transversal del conducto. La mayor parte del interior del conducto está vacío. La imagen B muestra lo que parece un tejido de granulación laxo en la pared interna de la prótesis. (Barras de escala: A 200 μm y B 50 μm).

6.1.2. Grupo 2. Implantes suplementados con NRG1 durante 15 días

En los injertos suplementados con NRG1, extraídos a los 15 días de la cirugía, se encontraron algunas diferencias con respecto al grupo no tratado. Otras observaciones fueron similares. Comenzando por el extremo proximal, en el nervio pudimos observar dos porciones bien diferenciadas. La más alejada del conducto, correspondiente a la porción de nervio no afectada por la lesión, y la zona de la lesión propiamente dicha. En el nervio no afectado pudimos comprobar que se mantenía inalterada la morfología del nervio y de las fibras nerviosas que lo componen. De esta manera observamos que la mayoría de las fibras nerviosas eran fibras mielinizadas y que las fibras discurrían paralelas a lo largo del tronco nervioso en un patrón normal. La mayoría de los axones presentaban un diámetro grande, coincidente con el de las fibras motoras, por ejemplo. Estaban rodeados por células de Schwann mielinizantes, de forma cilíndrica y alargada y con núcleos parietales y alargados. Los nodos de Ranvier podían identificarse fácilmente. Además, presentaban un intenso marcaje para la proteína S100 (figura 10A). En las áreas de nervio más próximas a la lesión se observaron también numerosas CS $p75^{NTR+}$ junto a axones de gran calibre (figura 10B).

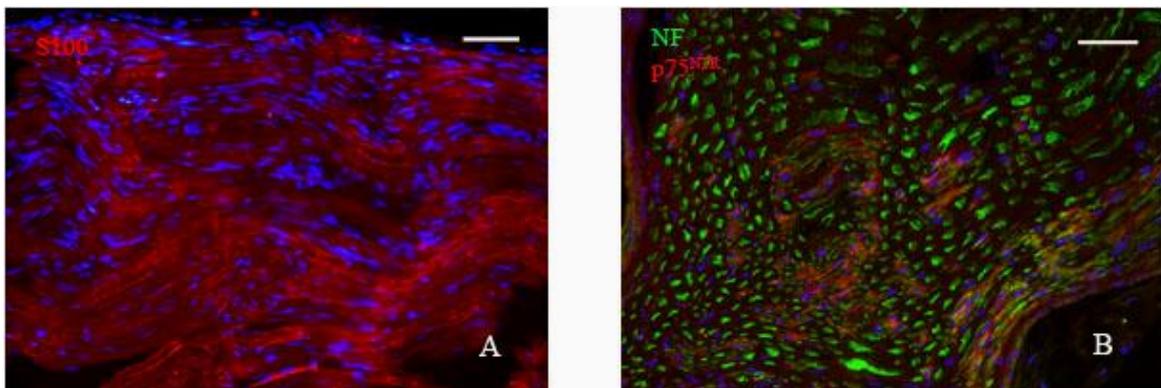


Figura 10: Aspecto general del cabo nervioso proximal no afectado por los efectos de la neurectomía en injertos suplementados con NRG1 y extraídos a los 15 días de ser implantados. En A, las fibras nerviosas se disponen ordenadas paralelamente y presentan un fuerte marcaje para S100. Su morfología es comparable a la de un nervio normal aunque se observa una superpoblación de elementos celulares, identificados por la tinción nuclear con DAPI (comparar con la figura 2A). B es un corte homólogo a A en el que se aprecia el número relativamente pequeño de células de Schwann $p75^{NTR+}$ (amielínicas). Sin embargo, este número parece ser algo mayor que en el injerto no tratado con NRG1 (ver figura 5B). Los axones presentan una sección gruesa. (Barras de escala: A 75 μm y B 50 μm).

6. Resultados

En el punto donde se produjo la sección del nervio se inicia el crecimiento de los axones en regeneración. Estos axones presentaban un diámetro menor que el que se observó en la porción de nervio no afectado. Los axones en regeneración se extendían hacia el interior de la prótesis (en sentido anterógrado) atravesando un tejido conjuntivo generado para solucionar el espacio vacío en el conducto a partir de los tejidos adyacentes. En este grupo suplementado con NRG1, los axones consiguieron extenderse una distancia total de 5.83 ± 0.27 mm (media \pm SEM) medida desde el límite entre la porción de nervio no afectado y la porción regenerativa. Este dato supone un crecimiento medio diario de 0.39 mm en los primeros 15 días bajo tratamiento con NRG1. Los axones en regeneración mostraron una orientación ordenada según el eje mayor del nervio, formando habitualmente haces paralelos de fibras. Se encontró un gran número de axones penetrando grandes distancias en el interior del conducto, extendiéndose a lo largo de la pared interior del tubo y también por la zona luminal del armazón de PLGA (figura 11).

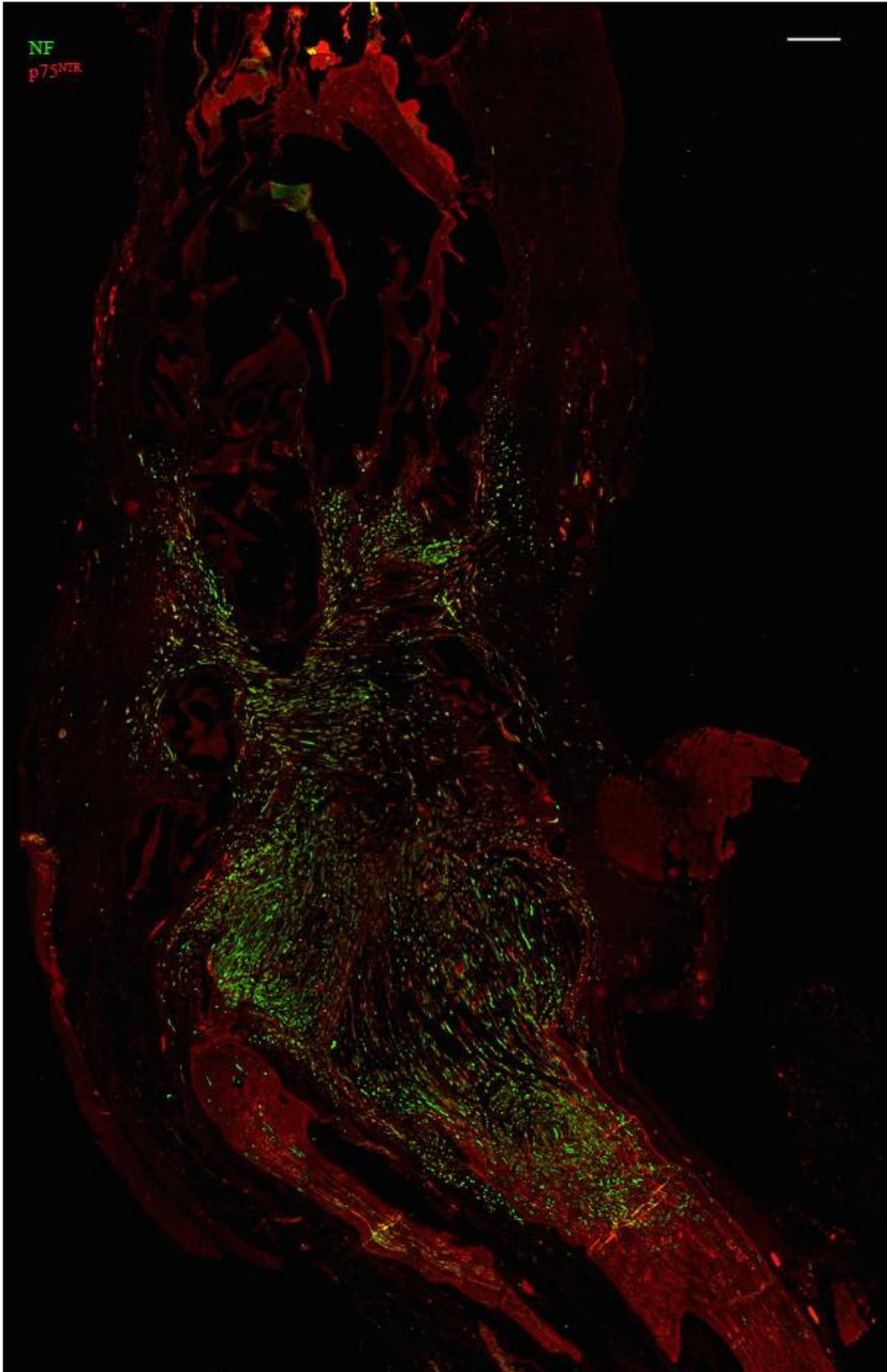


Figura 11: Composición de micrografías representando el primer segmento completo de un injerto suplementado con NRG1 y extraído tras 15 días. La parte inferior de la imagen es la más cercana al cabo nervioso proximal. En la parte superior se pueden apreciar numerosos axones NF^+ penetrando en el conducto. Los axones NF^+ avanzan un total de 5.83 ± 0.27 mm. Se observa una extensión similar de las células de Schwann $\text{p75}^{\text{NTR}+}$. (Barra de escala: $250 \mu\text{m}$).

6. Resultados

De la misma manera que en el grupo de conejos con implantes no suplementados con NRG1, en el tejido regenerativo del extremo proximal (correspondiente al segmento 1) se observó un gran incremento en el número de células de Schwann. Estas CS no mostraron inmunorreactividad a la proteína S100 y por el contrario, presentaron una fuerte expresión de $p75^{\text{NTR+}}$. Las células de Schwann $p75^{\text{NTR+}}$ mostraron una distribución coincidente con el marcaje NF^+ . En secciones histológicas doblemente inmunoteñidas para los anticuerpos anti-NF 200 kD y anti- $p75^{\text{NTR}}$ se pudimos demostrar la estrecha asociación entre axones y CS inmaduras (figura 12). En las regiones más cercanas al cabo del nervio proximal, varias CS $p75^{\text{NTR+}}$ se asociaban formando cordones entre los que discurrían numerosos de axones (figura 12B). En regiones más alejadas en sentido anterógrado, las delgadas prolongaciones axónicas se asociaban a perfiles $p75^{\text{NTR+}}$ de aspecto filamentoso (figura 12C). Sin embargo, encontramos elementos positivos a $p75^{\text{NTR}}$ adentrándose en la prótesis a distancias mayores que las alcanzadas por los axones NF^+ (en sentido anterógrado).

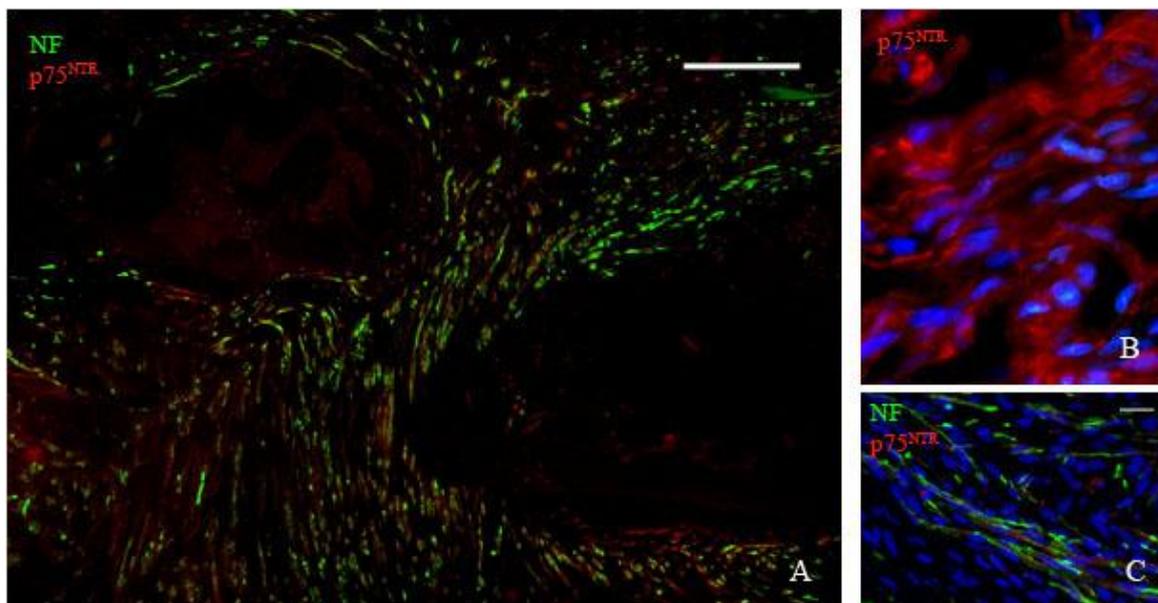


Figura 12: Extremo proximal del injerto. Imagen de baja magnificación que muestra cordones de axones (NF^+) asociados a células $p75^{\text{NTR+}}$. Los axones rodean láminas de polímero y avanzan hacia el interior de un conducto suplementado con NRG1 (A). En B se observan grupos de células de Schwann $p75^{\text{NTR+}}$ asociadas formando cordones. Estas asociaciones son frecuentes en las proximidades del nervio. Sin embargo, las células de Schwann muestran un aspecto filamentoso cuando se asocian a axones en regeneración de pequeño diámetro en zonas más alejadas (C). (Barras de escala: A 250 μm , B y C 25 μm).

En cuanto a las secciones semifinas siguientes (segmento 2), tan sólo en dos individuos de este grupo se observó colonización de tejido en la luz del conducto. Los otros dos

individuos no presentaban ninguna organización tisular en el interior del conducto a este nivel. La luz de la prótesis sólo contenía residuos de alginato con estructura amorfa. En los dos primeros conductos, el tejido rellenaba pequeños espacios entre las láminas de PLGA y el hidrogel de alginato. Este tejido contenía fibroblastos, células plasmáticas y, posiblemente células de Schwann, identificables por presentar núcleos claros, con nucleolos aparentes y cromatina descondensada. Al menos en estos dos casos, se dio una migración de estos elementos a mayor distancia en sentido anterógrado que en el implante sin NRG1. Se observó también la presencia de macrófagos con numerosas vesículas fagocíticas y células gigantes generadas probablemente a partir de la fusión de varios macrófagos. Además, el nuevo tejido formado contenía numerosos capilares de distintos calibres, en ocasiones conteniendo eritrocitos. No se observó la presencia de axones mielinizados en ninguna de las secciones estudiadas.

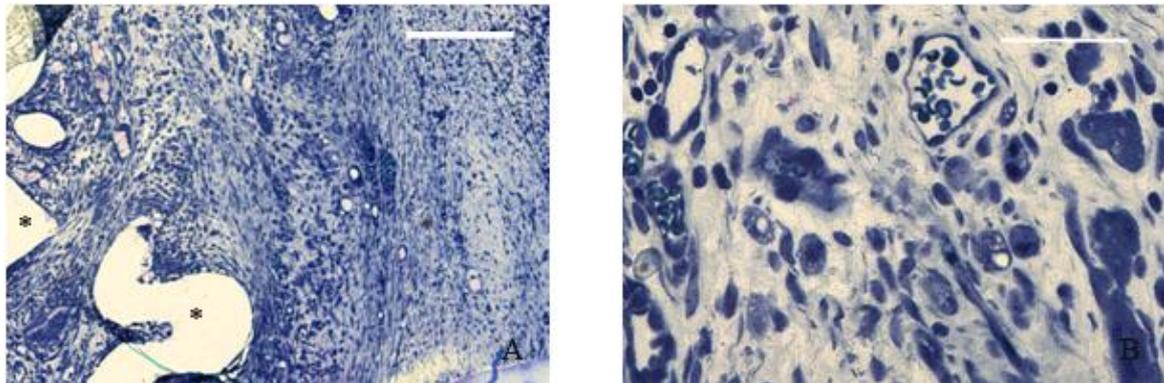


Figura 13: Secciones semifinas correspondientes al segmento 2 de prótesis suplementadas con NRG1 y extraídas a los 15 días. En A se observa la luz del conducto totalmente ocupada por tejido de nueva formación, a excepción de las zonas ocupadas por las láminas interiores de ácido poli(láctico-co-glicólico) (asteriscos). En B, un detalle del tejido que ocupa el interior del conducto, donde se pueden apreciar capilares, fibroblastos y macrófagos. (Barras de escala: A 200 μm y B 50 μm).

En la parte central del implante (segmento 3) correspondiente a estos dos individuos, se encontraron masas de tejido conjuntivo sin presencia de elementos positivos a ninguno de los marcadores estudiados (S100, p75^{NTR} y NF 200 kD). Este tejido contenía vasos sanguíneos y fue localizado tapizando los primeros milímetros de la superficie interior del conducto en sentido anterógrado.

A continuación se exponen los resultados observados en el extremo distal de los implantes suplementados con NRG1. El sentido del avance del crecimiento de los diferentes tejidos en esta ocasión, es retrógrado.

6. Resultados

En el nervio ciático denervado todavía fueron encontrados residuos globulares NF^+ correspondientes a restos de axones degenerados. Estos residuos estaban contenidos en cámaras de digestión. Encontramos que, en estas condiciones, las cámaras de digestión parecían estar delimitadas por elementos $\text{p75}^{\text{NTR}+}$, lo que nos hace pensar que podrían tratarse de células de Schwann con funciones macrofágicas (figura 14C). Tan sólo fueron detectadas unas cuantas células de Schwann S100^+ en el nervio distal (figura 14B). Ninguna otra célula S100^+ fue observada en la región distal del conducto. Sin embargo, las CS del cabo nervioso presentaban un intenso marcaje para p75^{NTR} . Se encontraron dispuestas en el tejido del nervio degenerado en forma de cordones o hileras, conservando la localización original de las fibras nerviosas pero en un número notablemente mayor (figura 14A). Estas células $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ se encontraron también en gran número avanzando en sentido retrógrado hacia la prótesis biosintética. A lo largo del estroma fibroso intercalado entre el cabo nervioso distal y la prótesis, encontramos cordones de células de Schwann formados por grupos de 4 a 6 células. Estos cordones presentaban una clara tendencia a orientarse hacia el conducto y avanzaron un total de 5.52 ± 0.45 mm (media \pm SEM) en el interior del tubo (figura 15).

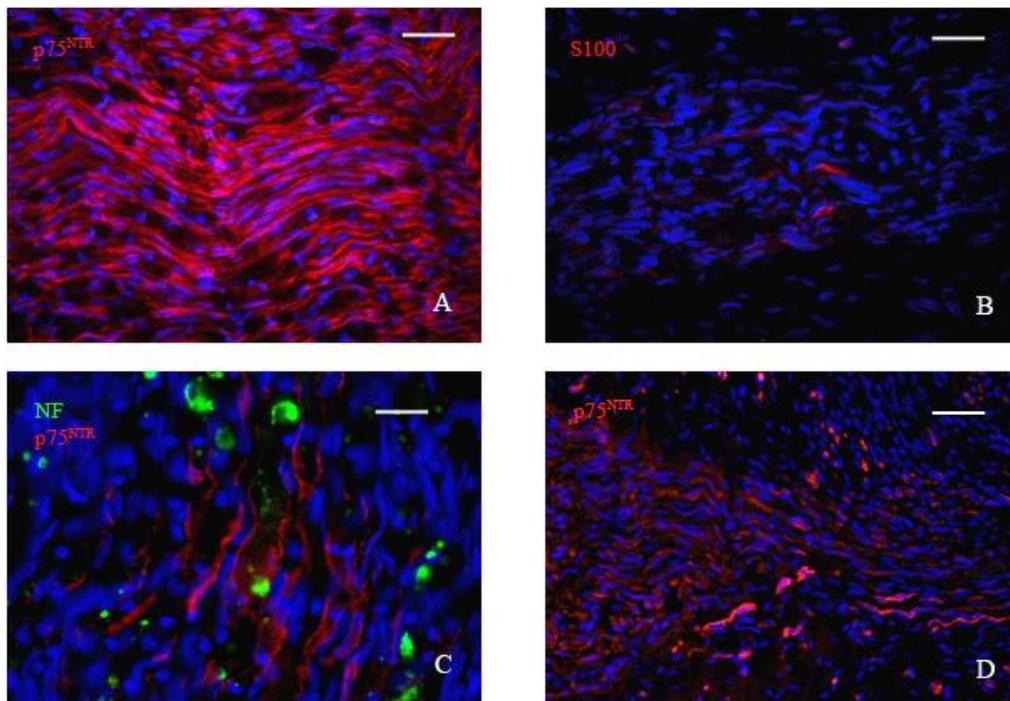


Figura 14: Extremo distal de los injertos extraídos tras 15 días y suplementados con NRG1. En el cabo nervioso distal las células de Schwann conservan su disposición alineada formando tubos celulares $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ (A). Sin embargo, en B observamos que hay muy pocos elementos S100^+ en el mismo área del nervio. En C, cámaras de digestión delimitadas por perfiles $\text{p75}^{\text{NTR}+}$. D: Las células de Schwann migran fuera del nervio (en la parte izquierda de la imagen) hacia el conducto. (Barras de escala: A, B y C 25 μm , y D 50 μm).

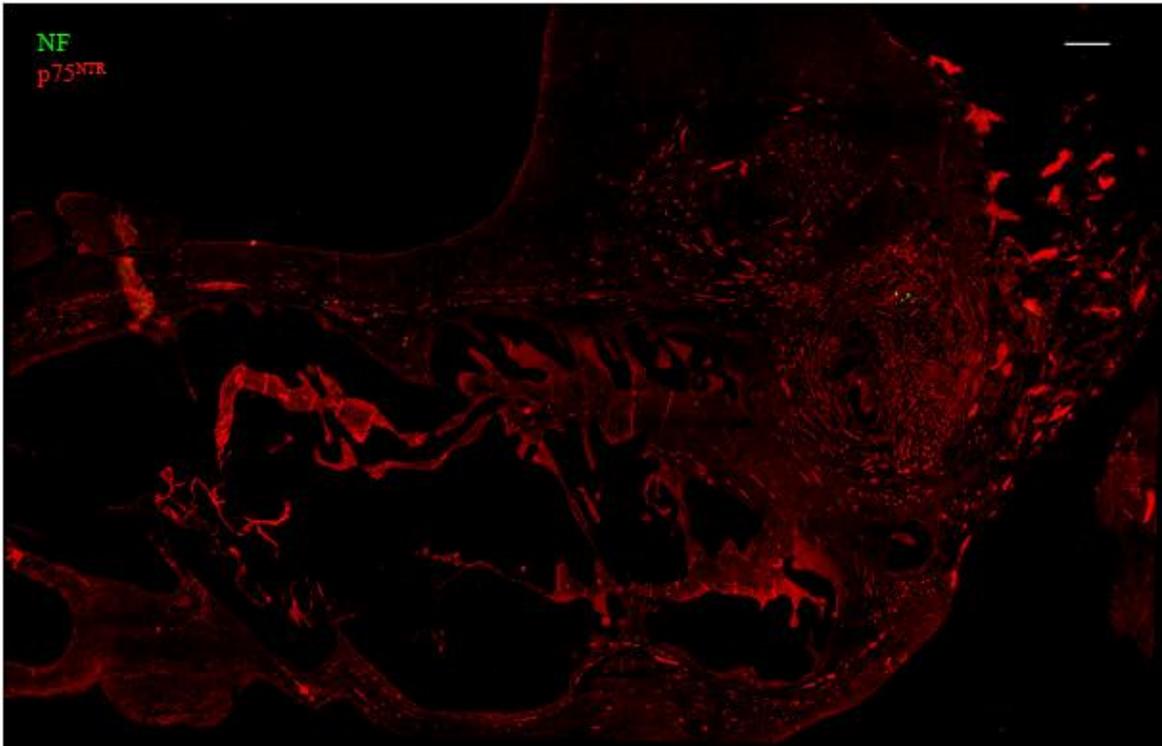


Figura 15: Composición de micrografías mostrando el segmento distal de uno de los injertos suplementados con NRG1 y extraídos a los 15 días. La parte derecha de la imagen es la más alejada del eje corporal. En la parte izquierda se pueden apreciar tabiques de polímero y cavidades correspondientes a la luz del conducto. Las células de Schwann $p75^{NTR+}$ migran en dirección al conducto superando una distancia de 5.52 ± 0.45 mm. (Barra de escala: 250 μ m).

El estudio de las secciones semifinas transversales siguientes en sentido retrógrado (segmento 4) desveló que uno de los implantes del grupo tratado con NRG1 presentaba elementos celulares en la luz del tubo. Aunque posiblemente hubiera algunas células de Schwann, la morfología de los elementos celulares presentes indicó que se trataba, en su mayoría, de fibroblastos y una serie de células inflamatorias como células gigantes multinucleadas, neutrófilos y monocitos, así como algunos macrófagos maduros. También se encontraron algunos capilares sanguíneos (figura 16). Además, siguiendo la dirección retrógrada del progreso de la generación de tejido, en este mismo individuo se encontró una pequeña cantidad de tejido fibroso en la porción central del conducto (segmento 3 en su región final, aproximadamente 10 mm hacia el interior del conducto).

6. Resultados

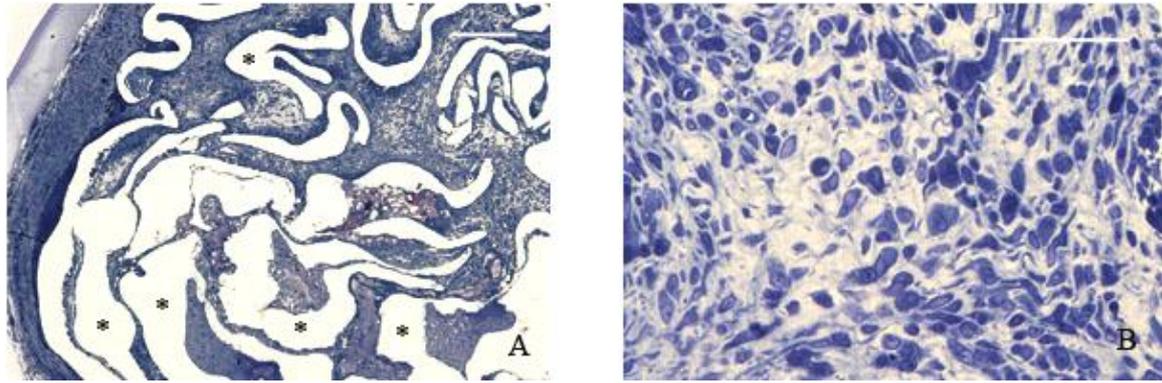


Figura 16: Secciones semifinas correspondientes al segmento 4 de implantes retirados tras 15 días de tratamiento con NRG1. En A, vista general de la sección transversal del conducto. El espacio entre las láminas de polímero (asteriscos) está ocupado por tabiques de tejido. La imagen B muestra numerosos fibroblastos en el tejido de nueva formación. (Barras de escala: A 200 μm y B 50 μm).

Resumen de los resultados obtenidos 15 días tras el implante.

Como resultados más notables podemos resaltar que los implantes suplementados con NRG1 producen un efecto acelerador de la regeneración axonal. Tras 15 días de tratamiento pudimos observar diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la distancia recorrida por los axones desde el límite original de la lesión proximal. Así, describimos que la distancia sin la adición de NRG1 era de 4.24 ± 0.15 mm, mientras que con las prótesis suplementadas con NRG1 la distancia aumentaba a 5.83 ± 0.27 mm. Este incremento en la progresión de los axones estaba acompañado por un aumento similar en el número de células de Schwann y en la distancia que recorrieron hacia el interior del conducto. Además, hemos descrito un cambio en el fenotipo en las células de Schwann después de una lesión por neurotmesis, indicado por el cambio de expresión entre los marcadores S100 y p75^{NTR}. Sólo las células de Schwann que permanecen en la región del nervio no afectada mantienen una expresión detectable de la proteína S100 en sus citoplasmas. Por el contrario, las CS que han proliferado y migran acompañando a los axones en regeneración, expresan p75^{NTR}. Asimismo, se encontró un mayor número de CS en el cabo distal de los nervios reparados con prótesis con NRG1 que en los no tratados. Además, estas células de Schwann penetraban una mayor distancia en el interior del conducto.

6.2. Grupo 30 días

Treinta días después de ser implantados los constructos bioabsorbibles se habían integrado completamente con los tejidos circundantes. La cápsula fibrosa que envuelve la prótesis parecía ser menos densa que en los grupos de 15 días. El PLGA de la estructura externa se había degradado parcialmente en los extremos, coincidiendo con las zonas de sutura. En su lugar, se pudo observar un tejido de nueva formación. Se pudo apreciar que estas zonas estaban más engrosadas que el tronco nervioso, posiblemente debido a una leve reacción fibrótica a nivel de las suturas. Al retirar el tejido fibrótico externo débilmente unido al implante a nivel de la zona de sutura proximal, las estructuras que destapamos presentaron la apariencia macroscópica de un nervio periférico, incluyendo el aspecto nacarado del epineuro y una adecuada vasculatura.

6.2.1. Grupo 3. Implantes sin NRG1 durante 30 días

A continuación se exponen los resultados del estudio de los constructos no suplementados con NRG1 implantados durante 30 días.

En el tronco nervioso de la región proximal, no alterado por la lesión, se observó un intenso marcaje para el anticuerpo anti-S100. La apariencia del nervio, de las fibras nerviosas y de las células de Schwann era similar a la descrita en la sección 6.1.1. No se detectó marcaje p75^{NTR+} en el nervio.

Se encontró una gran cantidad de axones NF⁺ extendiéndose hasta el final de las preparaciones histológicas correspondientes al segmento 1. Estos axones en regeneración seguían a menudo recorridos tortuosos y se proyectaban en muchas direcciones. Pese a todo, tendían a orientarse paralelamente al eje mayor del nervio. Cuando en su camino se interponía algún obstáculo, como podía ser una de las laminillas internas de PLGA del conducto, presentaron tendencia a bordearla para superarla. Se pudieron observar fibras NF⁺ de diferente grosor, encontrándose las más gruesas en la zona más cercana al cabo proximal y las más delgadas (de un diámetro menor) más alejadas en sentido anterógrado, penetrando en la prótesis.

Las células de Schwann seguían un patrón de distribución coincidente con el de los axones en regeneración. Así, se encontraron células de Schwann ordenadas formando cordones que se asociaban íntimamente con grupos de axones. Estos cordones de células de Schwann son positivos para el anticuerpo anti-S100 y se componen de aproximadamente 8 – 10 células por cada 100 μm de longitud de la fibra. Esta medida está estimada a partir del conteo de los núcleos presentes a lo largo del cordón de células de Schwann. Estos gruesos cordones eran más abundantes en las proximidades del nervio y más escasos cuanto más se adentraban en el conducto. A diferencia de lo observado en los grupos experimentales de 15 días, en este estadio pudimos detectar cordones de CS que expresaban S100 fuera del tejido del cabo nervioso. Es decir, acompañando a los axones atravesando el tejido fibroso formado en el interior del implante. Pudimos observar que la intensidad de la tinción para S100 disminuía a medida que las fibras se alejaban del cabo distal, donde los axones presentaban un diámetro menor (figura 17).

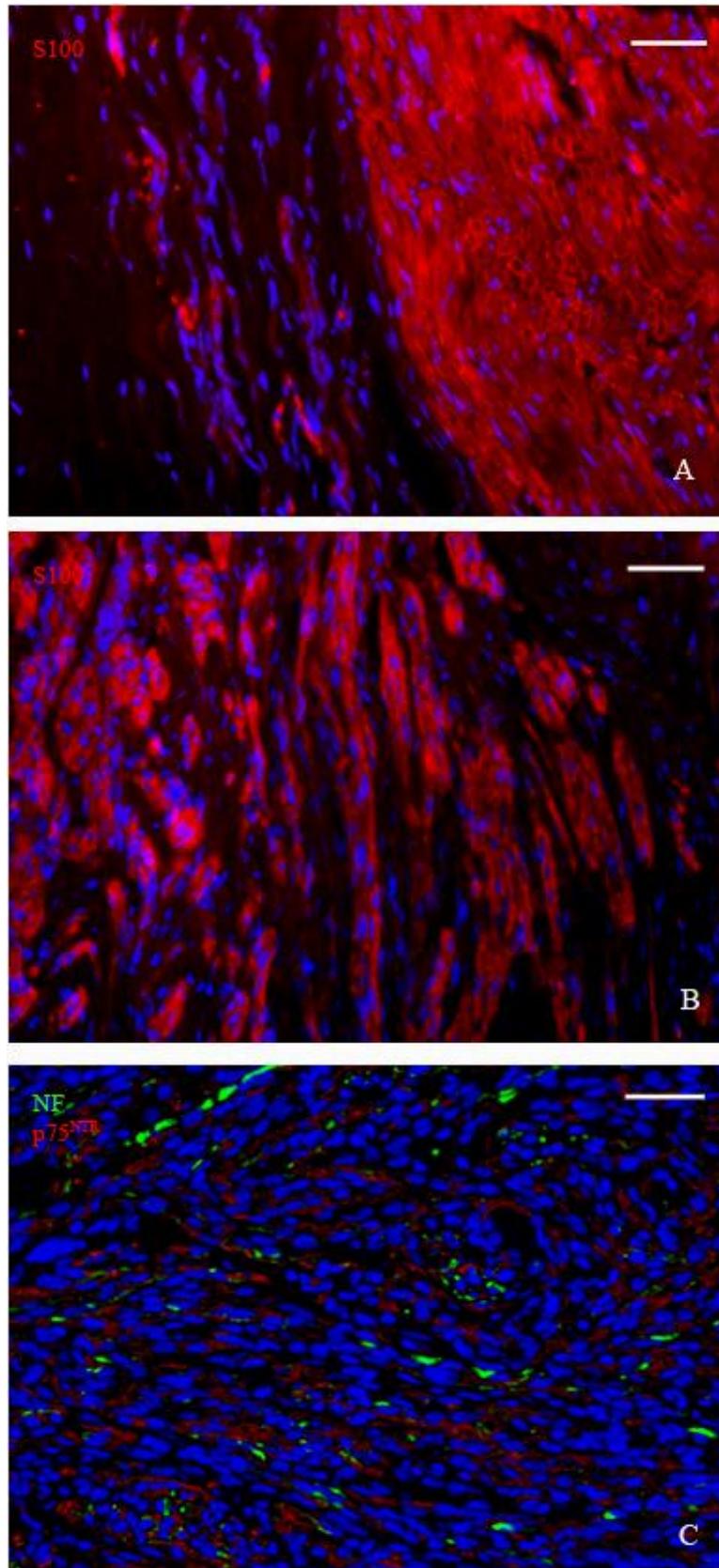


Figura 17: Extremo proximal de un injerto no suplementado con NRG1 y extraído tras 30 días. En A, aspecto del cabo nervioso en su región no afectada por la lesión. Fuera del nervio hay algunas células S100⁺. B: Cordones S100⁺ encontrados en el tejido regenerativo. C: En la misma región la presencia de elementos p75^{NTR+} es escasa. Se observan axones NF⁺ de diferentes calibres (Barras de escala: A y B 75 μ m y C 50 μ m).

6. Resultados

No se observó marcaje p75^{NTR+} en las células de Schwann en las que la expresión de S100 era más abundante. Sin embargo, la expresión de p75^{NTR} era abundante en las zonas más alejadas, esto es, en las células de Schwann que acompañan a axones de pequeño diámetro. La morfología de estas células era filiforme y se disponían acompañando al axón en toda su longitud. Se observó una región intermedia ocupada por células de Schwann que expresaban ambos marcadores (S100 y p75^{NTR}).

En las secciones semifinas siguientes (segmento 2) se encontraron numerosos axones rodeados por delgadas vainas de mielina agrupados en pequeños fascículos nerviosos. En sección transversal, estos minifascículos estaban formados por 3 ó 4 axones mielinizados y se encontraban rodeados por tejido conjuntivo en forma de envuelta perineural. Aunque la mayor parte del conducto se presentaba ocupado por tejido nervioso en regeneración, en el interior del conducto se encontraron áreas vacías en las que todavía se podían observar masas de hidrogel de alginato en degradación (figura 18).

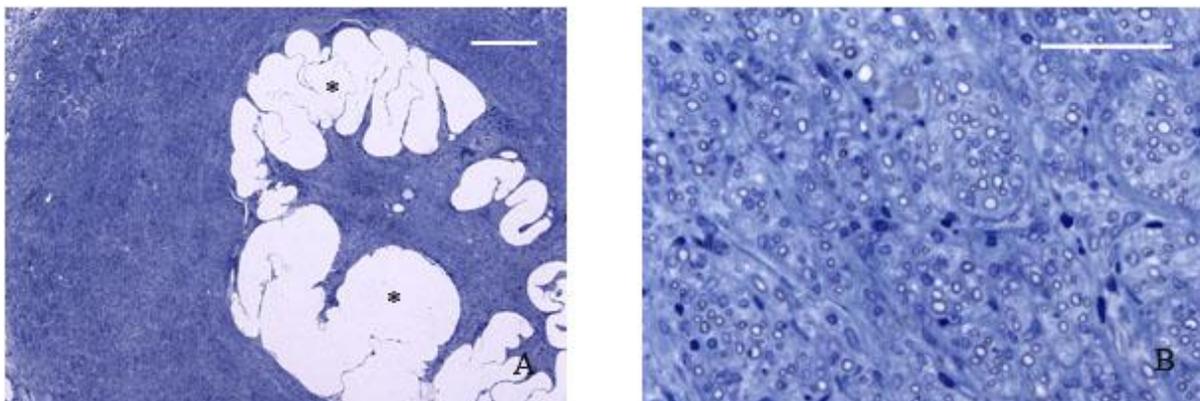


Figura 18: Secciones semifinas correspondientes al segmento 2 de injertos de 30 días no suplementados con NRG1. La imagen A muestra una vista general del conducto en sección transversal ocupado por tejido nervioso regenerativo. Las láminas interiores de PLGA son todavía evidentes (asteriscos). B: Detalle de la zona periférica del conducto. El nuevo tejido nervioso está formado por minifascículos que contienen axones mielinizados. (Barras de escala: A 200 μ m y B 50 μ m).

Las secciones ultrafinas correspondientes mostraron en detalle la morfología de los minifascículos encontrados en los cortes semifinos. Las células de Schwann fueron identificadas por poseer un núcleo grande y de forma regular, pálido y con cromatina descondensada, un citoplasma claro, con escasos orgánulos visibles y por estar rodeadas por una lámina basal fácilmente visible. Se encontraron CS asociadas a un único axón mielinizado (en relación 1:1) y CS que englobaban en su citoplasma numerosos procesos axónicos no mielinizados (figura 19A y 19B). Estas asociaciones así definidas se denominan generalmente unidades de

regeneración. En ocasiones encontramos unidades de regeneración compuestas por una célula de Schwann y dos o más axones rodeados de mielina. Estas se forman como consecuencia de la mielinización de varias ramificaciones de un axón parental por la misma célula de Schwann. Se denominan ramilletes de mielinización y normalmente evolucionan reabsorbiendo y eliminando las ramificaciones mielinizadas supranumerarias (figura 19C).

Tomando áreas seleccionadas de micrografías representativas, se calculó la densidad de axones mielinizados en este nivel, resultando de 3.08 axones por cada $100 \mu\text{m}^2$. El calibre medio de las fibras mielinizadas se estimó en $1.83 \mu\text{m}$ y el del axón sin su envoltura, en $1.43 \mu\text{m}$. La potencia media de las vainas de mielina se calculó en $0.20 \mu\text{m}$ según la siguiente relación:

$$\frac{\text{diámetro de la fibra} - \text{diámetro del axón}}{2}$$

Estos datos arrojaron una ratio G de 0.78 para los axones mielinizados en la prótesis no suplementada con NRG1. La ratio G se define como el cociente entre el diámetro del axón y el diámetro de la fibra nerviosa y es un estimador de la calidad de la regeneración nerviosa en supuestos experimentales (Zochodne, 2008). La ratio G normal para un nervio humano es de alrededor de 0.65 y es independiente de las dimensiones del axón. Este valor está altamente conservado entre los mamíferos, por ejemplo, la ratio G correspondiente al nervio ciático de conejo no lesionado es también de 0.65, según nuestros propios cálculos.

Como hemos dicho, se describieron también numerosas fibras nerviosas amielínicas en las secciones ultrafinas a este nivel. En estos casos, una célula de Schwann engloba con procesos citoplasmáticos a varias prolongaciones axónicas de pequeño calibre. No formaban vainas de mielina y toda la estructura estaba recubierta por la lámina basal, siendo raro que el axolema estuviera en contacto directo con la lámina basal. Del mismo modo, los axones se presentaban aislados unos de otros, separados por procesos citoplasmáticos de la CS (figura 19B).

6. Resultados

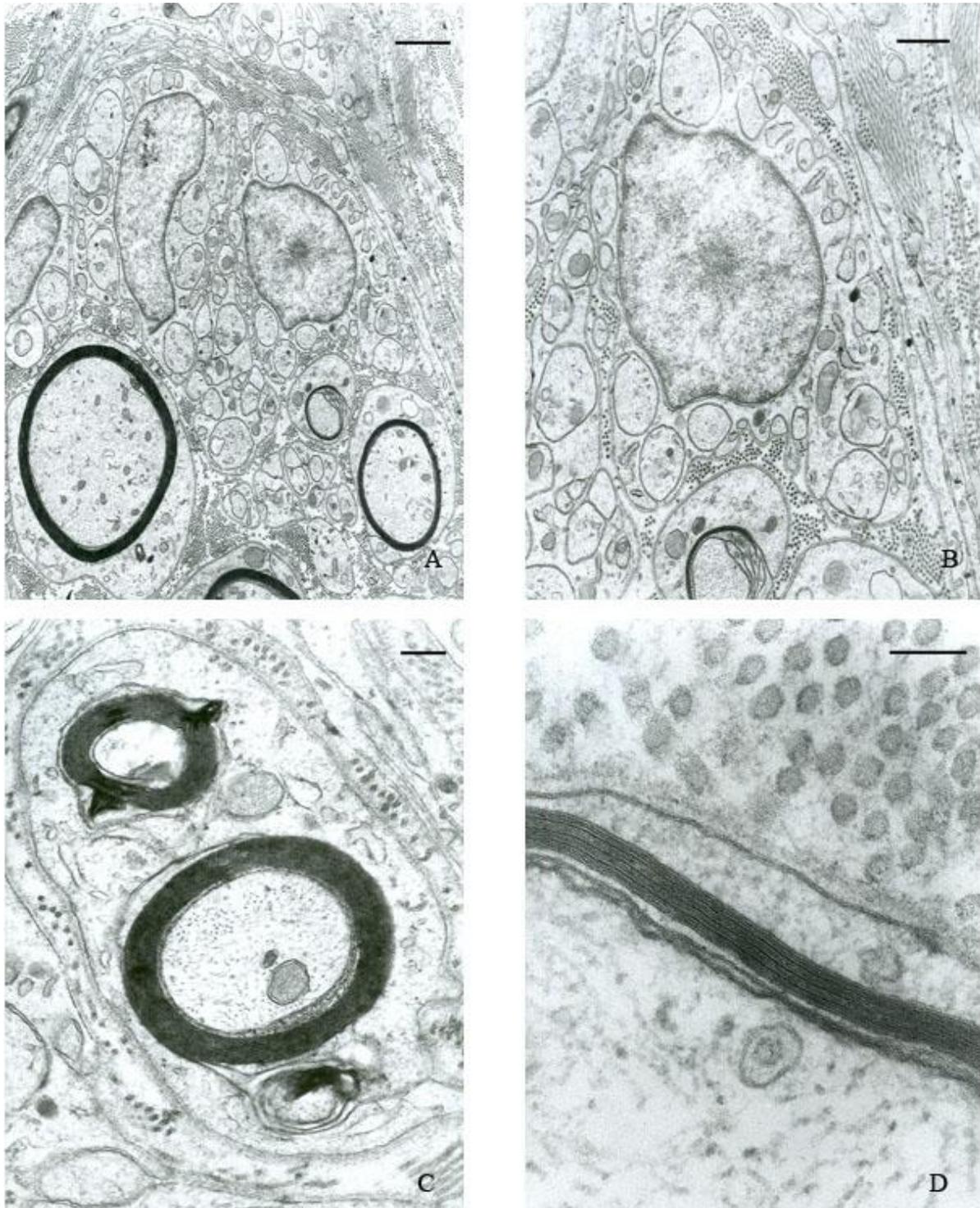


Figura 19: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del segmento 2 de un injerto de 30 días no suplementado con NRG1. En A se muestra un conjunto de fibras mielinizadas y no mielinizadas. Los axones mielinizados son fácilmente distinguibles por su oscura envuelta mielínica. En B, detalle de una fibra nerviosa no mielinizada. Una célula de Schwann (con núcleo central) envuelve varias prolongaciones axónicas (asteriscos). La célula está bordeada por una lámina basal. C: Ramillete de regeneración. Una única CS mieliniza a varias ramificaciones de un mismo axón. En D, detalle de la vaina de la pared de la fibra en el que se pueden distinguir el axolema, la vaina de mielina, la membrana plasmática de la CS y, en el exterior, una lámina basal densa a los electrones. La matriz extracelular contiene fibras colágenas. (Barras de escala: A 1 μ m, B 500 nm, C 200 nm y D 100 nm).

Fibras amielínicas y mielínicas se agrupaban en número de 4 a 8 empaquetadas por procesos citoplasmáticos de fibroblastos perineurales (más electrodensos y conteniendo en muchas ocasiones vesículas de retículo endoplásmico rugoso), formando así un minifascículo nervioso. Los núcleos de los fibroblastos son muy heterocromáticos, a diferencia de los de las células de Schwann. Los procesos de los fibroblastos rodean y agrupan paquetes de fibras nerviosas formando pequeños fascículos. Los minifascículos estaban separados entre sí por tabiques de fibras de colágeno que presentaban una organización adecuada. Fueron observados también numerosos fibroblastos entre la matriz extracelular y algunos macrófagos (figura 20).

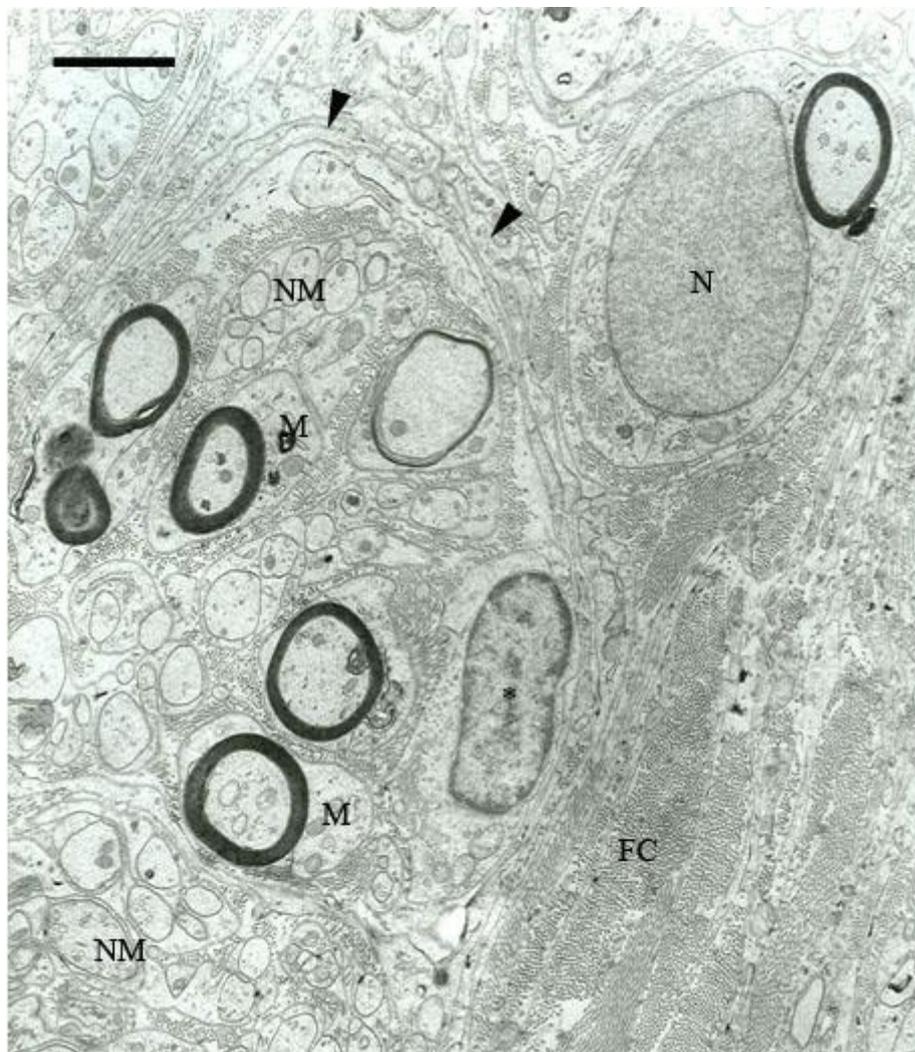


Figura 20: Las fibras mielinizadas (M) y no mielinizadas (NM) se agrupan en minifascículos rodeados por procesos citoplasmáticos de fibroblastos perineurales (puntas de flecha). Los fibroblastos son identificables por sus núcleos heterocromáticos (asterisco). Las células de Schwann presentan un núcleo más eucromático (N). El estroma exterior está ocupado por fibras colágenas (FC). (Barra de escala: 2 μ m).

6. Resultados

A continuación, en la región central del implante (segmento 3), se encontraron axones en regeneración NF^+ avanzando aproximadamente 3 mm hacia el interior del segmento. Aunque es difícil de calcular la distancia exacta, podemos estimar la distancia total recorrida por los axones sumando la longitud de los segmentos que han atravesado, ya que conocemos sus dimensiones. Así, en este caso los axones recorrieron una distancia aproximada de 13 mm desde el origen de las fibras regenerativas, con lo que avanzarían una media de 0.43 mm por día durante los 30 primeros días. Estos axones se observaron acompañados en todo momento por CS que presentaban inmunorreactividad para el receptor p75^{NTR} . La tinción contra S100 resultó muy débil o inexistente en esta región. Sin embargo, todavía hay grandes áreas ocupadas por PLGA y alginato que se aprecian como zonas vacías de elementos celulares en las secciones longitudinales. En general, las zonas ocupadas por tejido se localizan adheridas a la pared interna del tubo. Además del tejido neural formado, encontramos tejido conjuntivo. Se observó la presencia de miofibroblastos, identificados por la morfología indentada del tejido que forman.

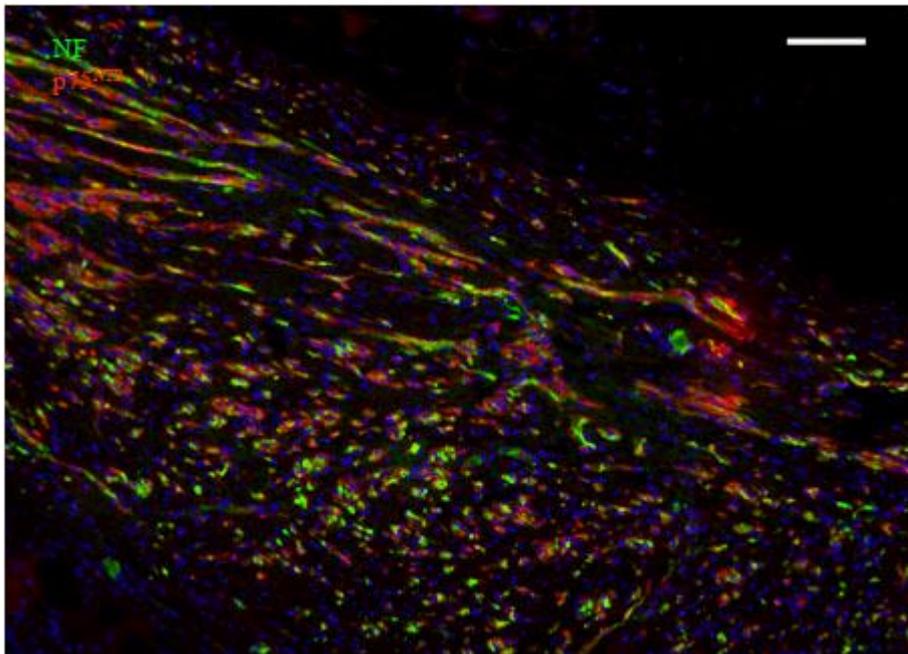


Figura 21: Prótesis sin NRG1 implantadas durante 30 días. Axones en regeneración (NF^+) acompañados por células de Schwann $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ en la porción central del conducto. El detalle está tomado de la cara interna de la pared del conducto. (Barra de escala: 75 μm).

En el cabo nervioso distal, en las secciones longitudinales correspondientes del implante no tratado (segmento 5) se encontraron agregados de residuos celulares positivos al anti-

cuerpo anti-NF, que identificamos como cámaras de digestión. Las cámaras de digestión se encontraron únicamente en las porciones de nervio ciático degenerado. No fueron halladas en el tejido regenerativo. Fuera del nervio no se apreció marcaje positivo para S100 (figura 22A). En el tejido formado entre el extremo del nervio y el conducto no se encontró ningún elemento marcado. Sin embargo, se observó un intenso marcaje para p75^{NTR} en el nervio del cabo distal, siendo también positivo el perineuro. Asimismo también se observaron numerosas células de Schwann p75^{NTR+} (figura 22B) migrando en sentido retrógrado invadiendo la prótesis. Estas células alcanzaron el final de la preparación histológica.

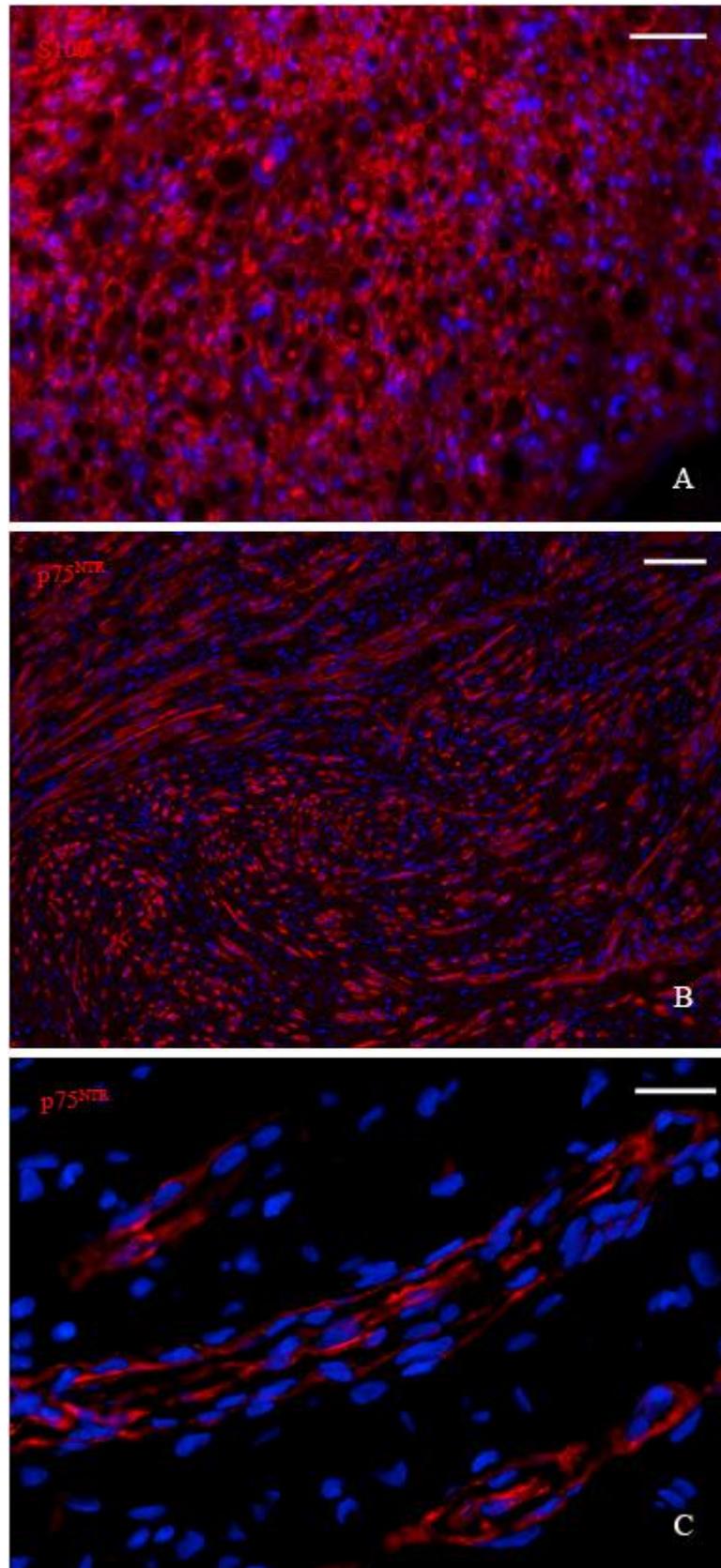


Figura 22: Extremo distal del injerto. El marcaje S100⁺ está restringido al tejido del cabo nervioso degenerado (A). Las CS conservan su posición formando bandas de Büngner. En B, numerosas CS p75^{NTR+} migran hacia el interior de la prótesis. Forman cordones de varias células que se orientan paralelas al eje mayor del injerto. C: Detalle de varias células de Schwann formando cordones en el tejido regenerativo. (Barras de escala: A y B 75 μ m, C 25 μ m).

En las secciones semifinas siguientes en sentido retrógrado (segmento 4) se encontró gran cantidad de PLGA todavía sin degradar que ocupaba la mayor parte de la luz del conducto. Asimismo eran evidentes masas de alginato no hidrolizado. Se observó la presencia de un tejido de relleno entre los tabiques de PLGA y las masas de hidrogel, que en alguno de los casos cubría una superficie de 1/3 de la luz del conducto (figura 23A). En ninguno de los casos se observaron axones mielinizados y tampoco pudo identificarse la morfología típica de una fibra amielínica. El tejido estaba compuesto por fibroblastos, células plasmáticas y, tal vez células de Schwann en migración desde el cabo distal. Se apreciaron numerosos macrófagos con vesículas fagocíticas en su interior y células gigantes polinucleadas. La observación de secciones ultrafinas correspondientes a estos cortes reveló, sin embargo, la presencia de numerosas células de Schwann, fácilmente identificables por estar rodeadas por una lámina basal electrodensa (figura 23B). Estas CS no se encontraron en ningún caso asociadas a prolongaciones axónicas y no se detectaron vainas de mielina. Tampoco se observaron residuos de mielina en descomposición (cámaras de digestión). Las CS encontradas a este nivel se caracterizan por presentar numerosas prolongaciones en el espacio delimitado por la lámina basal. También son frecuentes los núcleos heterocromáticos, probablemente pertenecientes a fibroblastos de tipo endoneural, imitando así la estructura de una banda de Büngner (tubo endoneural). Diferenciamos los procesos citoplasmáticos de fibroblastos y células de Schwann gracias a que estas últimas contienen filamentos intermedios de GFAP, apreciables en nuestras micrografías. Los tubos endoneurales se observaron aislados en una matriz extracelular rica en fibras de colágeno. Se encontraron también otros fibroblastos en el tejido que no se asociaban a las estructuras descritas.

6. Resultados

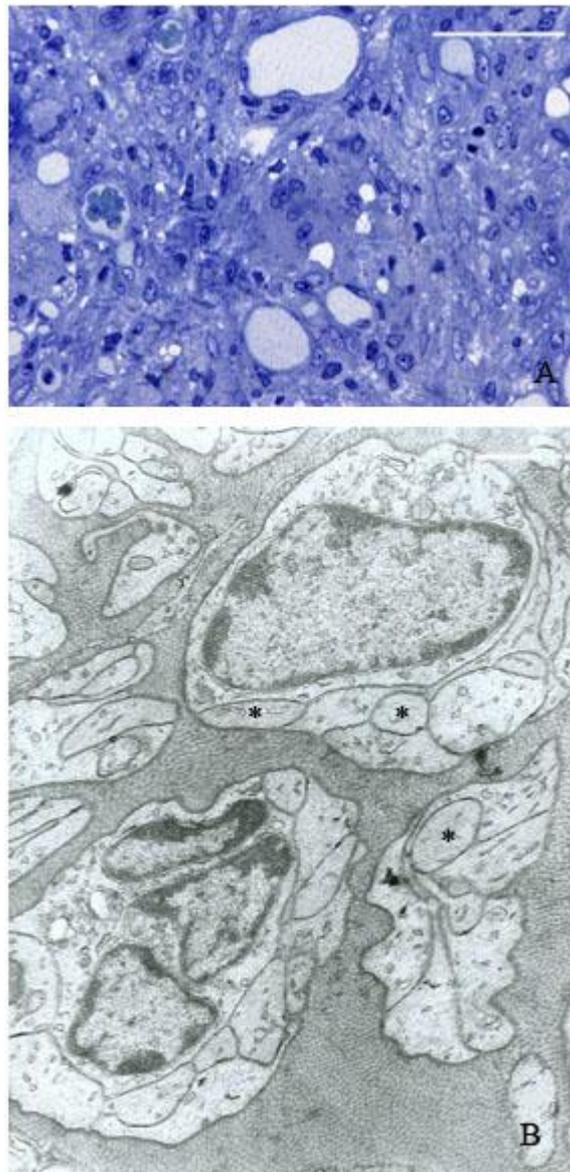


Figura 23: A: Corte semifino correspondiente al segmento 4. Se observan capilares, fibroblastos y células con núcleos pálidos, presumiblemente células de Schwann. B: Imagen de microscopía electrónica de transmisión. Bandas de Büngner compuestas por fibroblastos endoneurales (núcleos heterocromáticos e irregulares) y procesos de las CS (asteriscos). Las bandas independientes están rodeadas por lámina basal. (Barra de escala: A 50 μ m. B 500 nm).

Si seguimos la progresión del crecimiento en sentido retrógrado encontramos otra vez el segmento 3. En su región más distal (más alejada del eje corporal) se encontraron algunas células $p75^{\text{NTR}+}$ no asociadas a axones. Estos perfiles se identificaron como células de Schwann en proceso de migración desde el cabo distal. Estas células eran muy escasas y sólo se encontraron en dos de los casos estudiados. Su progresión en el segmento hacia la parte central del implantes fue sólo de 0.80 mm.

6.2.2. Grupo 4. Implantes suplementados con NRG1 durante 30 días

Al igual que en el grupo no tratado, en los cabos nerviosos proximales de los animales a los que se implantó durante 30 días una prótesis suplementada con NRG1, se detectó una tinción intensa para el anticuerpo anti-S100. El aspecto general del nervio en su región no afectada era normal. No se registraron elementos $p75^{NTR+}$ aparentes en el nervio (figura 24A). Los axones en regeneración se introducían en el conducto en gran número. Su orientación fue en todo momento correcta, paralela al eje mayor del nervio y su distribución en el tejido era ordenada. Las prolongaciones axónicas se encontraron en grupos de 10 a 20. Estos paquetes discurrían paralelos entre sí hacia la prótesis con NRG1. Las células de Schwann asociadas a estos paquetes de axones presentaron un fuerte marcaje a la proteína S100. Las células de Schwann $S100^+$ se reunían formando cordones de entre 4 y 5 células a lo largo de los axones regenerados (figura 24C). A diferencia del grupo no tratado, la intensidad del marcaje inmunofluorescente no desapareció en toda la longitud del segmento 1. El anticuerpo contra el receptor $p75^{NTR}$ se encontró también asociado a los axones en regeneración. En la región más cercana al nervio proximal coincidían los marcajes para S100 y $p75^{NTR}$, aunque era más débil para $p75^{NTR}$. La morfología de las fibras $p75^{NTR+}$ era coincidente con la descrita anteriormente para los cordones $S100^+$. En un corte transversal de las fibras a este nivel pudimos observar que el receptor $p75^{NTR}$ se presentaba en los procesos de las CS pero también se expresaba en la envuelta perineural del minifascículo (figura 24D). A medida que las fibras se alejaban del nervio proximal en sentido anterógrado, descendía levemente la inmunofluorescencia para S100 mientras eran más comunes los perfiles $p75^{NTR+}$. Muchas de las CS $p75^{NTR+}$ a este nivel formaban parte de gruesos cordones de axones mientras que otras mostraban una morfología filamentosa y se veían unidas a axones aislados.

6. Resultados

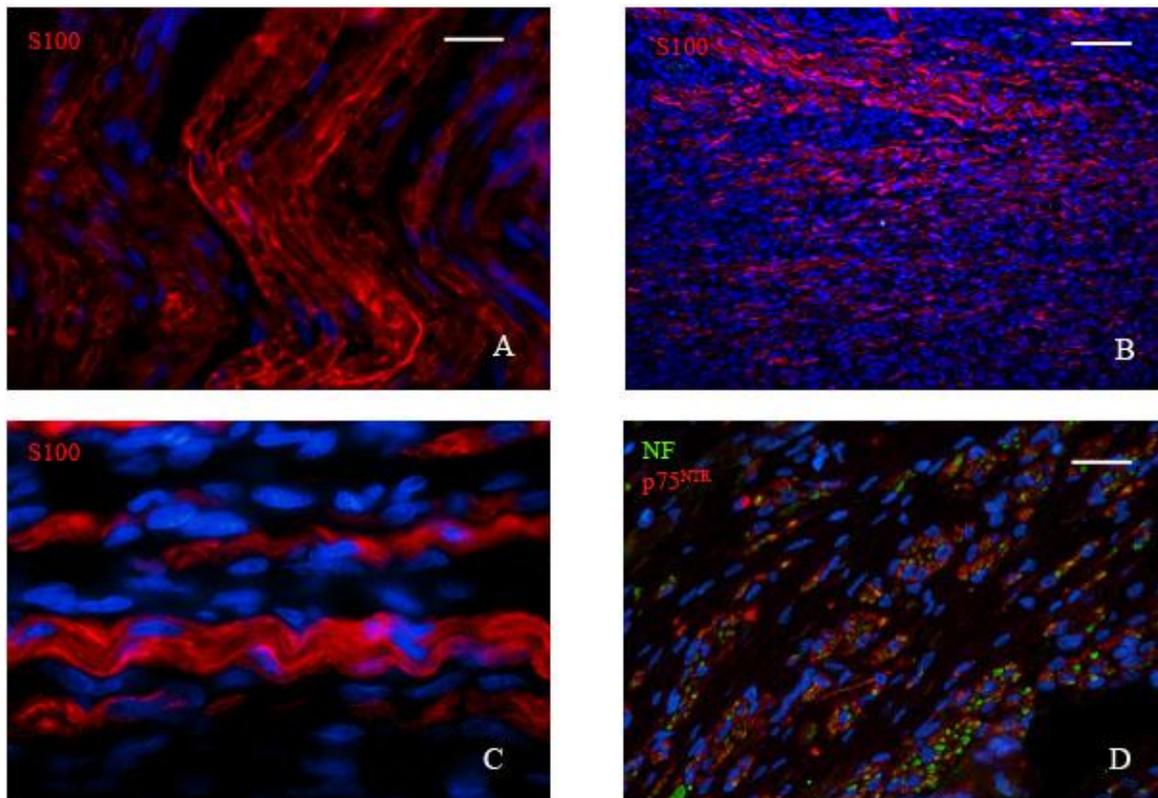


Figura 24: Extremo proximal. Injertos retirados tras 30 días y suplementados con NRG1. El cabo nervioso proximal, en su región no afectada por la degeneración, muestra una morfología similar a la normal (A), con un número de núcleos DAPI⁺ menor que el encontrado en el grupo de 15 días y más cercano al normal (ver figs. 2A y 7A). En B, cordones de CS S100⁺ migran ordenadamente hacia el interior de la prótesis suplementada. La imagen C es un detalle en el que se observa la estructuración de los cordones. Una sección transversal muestra la composición de los minifascículos en formación (D). Grupos de 8 a 20 axones NF⁺ se reúnen asociados a procesos de CS p75^{NTR+}. Además, la envoltura perineural del minifascículo es también p75^{NTR+}. (Barras de escala: A y D 25 μ m, B 50 μ m).

En las secciones semifinas siguientes (segmento 2) pudimos observar que el tejido nervioso regenerativo ocupaba por completo el interior del conducto a este nivel. En uno de los implantes solamente se consiguió una ocupación de la mitad de la luz, estando el resto ocupado por hidrogel de alginato semidegradado y láminas de PLGA. En otro de los casos el tubo estaba completamente vacío. Suponemos que por el colapso de la prótesis a un nivel anterior. El tejido estaba ricamente poblado por minifascículos que contenían de 6 a 12 axones mielinizados. Los minifascículos se mostraban contiguos unos a otros separados por finos tabiques de tejido conjuntivo. Se identificaron fibroblastos en el tejido estromal. Intercalados en el estroma se disponían numerosos vasos sanguíneos. También se encontró un pequeño número de macrófagos sin grandes vesículas fagocíticas.

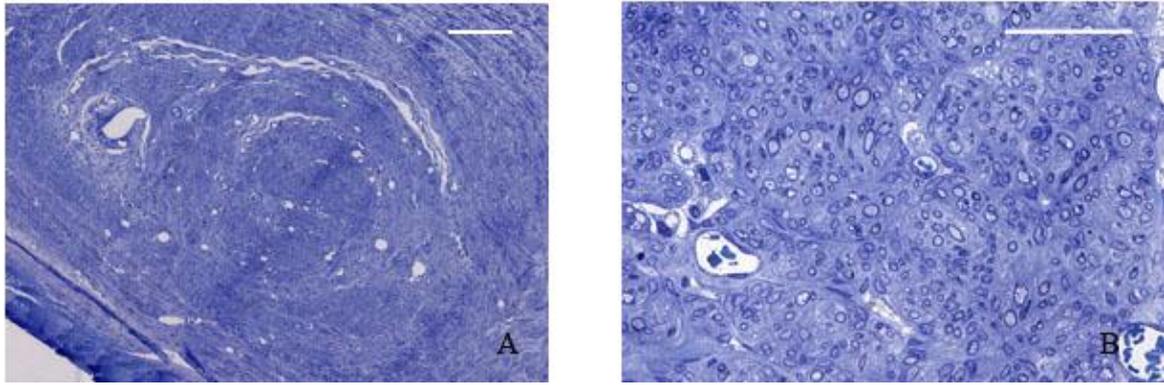


Figura 25: Secciones semifinas del segmento 2 pertenecientes a injertos extraídos a los 30 días y suplementados con NRG1. La vista general de la sección transversal del injerto (A), demuestra que la prótesis está totalmente colonizada por tejido nervioso regenerativo. A mayor aumento, en B se pueden observar numerosos axones mielinizados reunidos en minifascículos. Estos minifascículos estaban localizados en el centro del conducto y parecen tener sus límites más difusos que los encontrados en la periferia (para una comparación ver figura 14B).

El estudio de la ultraestructura de muestras representativas de estas secciones reveló un mayor número de vainas de mielina por área que en el grupo no tratado con NRG1. Concretamente estimamos 3.98 axones por cada $100 \mu\text{m}^2$. Tanto el diámetro de las fibras mielinizadas como el de sus axones era ligeramente mayor que en el grupo sin NRG1. El diámetro de las fibras se estimó en $1.98 \mu\text{m}$ mientras que el de sus axones fue de $1.50 \mu\text{m}$. Así, calculamos una potencia media de las vainas de mielina de $0.24 \mu\text{m}$, también ligeramente superior a la registrada en el otro grupo. De esta manera, la ratio G en este grupo seguía siendo más cercana a la unidad que en un nervio normal, y muy similar a la del grupo no tratado ($G = 0.75$). La morfología general de los minifascículos y de los elementos del estroma son similares a los descritos anteriormente para el grupo sin NRG1. En las fibras amielínicas podemos diferenciar las prolongaciones axónicas de los procesos de las células de Schwann porque los axones presentan una sección transversal circular y contienen neurotúbulos y neurofilamentos. La presencia de estos elementos hace que el axoplasma sea ligeramente más denso a los electrones que el citoplasma de las células de Schwann.



Figura 26: Imagen de microscopía electrónica correspondiente a los cortes de la figura 23. Se muestra una fibra nerviosa mielinizada. En el axón se pueden observar los neurofilamentos en el axolema. En la célula de Schwann es patente el núcleo regular y claro, así como la lámina basal que delimita el perímetro de la fibra. (Barra de escala: 500 nm).

Los axones mielinizados progresaron hacia el centro del implante como pudimos describir estudiando las secciones longitudinales del segmento 3. Los axones alcanzaron el centro del implante en todas las secciones estudiadas excepto en uno de los animales, en la que no se observó ningún tipo de tejido en el interior del conducto. El número de axones decrecía progresivamente a medida avanzaban. La distancia total aproximada recorrida por los axones (identificados por ser NF^+ y formar cordones $S100^+$) desde el borde del cabo nervioso proximal es de 15.40 mm. Este cálculo supondría un avance medio diario

de 0.51 mm durante los 30 primeros días. A este nivel pudimos observar los fascículos de axones asociados a células de Schwann S100⁺ (figura 27). Estos fascículos también tenían el aspecto de cordones pero eran menos gruesos. En la misma localización aparecía marcaje para p75^{NTR}. En las zonas más alejadas, donde los axones eran más escasos, no se registró marcaje para S100 y sin embargo, los axones estaban acompañados por procesos filamentosos p75^{NTR+}. Más allá el conducto se encuentra ocupado por restos de alginato en degradación y por fragmentos de láminas de PLGA, como en el caso de los implantes no tratados.

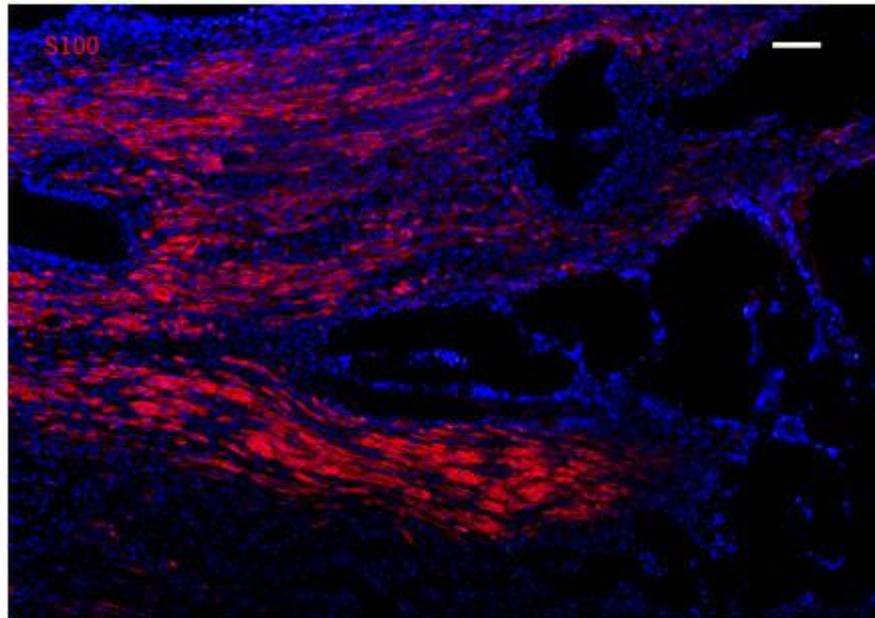


Figura 27: Numerosos cordones de fibras nerviosas S100⁺ invadiendo la parte central de la prótesis suplementada con NRG1. (Barra de escala: 75 μ m).

En el extremo distal (segmento 5) se pudo observar la presencia de cámaras de digestión conteniendo residuos axonales NF⁺ en el cabo nervioso distal. La presencia de estas estructuras estaba restringida al interior del nervio y no se encontraron en el tejido regenerativo. La expresión de la proteína S100 detectada con nuestros métodos de inmunofluorescencia era muy baja tanto en el nervio degenerado como en el tejido regenerativo que se extendía en sentido retrógrado hacia el conducto. Sin embargo, se encontró un fuerte marcaje para p75^{NTR} en el nervio degenerado así como un gran número de elementos p75^{NTR+} en el tejido formado en el interior de la prótesis (figura 28). Estas CS se ordenaban formando cordones de varias células y se orientaban en dirección al conducto.

6. Resultados

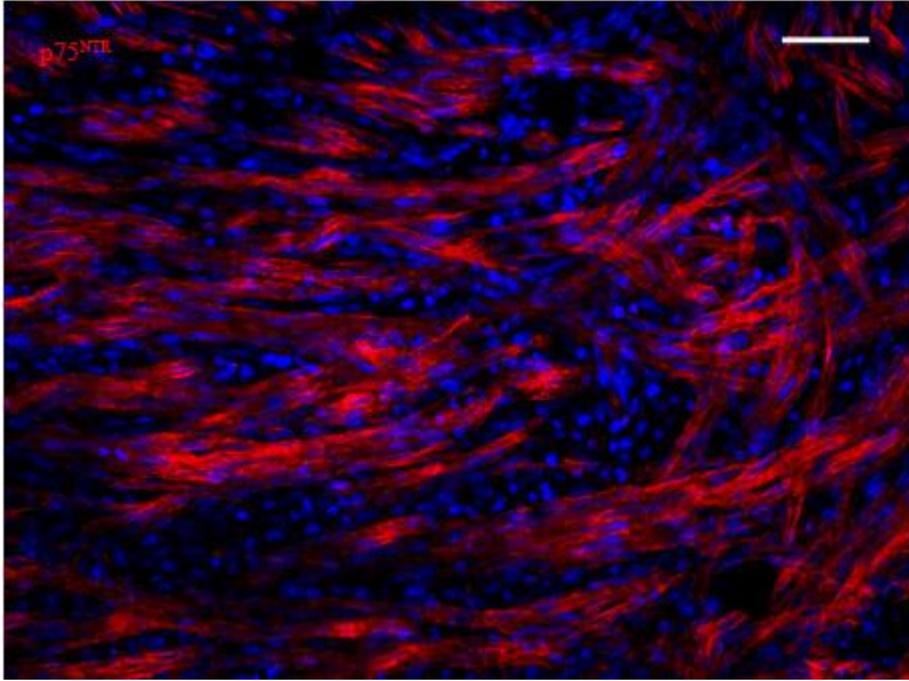


Figura 28: En el extremo distal del injerto encontramos incontables cordones celulares positivos para p75^{NTR} (A). Estos cordones de células de Schwann se orientaban hacia la prótesis suplementada con NRG1 y se adentraban en ella al menos 10 mm (Barra de escala: 50 μ m).

Las secciones semifinas transversales siguientes (en sentido retrógrado, segmento 4) mostraron los tubos parcialmente invadidos por un tejido compacto que contenía fibroblastos, algunos vasos, numerosos monocitos y células fagocíticas y, posiblemente alguna célula de Schwann (figura 29A). Observando las micrografías de microscopía electrónica correspondientes a las mismas secciones, pudimos comprobar que contenían numerosas células de Schwann, identificadas por poseer lámina basal (figura 29B). Estas células se presentaban formando cordones aislados. Como en el grupo no tratado, las células de Schwann parecen estar asociadas a fibroblastos endoneurales formando lo que se asemeja a un tubo endoneural o banda de Büngner.

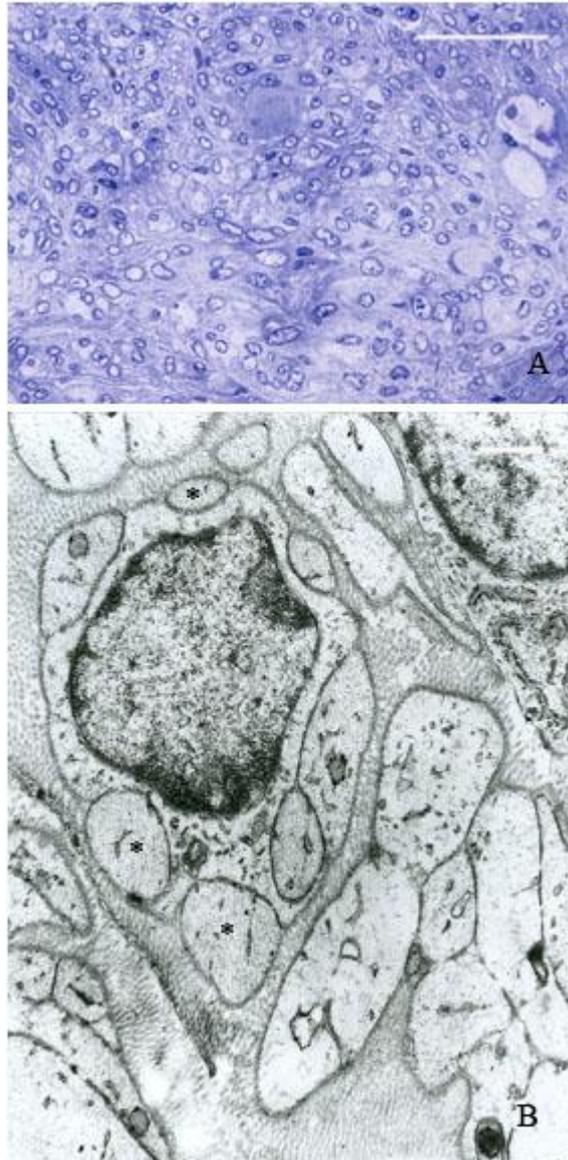


Figura 29: A: En las secciones semifinas transversales del segmento 4 (siguiendo la progresión del crecimiento en sentido retrógrado) encontramos un tejido fibroso muy compacto, con abundante matriz extracelular y bien irrigado por capilares. Se identificaron macrófagos, fibroblastos y células con núcleos regulares y claros. Estudiando la ultraestructura (B) hallamos numerosos procesos de células de Schwann (asteriscos), en ocasiones asociadas a núcleos de fibroblastos, formando lo que podrían ser bandas de Büngner. (Barras de escala: A 50 μm y B 500 nm).

6.3. Grupo 75 días

Las prótesis implantadas durante 75 días se presentaban totalmente integradas entre el resto de los tejidos de la pata. Resultó difícil distinguir la forma cilíndrica regular del conducto original. El calibre del injerto era sensiblemente menor que el del tubo en el momento del implante. En los extremos del conducto no se detectó la presencia de polímero y el aspecto que presentaba el injerto era el de un nervio normal. Tanto en el extremo proximal de la prótesis como en el distal, se observó una perfecta vascularización en la superficie del nervio discurriendo a lo largo del eje mayor del nervio. Además, la envoltura del nervio presentaba la apariencia estriada y nacarada del epineuro normal. En la zona central de la longitud del injerto, la pared exterior de PLGA estaba degradada y tan sólo eran observables fragmentos de 1 – 2 mm² de polímero. El resto del polímero estaba muy degradado, prácticamente reabsorbido, y parecía integrado en un tejido fibroso (ver figura 3F). En el interior de la prótesis no se apreciaron restos de alginato.

A diferencia de los grupos anteriores (implantados durante 15 y 30 días), en esta etapa encontramos axones atravesando toda la longitud de la bioprótesis. Por este motivo expondremos los resultados de este grupo siguiendo el progreso de la regeneración en sentido anterógrado, esto es, desde el cabo nervioso proximal al distal. Seguiremos el orden propuesto para la división de los injertos en segmentos de tejido.

6.3.1. Grupo 5. Implantes sin NRG1 durante 75 días

En el extremo proximal (segmento 1) observamos que la porción de tejido inmediatamente anterior al implante se presentaba ligeramente engrosada, aunque en menor grado que en los grupos anteriores. No se encontraron, por ejemplo, señales de las suturas. El tejido formado a continuación del cabo nervioso proximal se presentaba totalmente ocupado por cordones de fibras nerviosas regeneradas. Estos cordones parecían asociarse para formar estructuras de mayor jerarquía. Normalmente los axones NF^+ seguían trayectorias paralelas al eje mayor del conducto, aunque se apreciaron grandes conjuntos de fibras en otras orientaciones. Los cordones de axones estaban formados por un número entre 4 y 10 axones y las fibras formadas presentaron una fuerte afinidad por el anticuerpo anti-S100. La distribución del marcaje $S100^+$ era coincidente con la del anticuerpo contra neurofilamentos 200 kD. No se encontraron células $p75^{NTR+}$ en las secciones estudiadas (figura 30), aparte de algún elemento aislado correspondiente, probablemente, a una célula de Schwann amielínica madura.

6. Resultados

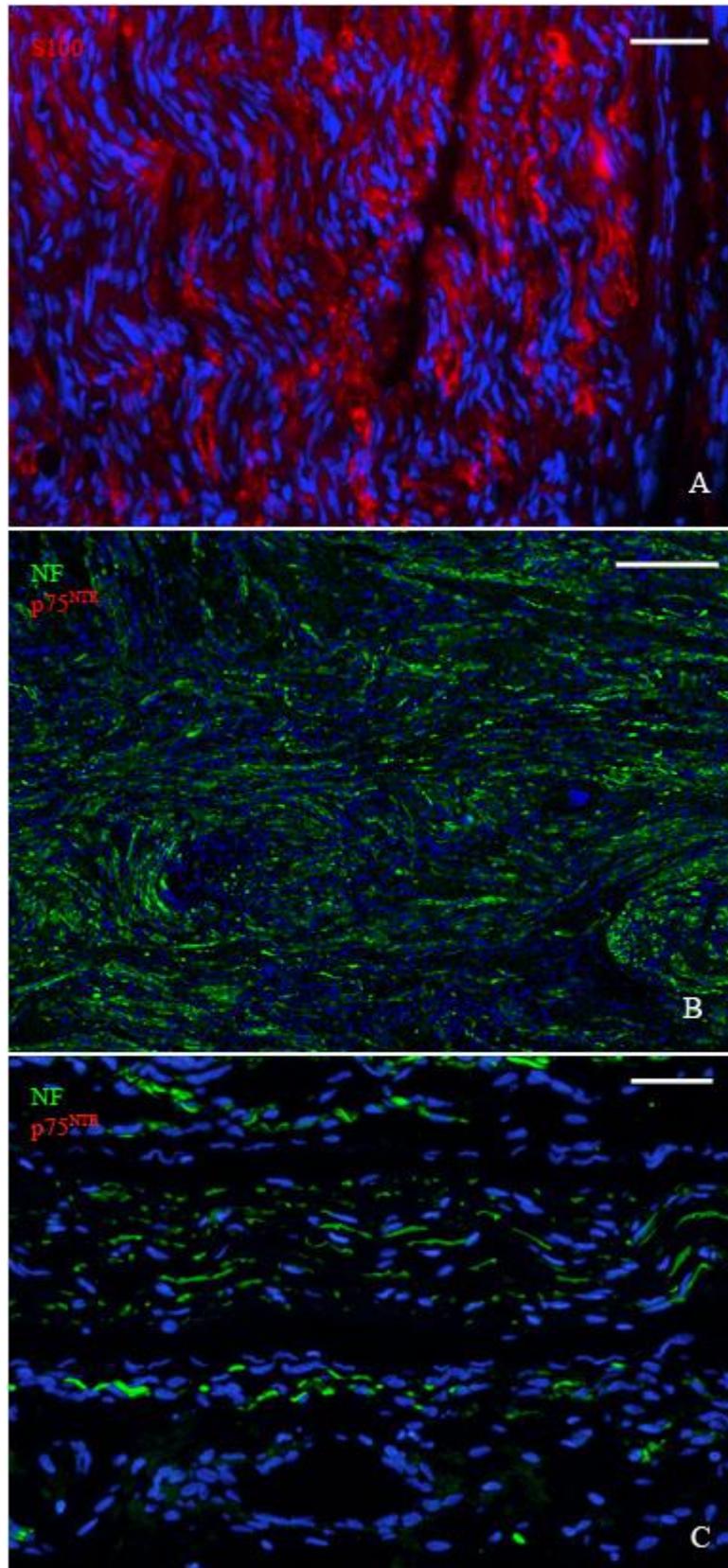


Figura 30: Extremo proximal de una prótesis sin NRG1 implantada durante 75 días. En A, las CS presentan un intenso marcaje S100⁺ en el tejido regenerativo. Numerosos axones atraviesan este tejido hacia el interior de la prótesis. No se advierte marcaje p75^{NTR+} (B). En C, detalle mostrando axones de diferentes calibres asociados en minifascículos. (Barras de escala: A 75 μ m, B 250 μ m y C 50 μ m).

En las secciones semifinas transversales siguientes se pudo comprobar que el tejido nervioso regenerado ocupaba la totalidad del interior del conducto. En la periferia de la luz del tubo los axones se presentaban asociados en paquetes rodeados y aislados por envueltas de tejido conjuntivo a modo de perineuro. Los minifascículos contenían entre 8 y 20 axones mielinizados. En la parte más interna de la luz, los minifascículos parecían tener los límites más difusos, en algunos casos formando fascículos mayores con delgados tabiques fibrosos en su interior. Los minifascículos contenían numerosos axones mielinizados y también fibras no mielinizadas difícilmente identificables en las secciones semifinas. Las fibras mielinizadas presentaban un diámetro medio de $4.87 \pm 0.16 \mu\text{m}$ (media \pm SEM), siendo el calibre medio de los axones de $3.65 \pm 0.12 \mu\text{m}$. La ratio G estimada a partir de estos registros es de 0.75, indicando que los axones presentan envolturas mielínicas más delegadas que en un nervio no dañado.

No se observaron residuos de alginato en ninguna de las secciones estudiadas y los restos de PLGA eran escasos. En el tejido nervioso regenerado del interior de la prótesis encontramos gran cantidad de vasos sanguíneos de diferentes tamaños. No eran frecuentes las células inflamatorias.

6. Resultados

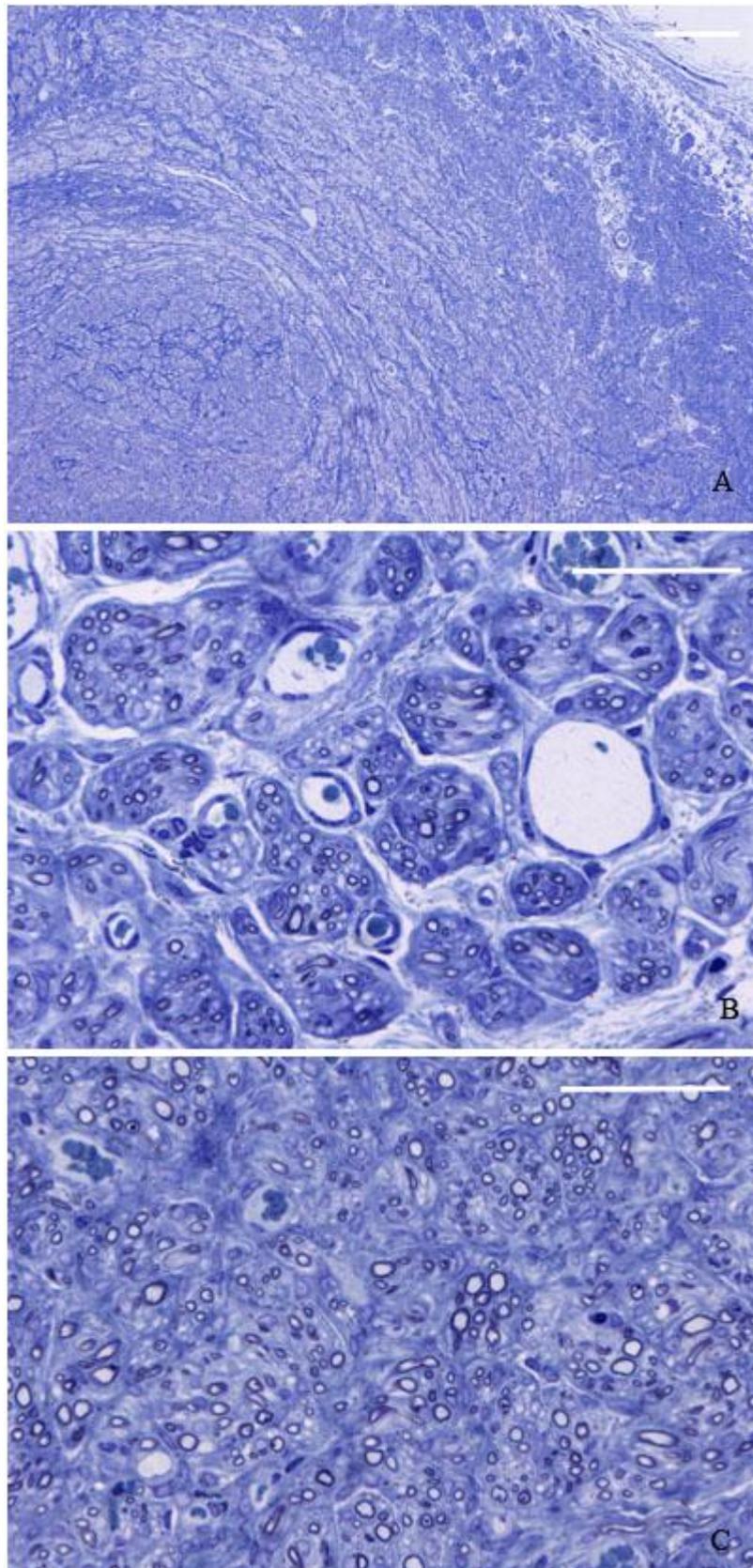


Figura 31: Secciones semifinas correspondientes al segmento 2. A: Vista transversal del conducto totalmente ocupado por tejido. En B, minifascículos de la periferia del injerto con axones mielinizados. Se observan numerosos vasos y tejido conjuntivo abundante entre los fascículos. En la zona central del conducto los fascículos tienen límites menos definidos (C). (Barras de escala: A 200 μm , B y C 50 μm).

Avanzando hacia el extremo distal del injerto, observamos gran cantidad de axones en la parte central del conducto (segmento 3), como se demostró por la presencia de marcaje NF⁺ (figura 32A). En los cortes histológicos longitudinales, estos axones formaban cordones de varios elementos, que resultarían ser continuidad de aquéllos minifascículos del segmento anterior. Los pequeños fascículos también se teñían intensamente para la proteína S100 (figura 32B). A menudo dos o más cordones se cruzaban en trayectorias aleatorias y no se apreciaron cordones S100⁺ más allá de la mitad del segmento. Sin embargo, un buen número de axones NF⁺ alcanzaron en todos los casos estudiados la parte final del implante.

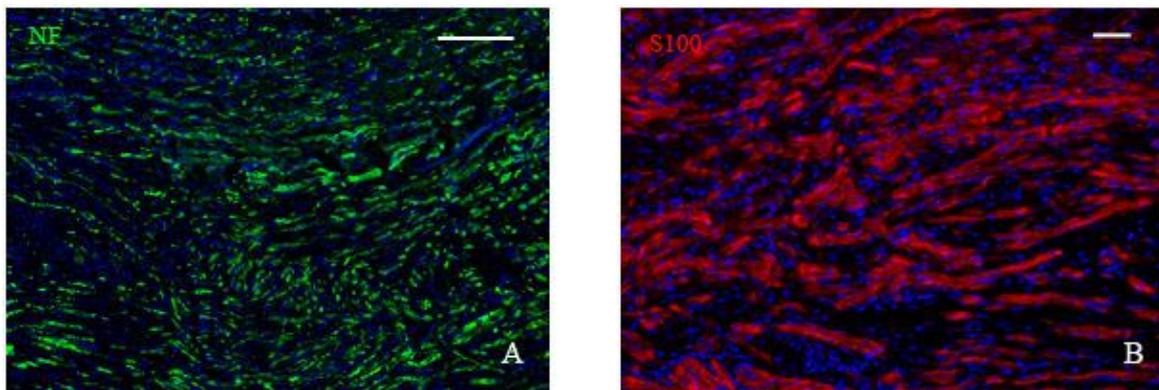


Figura 32: La región central de los injertos está totalmente colonizada por fibras nerviosas a los 75 días. Los axones NF⁺ forman cordones que tienden a orientarse paralelos entre si y al eje mayor de la prótesis (A). La localización de estos cordones es coincidente con el marcaje para S100 (B). El receptor p75^{NTR} no se encontró mediante técnicas de inmunofluorescencia en ninguna de las secciones estudiadas. (Barras de escala: A 250 μm y B 100 μm).

Como pudimos comprobar en las secciones semifinas siguientes, numerosos minifascículos con axones mielinizados colonizaban este nivel del injerto (segmento 4). La mayor parte de los minifascículos se distribuía por la periferia del tubo, mientras en el interior todavía podían encontrarse grandes áreas vacías (presumiblemente ocupadas por láminas de PLGA). En uno de los individuos se encontró lo que parecía alginato semidegradado. Las fibras mielinizadas encontradas a este nivel eran ligeramente más delgadas que las estudiadas en el segmento 2, habiéndose calculado su diámetro en 4.26 ± 0.16 mm. Los axones mostraron grosores de 3.64 ± 0.12 mm. Su envoltura de mielina también era más fina, según se desprendía del valor de su ratio G, que era de 0.85 (figura 33). En las micrografías de las secciones ultrafinas correspondientes se encontraron, además, numerosas fibras nerviosas no mielinizadas. Los procesos axonales asociados a la célula de

6. Resultados

Schwann se identificaron por su contenido en neurotúbulos y neurofilamentos, lo que confiere a su axoplasma un aspecto rayado y ligeramente más electrodenso. El exterior de las células de Schwann estaba tapizado por una característica lámina basal. Rodeando estas unidades a modo de endoneuro, se encontraron fibroblastos de citoplasmas oscuros y núcleos heterocromáticos. La mayor parte de los axones mielinizados eran de pequeño tamaño (entre 2 y 4 μm) y presentaban delgadas vainas de mielina de alrededor de 320 nm. La mayoría de los axones mielinizados se encontraron en los minifascículos de la periferia (figuras 33B y 33C). En las zonas más internas del conducto se encontraron menos fibras nerviosas mielinizadas y, sin embargo, eran más frecuentes las fibras nerviosas no mielinizadas (figura 33D). El estroma fibroso en la zona interna del conducto era de apariencia laxa y la ultraestructura desveló una menor densidad de fibras colágenas.

En la porción final del injerto extraído, una vez atravesada toda la longitud del conducto, encontramos marcaje positivo para el anticuerpo anti-neurofilamentos 200 kD. El anticuerpo se acumulaba en perfiles filiformes que identificamos como axones en regeneración. Los axones no se agrupaban formando cordones de gran tamaño y parecían seguir trayectorias aleatorias. En el tejido regenerativo formado entre el cabo nervioso distal y la prótesis, no se observó la presencia de células de Schwann S100^+ . Se apreciaron débiles procesos celulares positivos a p75^{NTR} (figura 34A). Más adelante, se observaron algunos axones en regeneración colonizando el tejido del nervio distal. En esta región también se detectó la presencia de elementos S100^+ , correspondientes posiblemente a células de Schwann que forman parte de las Bandas de Büngner generadas durante el proceso regenerativo (figura 34B). Estas células fueron vistas en mayor proporción que el número de axones NF^+ .

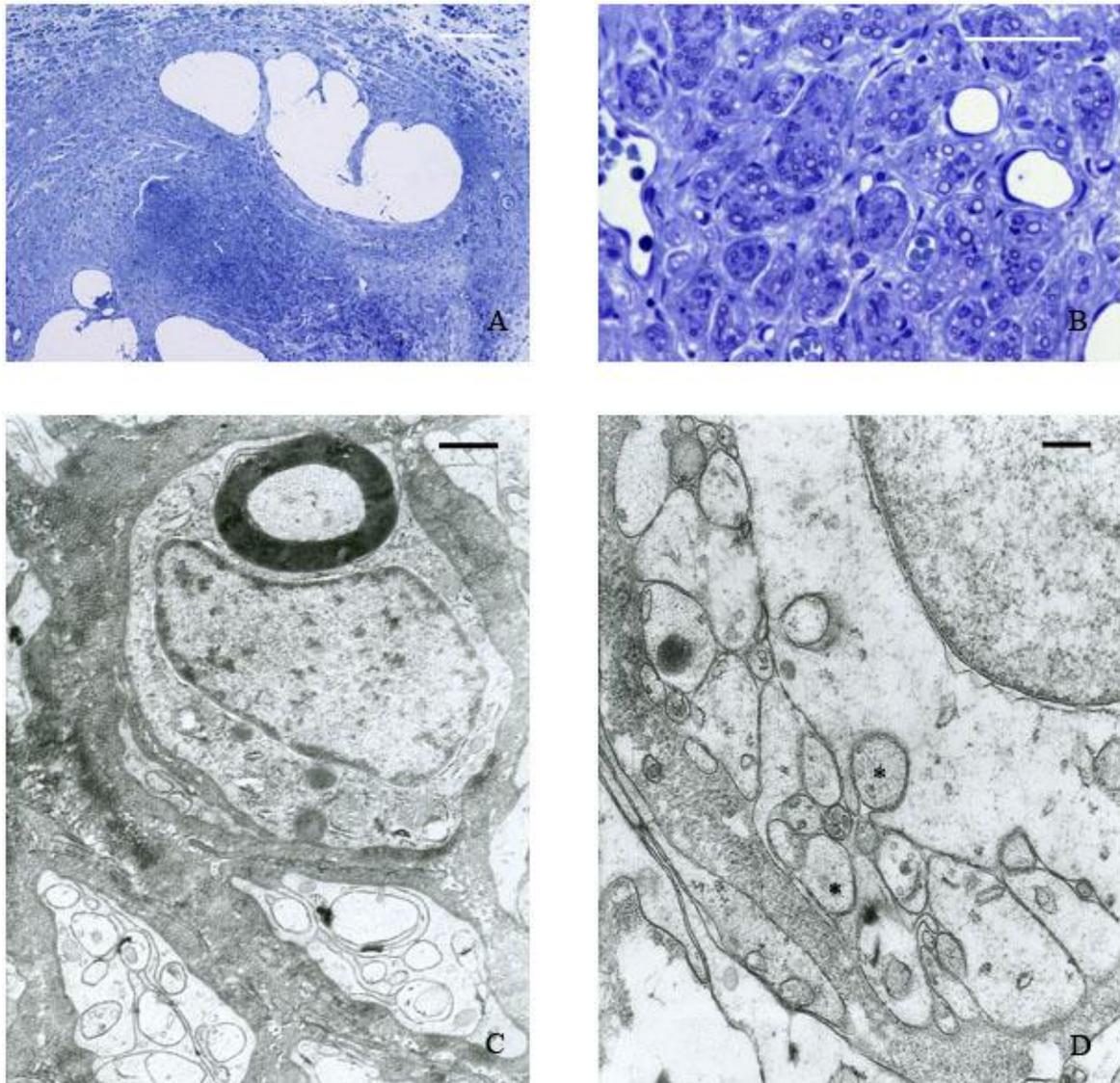


Figura 33: Secciones semifinas del segmento 4 y cortes ultrafinos correspondientes. El conducto se encontraba parcialmente ocupado por tejido regenerativo, encontrándose aún grandes espacios vacíos (A). El número de axones por cada minifascículo es menor que a nivel del segmento 2. Los minifascículos son también más pequeños (B). En C, un pequeño axón mielinizado por una célula de Schwann y varias fibras no mielinizadas en la periferia del conducto. D: Detalle de una fibra no mielinizada (unidad de regeneración de tipo II) en la zona interna del injerto. (Barras de escala: A 200 μm , B 50 μm , C 500 nm y D 200 nm).

6. Resultados

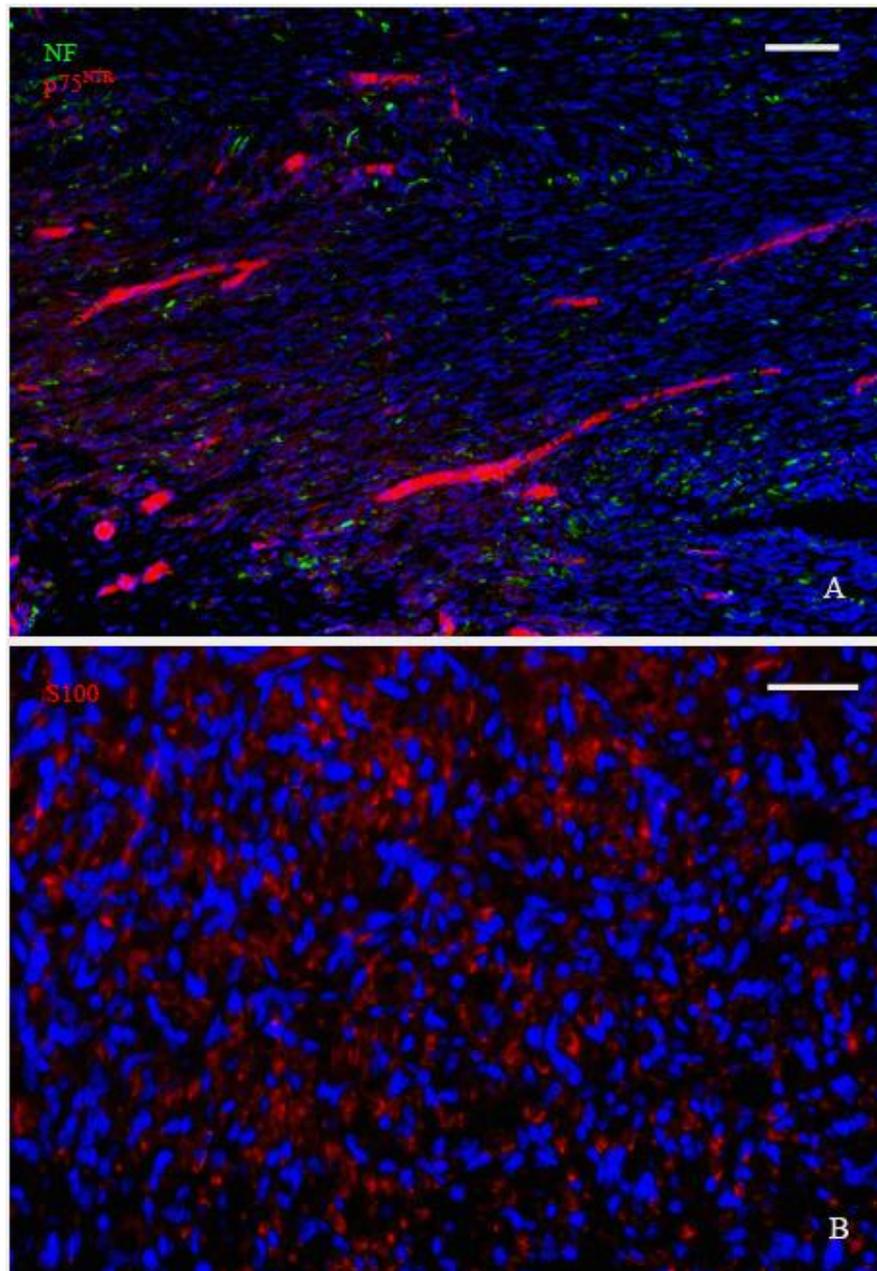


Figura 34: Tras 75 días, en el extremo distal del injerto aparecen numerosos axones en regeneración NF⁺. Los axones siguen trayectorias aleatorias hacia el cabo nervioso y son acompañados por células de Schwann que expresan muy débilmente el receptor p75^{NTR} (A). En el tejido se pueden apreciar varios vasos conteniendo eritrocitos. En B, débil marcaje S100⁺ en el cabo nervioso distal. (Barras de escala: 75 μ m).

6.3.2. Grupo 6. Implantes suplementados con NRG1 durante 75 días

Al igual que en el caso anterior (implantes no suplementados con NRG1), el aspecto exterior del injerto en las zonas de coaptación al nervio, era el de un nervio normal. La pared polimérica se había reabsorbido casi por completo en los extremos y permitían ver una imagen del nervio regenerado con vasos en su superficie, un epineruro uniforme y apariencia de continuidad.

En el extremo proximal del injerto observamos que el estroma regenerativo estaba totalmente colonizado por gruesos cordones de axones. Los axones, en general, presentaban calibres mayores de los observados en los grupos con implantes de 30 días. Los cordones de axones se empaquetaban unos con otros en paralelo y en la dirección del eje mayor del injerto (figura 35). Se observó una fuerte inmunorreactividad de los cordones nerviosos a S100. Sin embargo, prácticamente había desaparecido la expresión del receptor $p75^{NTR}$. La inmunotinción para anti- $p75^{NTR}$ se localizó en la periferia de los cordones nerviosos. De esta manera, los elementos $p75^{NTR+}$ fueron identificados como fibroblastos perineurales en esta región (figura 36).

6. Resultados

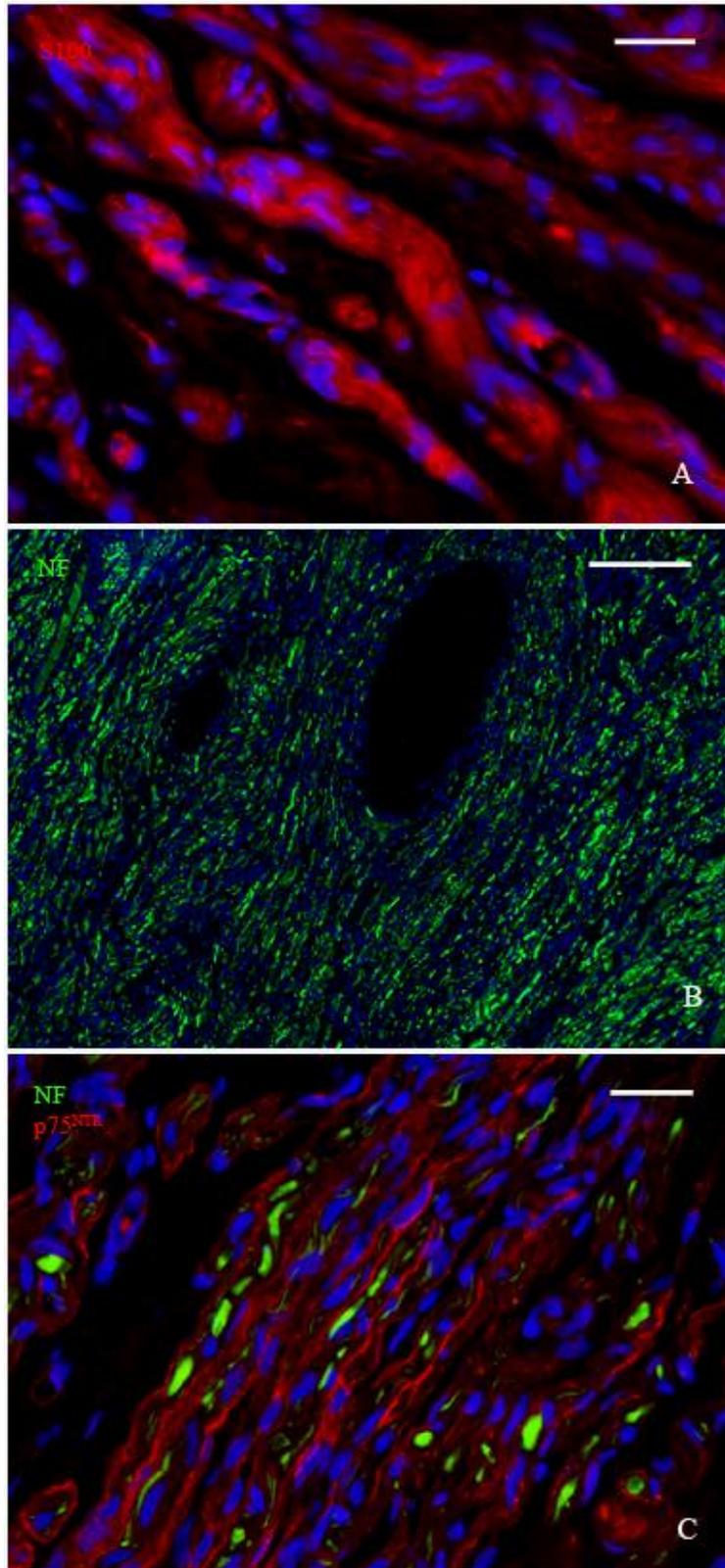


Figura 35: Después de 75 días, en el extremo proximal del injerto suplementado con NRG1, se observaron gruesos cordones de CS S100⁺ transportando axones regenerados (A). Los axones se orientaban preferentemente a lo largo del eje mayor del nervio, en gran cantidad (B). El diámetro de los axones era, a primera vista, mayor que el encontrado en el grupo sin NRG1 (ver figura 30C). Estos axones estaban acompañados por células p75^{NTR+} que identificamos tanto como CS como con fibroblastos perineurales (C). (Barras de escala: A y C 25 μ m. B 250 μ m).

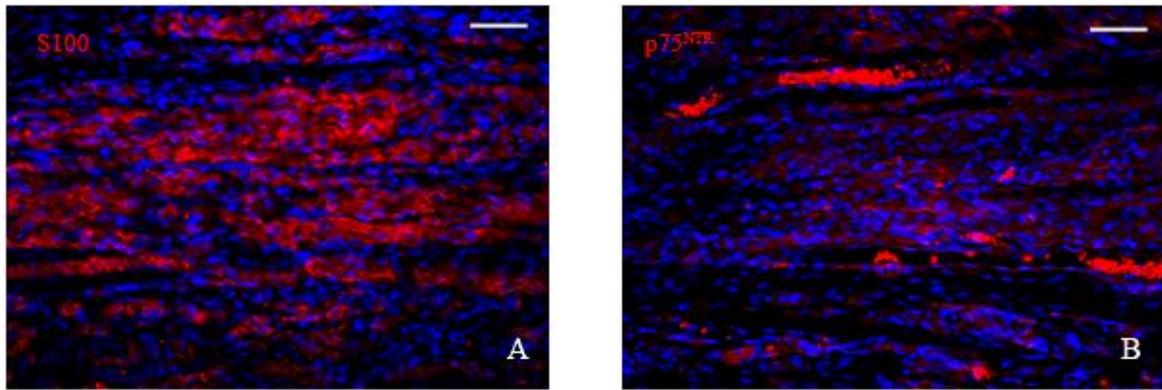


Figura 36: Diferencias en la expresión de los marcadores S100 y p75^{NTR} en el extremo proximal de un injerto suplementado con NRG1. A: El tejido regenerativo formado en el interior del conducto está totalmente colonizado por fascículos de fibras nerviosas S100⁺. B: En el mismo área de una sección consecutiva, el receptor p75^{NTR} sólo se presenta intensamente en el perineuro. (Barras de escala: 75 μ m).

En los cortes semifinos siguientes observamos, en sección transversal, los cordones nerviosos descritos antes. Estos grupos de cordones ocupan la práctica totalidad de la luz del conducto, a excepción de pequeñas áreas centrales correspondientes probablemente a los tabiques del armazón interno de PLGA (figura 37A). Los cordones o minifascículos están más densamente empaquetados en zonas más interiores del conducto y el espacio entre ellos está ocupado por finos tabiques de tejido conjuntivo. En la periferia del tubo los minifascículos se mostraban como estructuras independientes, rodeadas por grandes parcelas de estroma fibroso (figura 37B). Los minifascículos contenían entre 8 y 20 axones mielinizados y su tamaño era mayor que los encontrados a los 30 días tras el implante. En las zonas más internas del conducto, los minifascículos parecen formar parte de un fascículo mayor, separados por finos septos (figura 37C). En esta zona eran muy frecuentes las fibras nerviosas no mielinizadas. Tanto en esta región como en la central eran abundantes los vasos sanguíneos, asegurando una adecuada irrigación del tejido regenerativo.

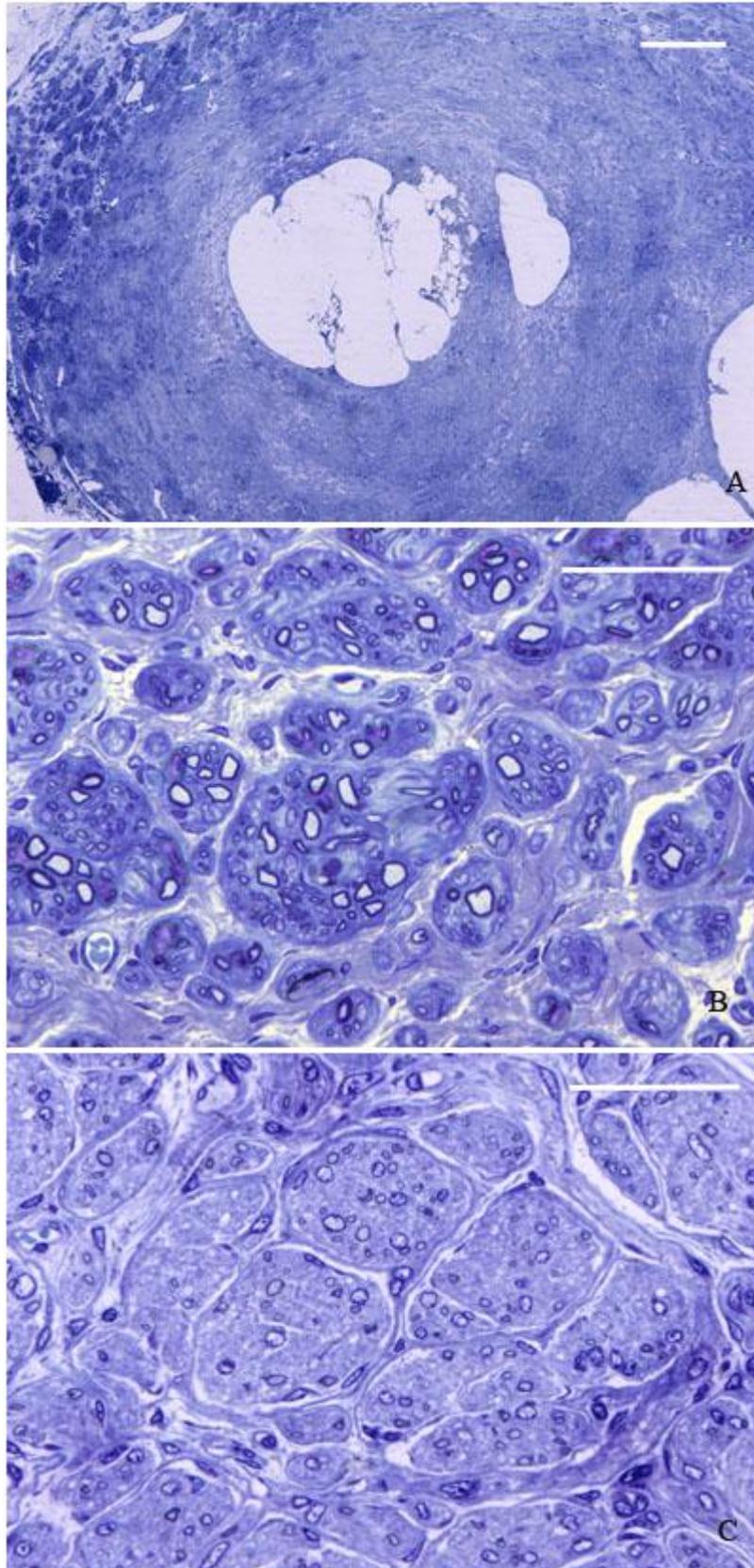


Figura 37: Corte semifino transversal que muestra una vista general del conducto a nivel del segmento 2 (A). En la periferia se encuentran minifascículos con axones mielinizados (B). Algunos fascículos contienen más de 20 axones mielinizados. C: En la zona central del conducto el tejido entre los fascículos es menor, construyéndose asociaciones fasciculares más compactas. (Barras de escala: A 200 μm , B y C 50 μm).

Las fibras mielinizadas de este nivel mostraron un calibre medio de $6.86 \pm 0.14 \mu\text{m}$, siendo calculado el diámetro de los axones en $4.69 \pm 0.09 \mu\text{m}$. La ratio G aproximada obtenida con estos datos es de 0.68, cercana a la esperada para un nervio normal ($G = 0.65$). La observación de las secciones ultrafinas correspondientes reveló que las fibras mielinizadas presentaban una vaina de mielina bien estructurada y gruesa (alrededor de $1.08 \mu\text{m}$). Los minifascículos estaban limitados por fibroblastos y por una matriz rica en fibras colágenas densamente empaquetadas.

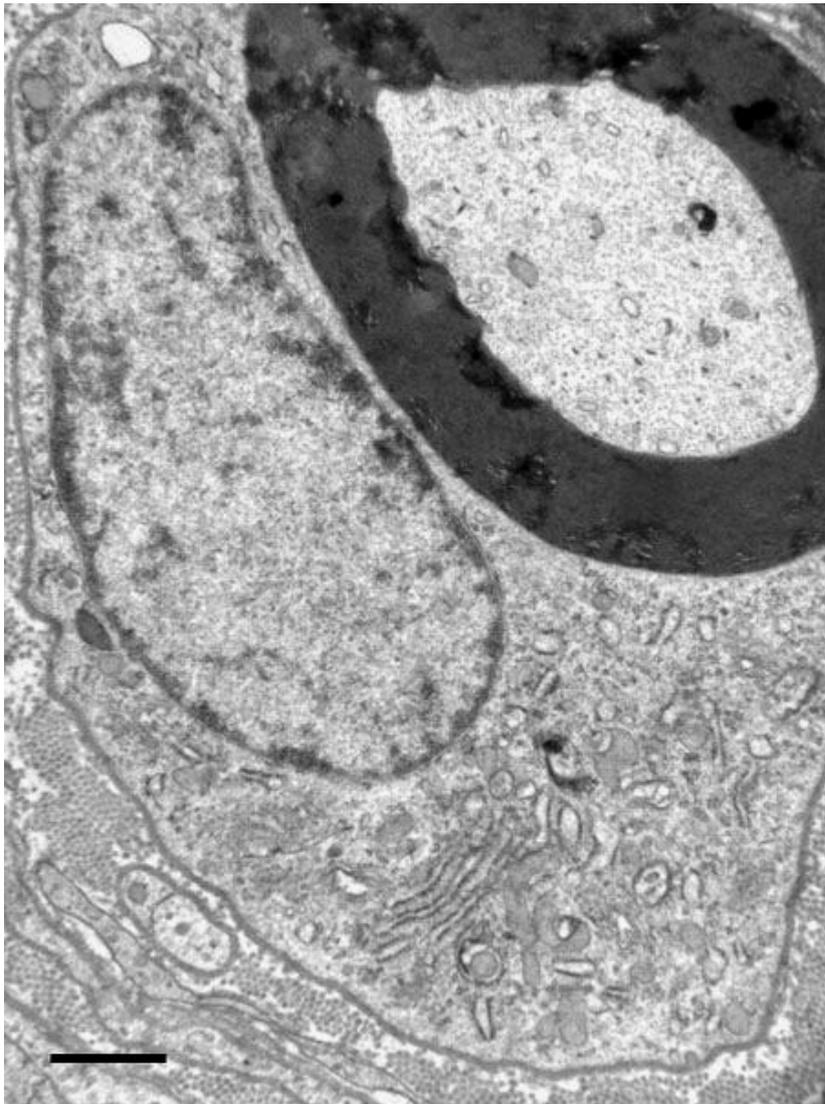


Figura 38: Ejemplo de una fibra mielinizada a nivel del segmento 2 de un injerto suplementado con NRG1 implantado durante 75 días. (Barra de escala: $1 \mu\text{m}$).

6. Resultados

En el segmento 3, correspondiente a la zona central del injerto, observamos gran cantidad de axones NF⁺ (figura 39A). Estos cordones colocalizaban con la distribución de cordones celulares S100⁺ y se orientaban mayoritariamente según el eje mayor del injerto (figura 39B). Estaban compuestos por 3 ó 4 células de Schwann (estimadas contando los núcleos teñidos con DAPI presentes en el cordón) y entre 4 y 10 axones NF⁺. Los cordones eran más delgados que los encontrados en segmentos anteriores. La localización de p75^{NTR} se restringía a la periferia de los cordones nerviosos, indicando que podrían tratarse de células perineurales. También se observaron algunos perfiles filiformes en el interior de los cordones que identificamos como células de Schwann no mielinizantes o inmaduras (figura 39C).

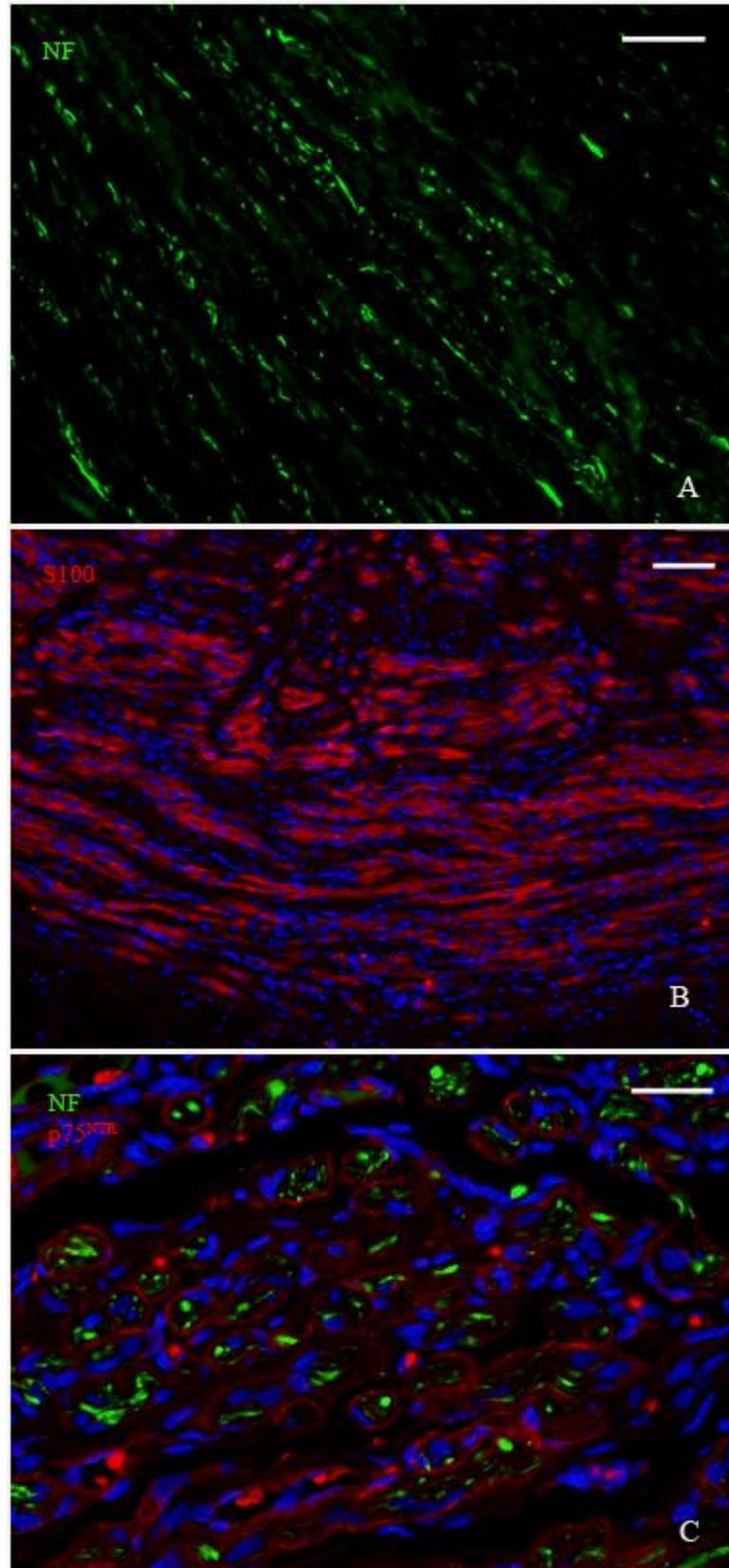


Figura 39: La región central del injerto estaba totalmente recorrida por axones NF^+ que formaban cordones o minifascículos paralelos (A). Los axones estaban acompañados por células de Schwann que mostraban una elevada inmunoreactividad a anti-S100 (B). Los minifascículos estaban limitados por células perineurales $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ (C). Algunos perfiles filamentosos $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ en

6. Resultados

el interior de los fascículos correspondían a CS. (Barras de escala: A 50 μm , B 75 μm y C 25 μm).

Las secciones transversales siguientes mostraron que el conducto contenía gran cantidad de tejido nervioso regenerativo. Las partes más internas del conducto solían estar vacías de tejido, ocupadas por láminas sin degradar de PLGA (figura 40A). El resto estaba cubierto por cientos de minifascículos que contenían tanto fibras mielinizadas como fibras no mielinizadas.

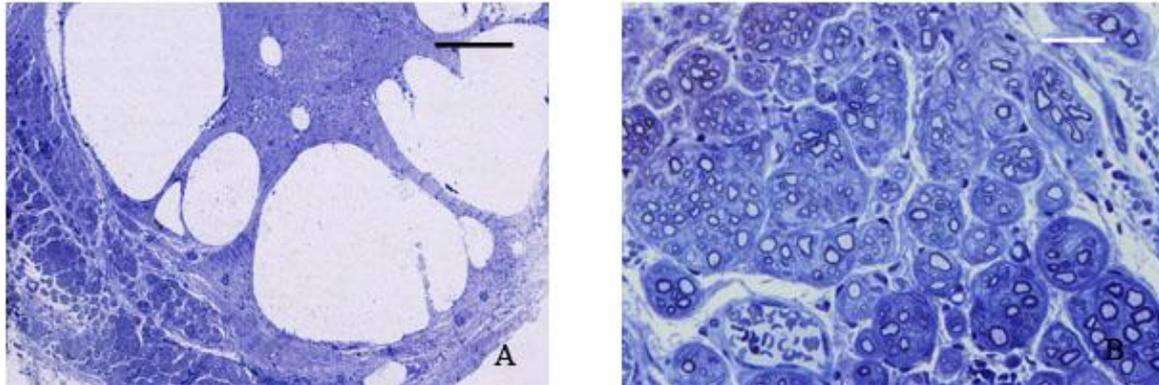


Figura 40: Después de 75 días, la parte final de las prótesis suplementadas con NRG1 se encontraba ocupada por tejido nervioso regenerativo tanto por la periferia como por la zona más interna del conducto. Sin embargo, se podían observar grandes zonas vacías (A). Los minifascículos contienen fibras mielinizadas en gran número y tienden a fusionarse entre sí (B). (Barras de escala: A 200 μm y B 25 μm).

Las fibras mielinizadas tenían un grosor medio de $5.30 \pm 0.09 \mu\text{m}$ y sus axones presentaban calibres de $4.09 \pm 0.16 \mu\text{m}$. Estas fibras eran ligeramente más finas que las encontradas en los segmentos anteriores (más cercanos al cabo proximal) y presentaron un ratio G de 0.77. Los minifascículos se distribuían preferentemente por la periferia del conducto, dejando la zona más interna ocupada por un tejido más pobre en fibras mielinizadas pero abundante en fibras no mielinizadas, como pudimos comprobar al estudiar los cortes ultrafinos correspondientes. En algunos casos, grupos de axones pequeños colonizaban la zona asociados a procesos de una célula de Schwann. Observamos una forma de asociación distinta a la de una fibra amielínica típica en estos casos. En primer lugar se podían encontrar varios axones yuxtapuestos, sin interposición entre ellos de prolongaciones citoplasmáticas de la CS. Además, algunos de ellos se encontraban expuestos al medio extracelular, sin la cobertura del citoplasma de la CS. Eso sí, estaban protegidos por la lámina basal de la célula de Schwann. Estas fibras se encontraban aisladas unas de otras, sin formar minifascículos agrupados por procesos de fibroblastos (figura 41C). Los axones mielinizados de la periferia, sin embargo, se agrupaban en minifascículos (en los que

también hay fibras no mielinizadas con morfología típica) rodeados de procesos citoplasmáticos de células perineurales. Entre los fascículos se acumulaban ordenadamente fibras colágenas. Numerosos vasos aseguraban la supervivencia del tejido a ese nivel del injerto. No se observaron en esta etapa células inflamatorias o fagocitarias y era raro encontrar restos de alginato.

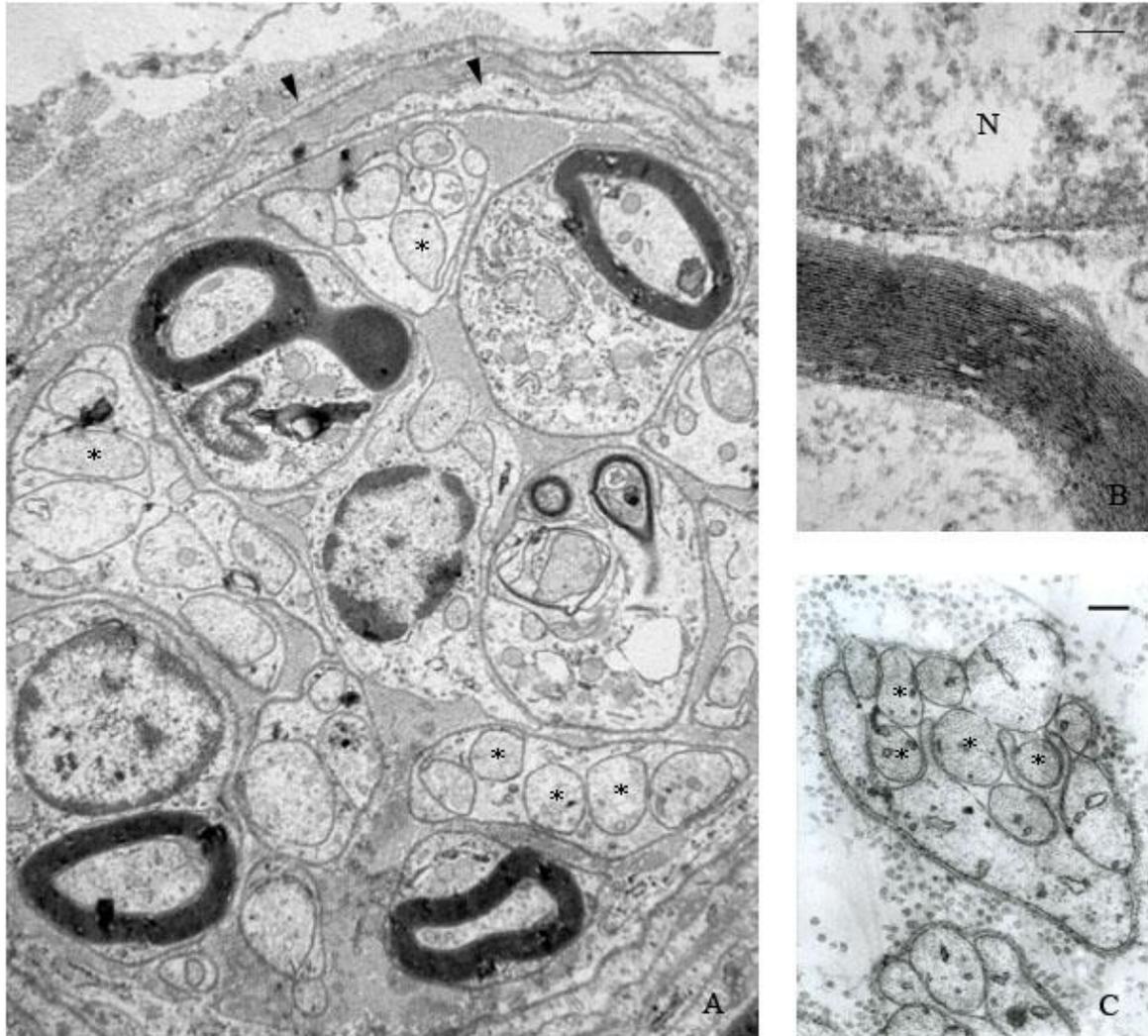


Figura 41: En A, un minifascículo de la región distal de la prótesis muestra fibras mielinizadas y axones no mielinizados (asteriscos). El fascículo está rodeado por procesos de células perineurales (puntas de flecha). B: Detalle de la organización laminar de una vaina de mielina. Algunos axones se agrupan acompañados por procesos de una CS (C). Los axones no están totalmente rodeados por el citoplasma de la CS y pueden presentarse enfrentados directamente a la matriz extracelular, separados únicamente por la lámina basal de la CS. (Barras de escala: A 2 μ m, B 100 nm y C 200 nm).

En uno de los animales de este grupo sólo se encontraron fibras mielinizadas en un pequeño paquete adherido a la cara interna de la pared del conducto. Al estudiar las preparaciones que le seguían (segmento 5), observamos que contenían axones NF^+ en una can-

6. Resultados

tividad relativamente alta en comparación con lo anterior, así que suponemos que la escasez de axones en el segmento 4 de ese animal se debió al procesamiento histológico de la muestra.

En la parte final del injerto pudimos observar numerosos axones NF^+ en dirección al nervio distal. En la salida del conducto, hacia el cabo distal del nervio, el estroma regenerativo mostraba gran cantidad de axones en regeneración formando cordones como los observados en el segmento central del injerto. En estos cordones, bien orientados en su mayoría, observamos un intenso marcaje para la proteína S100 (figura 42A), pero también una fuerte afinidad por el anticuerpo contra el receptor p75^{NTR} (figura 42B). Muchos de estos axones fueron registrados penetrando largas distancias en el tejido del nervio degenerado (hasta 3 cm más alejados del final de la prótesis), integrándose en las bandas de Büngner formadas anteriormente por las células de Schwann y las células endoneurales. En estas fibras regeneradas, cuanto mayor era la distancia recorrida por el axón, las células de Schwann se mostraban positivas para p75^{NTR} y la intensidad del marcaje S100 detectado era cada vez más débil.

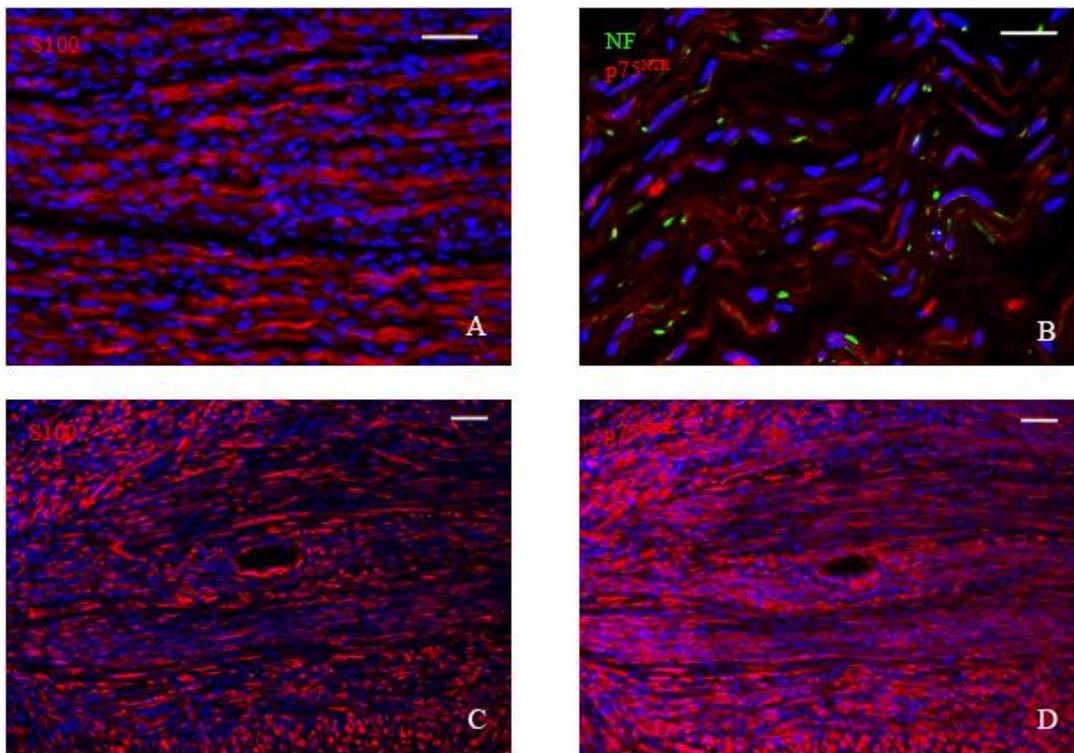


Figura 42: En la región distal del injerto suplementado con NRG1 encontramos numerosos cordones de fibras con células de Schwann S100^+ en disposición paralela y correctamente orientados (A). El marcaje $\text{p75}^{\text{NTR}+}$ en estas secciones corresponde a células de Schwann que acompañan a axones no mielinizados (B). En el extremo distal del injerto con NRG1 hay un intenso marcaje para S100 (C) y p75^{NTR} (D) como se observa en estas secciones seriadas. (Barras de escala: A 50 μm , B 25 μm , C y D 75 μm).

7. Discusión

7.1. Diseño de la bioprótesis

Tan sólo tres de los implantes resultaron interrumpidos entre el cabo proximal y el cabo distal. El colapso de los conductos de PLGA se debe a la degradación del polímero y al continuo crecimiento y movimiento del animal. El estrés mecánico sobre el conducto ocasiona la elongación del conducto y el consiguiente colapso. Esto puede inhibir la capacidad de los axones para regenerar y es un problema documentado de los canales nerviosos artificiales (Fine *et al.*, 2000). En nuestro diseño experimental hemos incluido una estructura interna en el conducto (dos láminas de PLGA de 30 mm x 3 mm) que funciona a modo de sustrato para la regeneración nerviosa, pero que también sirve como armazón que confiere cierta rigidez al tubo frente al doblamiento y que evita que se obstruya. Además, la doble lámina de PLGA que forma la estructura de la pared del conducto ha demostrado ser una solución eficaz contra el doblamiento del conducto. Además, retrasa la degradación acelerada y evita la pérdida de resistencia del conducto.

La calidad y la naturaleza de la estructura del nervio regenerado resultante está directamente relacionada con la longitud del espacio a cubrir (Lundborg *et al.*, 1982). Según la literatura existente, en espacios superiores a 10 ó 15 mm no se da regeneración nerviosa en el nervio ciático de la rata sin la adición de sustancias tróficas adicionales, o ésta es muy pobre (Lundborg *et al.*, 1982). La mayoría de las aproximaciones experimentales, además, requieren la utilización de una fuente externa de células de Schwann o de otros tipos celulares que imiten su función (Brown *et al.*, 1996; Cheng y Zochodne, 2002; Amoh *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2005; Chalfoun *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista biológico, los resultados fisiológicos tras una lesión de un nervio y su reparación dependen de la cantidad de células nerviosas supervivientes tras la lesión, de la velocidad y la calidad de la elongación axonal, de la orientación y la especificidad en el crecimiento de los axones en regeneración, de la supervivencia y el estado de los órganos diana, y de los procesos de reorganización cortical en las cortezas motora y somatosensorial (Abe *et al.*, 1996; Groves *et al.*, 1997; Lundborg, 2000).

7. Discusión

Es importante reconocer que incluso en las mejores circunstancias, puede suceder una incorrecta reconexión del cabo distal. Una secuela común a la lesión es la transposición de componentes sensitivos y motores en una función nerviosa mixta. A medida que el axoplasma en crecimiento alcanza la placa motora terminal, se da una rápida división del axoplasma hasta que se forma la unión mioneural. Este hecho puede estimular la recuperación de antiguas estructuras de las placas motoras, o se pueden formar nuevas áreas por un proceso similar a la neurotización. Una secuencia de eventos similar ocurrirá en la regeneración de los componentes sensitivos en los nervios de función mixta. Sin embargo, si la transposición axonal ha tenido lugar, se dará el fracaso en la maduración de la estructura y la atrofia del axón. El resultado será una unidad axónica no funcional. A los 12 ó 16 meses de la lesión, se registra un déficit del 25% aproximadamente incluso con una reparación quirúrgica ideal (Zochodne, 2008).

En una regeneración exitosa tras la coaptación quirúrgica de la neurectomía, los axones ramificados que crecen desde el cabo proximal cruzan el espacio entre ambos cabos y encuentran una banda de Büngner apropiada. En el ser humano, los axones crecen una media de 1 mm por día (Lundborg, 2000). En nuestras observaciones utilizando prótesis bioabsorbibles, hemos encontrado un crecimiento menor, tanto en el caso de los conductos suplementados con NRG1 como en los no tratados. Hemos observado velocidades de crecimiento axonal de 0,43 mm por día en los conductos no tratados y de hasta 0,51 mm por día en los que contenían NRG1. En el periodo máximo de tiempo estudiado (hasta 75 días), hemos observado que las fibras nerviosas han atravesado, en gran número, la prótesis ineterpuesta entre los dos cabos seccionados. Hemos de tener en cuenta que las estimaciones de la velocidad de crecimiento axonal que encontramos en la literatura, se refieren en su inmensa mayoría, a un supuesto en el que se da una sección de un tronco nervioso solucionable con la aproximación quirúrgica de ambos cabos, esto es, sin que haya un espacio vacío entre ellos. De esta manera, los axones en regeneración encuentran rápida y fácilmente el cabo nervioso distal y numerosas bandas de Büngner accesibles y con un ambiente neurotrófico óptimo. El siguiente supuesto más citado es el autotrasplante de un segmento de nervio sensorial para solucionar una lesión en la que hay pérdida de tejido nervioso. Este modelo, empleado como referencia en la clínica, presenta la ventaja de ser un injerto de un material autólogo y que porta una fuente importante de células de Schwann compatibles. Más adelante expondremos alguna de los inconvenientes de esta técnica. En nuestro modelo, la regeneración de los axones no está ayudada a priori por

ningún elemento exógeno (a excepción del factor de crecimiento añadido a los grupos correspondientes), ya que unas de nuestras aspiraciones sería evitar la necesidad de extirpar un nervio sano para la reparación y disponer de una prótesis nerviosa preparada en el momento perioperatorio.

Durante una reparación nerviosa normal, algunos de los axones que llegan al cabo distal atraviesan toda la longitud del nervio hasta formar sinapsis funcionales. Sin embargo, suelen ocurrir numerosos fallos en el patrón de reinervación muscular y sensitivo. La desviación de las fibras nerviosas en crecimiento sucede en el momento de elegir una de las bandas de Bünger, de donde ya no podrán desviarse. Los errores en la regeneración pueden llevar a la formación de neuomas. También se debe anotar que la sección de un nervio periférico provoca una acusada atrofia de las correspondientes dianas, como las fibras musculares (Fine *et al.*, 2000). En nuestra ventana temporal no podemos aventurar una reconexión en los órganos diana. Un reajuste en el número de perfiles neurales a más largo tiempo de supervivencia acomodaría la tasa de crecimiento tan elevada que observamos. En el caso de los animales tratados con NRG1, hemos observado una mayor proliferación de elementos gliales tras la lesión. Esta enorme masa de células de Schwann resultante estimula la ramificación y elongación de los axones en regeneración de forma acelerada.

La organización de los axones en el conducto durante la regeneración es aleatoria, ya que no disponen de bandas de Büngner que les sirvan de guía. Las propias células de Schwann proliferantes forman tubos gliales que conducen a los axones en una dirección paralela al eje mayor del conducto (ver figura 22C). Una asociación de mayor jerarquía organiza las fibras nerviosas en pequeños fascículos rodeados por fibras perineurales. En condiciones normales, los fascículos del interior de un nervio sufren continuos procesos de división e integración con los fascículos vecinos. El patrón del fascículo cambia cada 50 mm a lo largo de todo el nervio periférico. De esta manera, a menos que los fascículos sean unidos uno a uno por técnicas microquirúrgicas, la interposición de un conducto, así como la de un segmento de nervio, no garantiza la correcta migración axonal y la canulación hasta el cabo distal (Millesi *et al.*, 1972; Lutz, 2004).

En cuanto a la estrategia para cubrir un espacio, el trasplante autólogo tiene varios inconvenientes. El diferente tamaño del diámetro y longitud del injerto utilizado puede llevar a una pobre recuperación funcional. La unión inadecuada de los fascículos donantes y

7. Discusión

receptores a la hora de la cirugía puede llevar a un fallo clínico. La tensión en las líneas de sutura puede derivar en dehiscencia y fracaso (Deumens *et al.*, 2010). Finalmente también influyen factores biológicos. Los injertos de nervio no son diferentes de otros injertos biológicos avascularizados. La regeneración del aporte sanguíneo debe ser aportada por los tejidos circundantes para contribuir a la nutrición de los elementos del neurilema. El riesgo de muerte por isquemia de los nuevos elementos formados es elevado en la parte central del injerto, especialmente en estos tejidos poco vascularizados, y puede llevar también a la destrucción de los túbulos de células de Schwann y al fracaso de la regeneración axonal a través del injerto (Zochodne, 2008). Este riesgo de muerte de las células de Schwann es mayor en los trasplantes alogénicos y heterólogos en los que además del aporte vascular deficiente, actúa la respuesta inmune inflamatoria. Es importante señalar que se da una carrera entre la regeneración de los axones cruzando el injerto libre y la destrucción de los túbulos de las células de Schwann.

En el caso de la interposición de un conducto reabsorbible, no se dan procesos degenerativos en el interior del injerto y no hay una reacción de respuesta inmune sobre el material. El progreso de los axones desde el cabo proximal se realiza sobre el material de relleno del conducto, que sirve como matriz extracelular. En el caso de las prótesis suplementadas con NRG1, tanto el armazón del conducto como su relleno tienen unidas moléculas de NRG1. Estas moléculas son captadas por la superficie celular de las células de Schwann reactivas y estimulan su proliferación y aceleran la migración. La presencia de numerosas células de Schwann en el entorno de la regeneración acumula un gran surtido de factores de crecimiento nerviosos, como NGF, bFGF, BDNF y GDNF. Estos factores promueven el crecimiento axonal. La función acumuladora del conducto es un factor importante en futuras aplicaciones clínicas en la reparación de lesiones de los nervios periféricos.

El extremo libre del cabo distal merece especial atención. Después de la lesión, el axón en esta región tiende a alargarse y a aislarse de otras porciones de nervio en degeneración. Esta unidad puede sobrevivir hasta dos semanas antes de degenerarse. Como los elementos del tejido conectivo proliferan en las primeras fases degenerativas, los fibroblastos endoneurales se entrelazan en el segmento aislado. Este hinchamiento o tumefacción se denomina glioma, schwannoma o neuroma distal (Zochodne, 2008). Se compone exclusivamente de elementos del tejido conectivo originados desde el perineuro, el endo-

neuro y células de Schwann pleomórficas. Con el paso del tiempo el glioma se contrae, coincidiendo con la atrofia del cabo distal. Si no se diera una reconexión rápida de ambos cabos, se produciría un glioma irreversible.

7.1.1. Estructura y materiales

El alginato se presenta como un medio adecuado para la migración y la proliferación de las células de Schwann y estimula la elongación de las neuritas de los axones motores y sensoriales periféricos.

El alginato permanece en el interior del tubo por un periodo de tiempo determinado, siendo inapreciable a los 75 días del implante de la prótesis. Esto se deduce de la observación de las secciones semifinas transversales en los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo. No hay diferencias significativas en la degradación del alginato en el interior de los tubos control y experimental. En ambos casos se da una fragmentación gradual del hidrogel a medida que transcurre el tiempo. Además, en los tiempos más cortos de supervivencia, la degradación es mayor por los extremos del tubo y decrece hacia la zona medial. Este hecho puede indicar un posible efecto degradante de los elementos celulares sobre la matriz de alginato. Posiblemente los numerosos macrófagos infiltrados que se observan en las primeras etapas de la regeneración, sean los responsables principales de la fagocitosis de restos de alginato.

La resistencia del alginato para a ser hidrolizado, hace que sea muy duradero en el tiempo, permitiendo que las moléculas que lleve inmovilizadas, en este caso la β -Neurregulina 1, esté presente en el medio durante largos periodos de tiempo. Por otro lado, la unión débil de dicho factor de crecimiento con el alginato mediante enlaces covalentes o fuerzas iónicas, hace que la simple ruptura de esos enlaces libere las moléculas ancladas y que el efecto sea inmediato.

Las diferencias más significativas entre los grupos experimentales no suplementados y los suplementados con β -Neurregulina 1, se presentan en las primeras etapas de la recuperación. Este hecho posiblemente sea debido a la lábil unión de la NRG1 a la matriz de alginato. Su efecto es muy pronunciado en las primeras dos semanas postoperatorias.

El alginato utilizado en este estudio contiene una elevada proporción de bloques M, que son cortos y se unen entre si por largos segmentos que son elásticos y que resultan en

7. Discusión

un gran colapso de la estructuras de bloques M, y que finalmente deriva en un tamaño de poro menor. Así, según Mohanna y colaboradores, los axones y las células de Schwann en regeneración tendrían más difícil encontrar un camino de baja resistencia, y de esta manera se reduciría la tasa de regeneración. En este sentido, la observación microscópica de la regeneración en los conductos rellenos de alginato, muestra que las células tienden a crecer por la superficie exterior del hidrogel y que no penetran en él en las etapas iniciales de la regeneración. Sin embargo, a los 30 días de la colocación de los implantes, el tejido regenerativo está integrado en la matriz de alginato. Esta matriz sintética comienza a ser sustituida por nueva matriz extracelular creada por las células de Schwann y los fibroblastos del nuevo tejido. Por otro lado, la presencia de alginato podría dificultar la acción neurotrófica de los factores de crecimiento liberados desde el cabo distal, particularmente en el caso de conductos de largas dimensiones en los que hay mayor volumen de alginato en el interior (Mohanna *et al.*, 2003). Observaciones similares fueron hechas por otros investigadores en conductos que empleaban geles de colágeno o laminina como matriz intraluminal (Valentini *et al.*, 1987; Labrador *et al.*, 1998). Estos autores pensaron que los residuos de gel remanente bloqueaban la difusión de los factores neurotróficos y de esta manera ralentizaban la regeneración axonal. Propusieron que se solucionaría el problema disminuyendo la concentración de proteína en el gel (Valentini *et al.*, 1987; Labrador *et al.*, 1998). La presencia de macrófagos en los primeros días de la reparación (observados en número considerable en nuestras preparaciones a los 15 días del implante) podría contribuir a la eliminación de gran parte del gel de alginato, ya que observamos que se degrada a medida que avanza la generación de tejido. Mientras que otros autores reportan observaciones de hidrogel de alginato a los 63 días y una pobre regeneración (Mohanna *et al.*, 2005), en nuestras propios estudios los restos de alginato en el interior de los implantes eran raros a los 75 días, y tan sólo fueron encontrados en algunas regiones donde el tejido regenerativo era escaso. En la mayoría de los casos la totalidad de la luz del conducto estaba ocupada por tejido regenerativo. En las prótesis suplementadas con NRG1 la presencia de fibras nerviosas en regeneración estaba especialmente potenciada, habiendo sustituido por completo la matriz de alginato. De todas formas, la desaparición del alginato es lenta ya que las células de los mamíferos no poseen enzimas capaces de degradar el alginato.

7.1.2. Componentes celulares: un modelo de prótesis acelular

Independientemente del tipo de conducto no nervioso empleado para cubrir el espacio entre los cabos seccionados, los investigadores tuvieron claro muy pronto que la disponibilidad de una cantidad suficiente de células de Schwann a lo largo de la longitud del implante, era el punto crítico para sustentar la regeneración axonal. De hecho, cuando se empleaban conductos autólogos no nerviosos, las células de Schwann necesarias para la regeneración del axón en el interior del tubo, se originan por la migración bilateral desde ambos extremos seccionados (Williams *et al.*, 1983; Dubovy y Svizenska, 1992; 1994; Torigoe *et al.*, 1997; Dubovy *et al.*, 2001; Fornaro *et al.*, 2001). La migración de las células de Schwann desde el cabo proximal es más lenta y acompaña el crecimiento del axón, mientras que la migración de las células de Schwann desde el cabo distal es más rápida y se considera que guía la regeneración axonal contribuyendo al efecto atrayente neurotrófico distal (Tos *et al.*, 2000; Tos *et al.*, 2004). Sin embargo, la migración de las células de Schwann desde los dos cabos seccionados podría no ser suficiente para sustentar la regeneración axonal en el interior del conducto, especialmente cuando han de cubrirse grandes distancias (Raimondo *et al.*, 2005). Hay un interesante debate respecto a la distancia máxima en la cual la influencia neurotrófica del cabo distal sobre las fibras en regeneración del cabo proximal es efectiva. Esta distancia podría ser tan pequeña como 5 mm en la rata (Longo *et al.*, 1983; Brunelli *et al.*, 1994; Kiyotani *et al.*, 1996; Strauch *et al.*, 1996; Mohanna *et al.*, 2003).

Sería necesario el enriquecimiento de los conductos con células de Schwann cultivadas para incrementar la eficacia de los conductos sintéticos. Sin embargo, la supervivencia de las células trasplantadas en el interior del conducto depende de varios factores. En primer lugar es necesaria una rápida y profusa vascularización del implante, ya que el oxígeno es el elemento limitante. Las células no pueden estar más alejadas que unos cientos de micras de un capilar sanguíneo (Sheridan *et al.*, 2000). Estudios con hepatocitos trasplantados demostraron que la mayoría de las células trasplantadas en un polímero de 3 mm de espesor, murieron en un corto espacio de tiempo (Sheridan *et al.*, 2000). Las células supervivientes se encontraron en los bordes del constructo, en la cercanía de los capilares del tejido circundante. La invasión de capilares en el constructo es un fenómeno que se

7. Discusión

prolonga en el tiempo. Las células que pudieran localizarse en el interior del implante morirían provocando la liberación de citoquinas proinflamatorias y de agentes citotóxicos.

Además, la cinética de la degradación de los geles de alginato influye en la correcta formación del tejido nuevo. Así, los geles que tienen una baja velocidad de degradación, pueden provocar que las células trasplantadas no consigan una formación de tejido nuevo significativa ni deposición de matriz extracelular por impedimentos de tipo estérico. Por otro lado, una velocidad excesiva de degradación del alginato puede causar una pérdida prematura del soporte celular, disminuir la capacidad de adhesión celular e inhibir la proliferación celular (Sheridan *et al.*, 2000).

La completa invasión del conducto por parte de las células de Schwann se conseguiría alrededor del día 60 si se considerasen las tasas de crecimiento axonal y glial que hemos obtenido en nuestros experimentos (0.51 mm/día en prótesis suplementadas con NRG1 durante los primeros 30 días). De esta manera no se considera necesaria la adición de células de Schwann exógenas, ya que la colonización de toda la longitud garantiza la supervivencia de los axones en regeneración. Nosotros hemos observado una total colonización del implante en los supuestos tratados con NRG1. A los 30 días, tan sólo la parte central del conducto queda vacía de elementos celulares y permanece rellena de la matriz de alginato. La buena estructuración de las fibras nerviosas se puede evidenciar por la presencia de multitud de vainas de mielina perfectamente desarrolladas en la porción inicial del conducto. Estas vainas de mielina presentan un mayor grosor en los animales tratados con NRG1. Nosotros hemos podido registrar una ratio G de 0.68 en esta región, muy similar a la ratio normal para un nervio periférico. Este hecho puede deberse a la NRG1 tipo III producida en la superficie de los axones y su relación con el grosor del axón. El mayor grosor del axón se relaciona con una mayor maduración de la regeneración. Esta diferencia entre los grosores de axones y vainas de mielina podría explicarse por la acción de la NRG1 sobre el crecimiento acelerado de los axones en regeneración.

7.1.3. La Neurregulina como factor de crecimiento

Con la manipulación del ambiente local de los implantes se han conseguido algunos éxitos en la reparación de espacios pequeños. Sin embargo, hay pocas referencias sobre la acción de los factores neurotróficos en la reparación de grandes lesiones de nervio periférico. La mayoría de los trabajos acerca de la reparación de lesiones pequeñas se ha centrado en la aplicación de un único factor neurotrófico que actuase específicamente sobre las neuronas o sus prolongaciones (Withworth et al., 1995b; Sterne et al., 1997; Tham et al., 1997). Sin embargo, la utilización de la β -Neurregulina 1 como factor de crecimiento exógeno y que actúa directamente sobre las células de Schwann, desencadenaría todo un espectro de mecanismos que podrían indirectamente estimular la regeneración del nervio periférico.

Durante la embriogénesis, la NRG1 es imprescindible para el correcto desarrollo de los nervios periféricos. En mutantes en los que estaban delecionados los genes para NRG1, ErbB2 y ErbB3 (Britsch *et al.*, 2001), las motoneuronas y las neuronas ganglionares sensoriales acaban degenerando en los primeros estadios de la vida embrionaria. Estos mutantes carecen de células de Schwann, ya que los PCS tienen anulada la capacidad de migración y de diferenciación a células de Schwann inmaduras. La degeneración prematura de las motoneuronas y de las neuronas ganglionares se debe, según demuestran Britsch y colaboradores, a la ausencia de células de Schwann y los factores tróficos que producen (Britsch *et al.*, 2001; Britsch, 2007).

La aportación exógena de β -NRG1 de tipo I induce la proliferación de líneas de células de Schwann en cultivo (Lupu *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 2012), así como de células de Schwann humanas fetales *in vitro* extraídas de los ganglios de la raíz dorsal (Baek y Kim, 1998). En células procedentes de nervios periféricos maduros, se ha observado una acentuada mitogénesis en respuesta a la combinaciones de factores de crecimiento como NRG1 y forskolina (Morrissey *et al.*, 1995). Además, nuestro grupo ha demostrado su eficacia como agente proliferativo único tanto en células de Schwann de animales adultos (rata y conejo), como en células de Schwann procedentes de exéresis quirúrgicas de humano adulto (de la Fuente *et al.*, 2012). En este caso la β -NRG1 de tipo I

7. Discusión

fue el único factor de crecimiento añadido al medio de cultivo, eliminando la posibilidad de una interferencia en los resultados por parte de otros factores de crecimiento como la forskolina, un potente mitógeno ampliamente utilizado en combinación con la NRG1 para expandir cultivos de células de Schwann (Schworer *et al.*, 2003).

La NRG1 estimula la proliferación de las células de Schwann e induce la liberación de varios factores neurotróficos desde las células gliales, que a su vez activan las rutas de supervivencia e incrementan la síntesis de proteínas y la proliferación en las neuronas (Terenghi, 1999). Tras la axotomía, la regeneración axonal y la de las células de Schwann desde el cabo proximal progresan normalmente a una velocidad similar (Jessen y Mirsky, 1998). Esto se demuestra por la similar distancia de la regeneración axonal y de las células de Schwann que hemos encontrado. En los implantes con NRG de 15 días de supervivencia, los axones habían colonizado 5.83 mm de longitud del conducto mientras que en los no suplementados tan sólo fue de 4.24 mm. Estas distancias son coincidentes con la distancia recorrida por las células de Schwann.

En el cabo distal seccionado, la supervivencia de las células de Schwann no depende de la NRG1 proporcionada por los axones. Después de la axotomía una pequeña cantidad de NRG1 puede ser producida por las propias células de Schwann, creando un sistema de regulación autocrino (Carroll *et al.*, 1997; Hayworth *et al.*, 2006). Debido a que las células de Schwann son imprescindibles para la regeneración axonal, se ha propuesto que su supervivencia ha de ser independiente de la de los axones (Syroid *et al.*, 1999). Tras la lesión aumenta rápidamente la expresión de los receptores erbB2 y erbB3 en la superficie de las células de Schwann (Li *et al.*, 1997; Bryan *et al.*, 2000). La NRG1 producida por las células de Schwann y la liberada desde el alginato hacia la luz del conducto de los grupos suplementados, podría actuar sobre estos receptores resultando en la activación de la proliferación y migración de las células de Schwann. La isoforma β de la NRG1 es capaz de unirse a su receptor ErbB2/ErbB3 en la superficie de la célula de Schwann y traslocarse hasta el núcleo (Raabe *et al.*, 2004), lo que iniciaría la transcripción de genes relacionados con la proliferación y la migración. Este fenómeno se ha observado con otros factores de crecimiento neural como el FGF, o similares en estructura a la NRG1 como el EGF (Arese *et al.*, 1999; Klingenberg *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001). De esta manera, se activaría la liberación de factores neurotróficos desde las células de Schwann (Mahanthappa *et al.*, 1996).

Como resultado de la continua formación de un armazón de células de Schwann en el interior del tubo, se originan caminos de guía a lo largo de los cuales los axones pueden elongarse y aumentar su número en el cabo distal. Estas estructuras se forman por la asociación de 4 a 6 células de Schwann. La cantidad de moléculas de adhesión celular como NCAM, L1 y laminina que se expresan en la superficie de las células de Schwann es también importante para la regeneración (Martini, 1994). Estas moléculas intervienen en la interacción de las células de Schwann con las moléculas presentes en el cono de crecimiento del axón (Jessen y Richardson, 1996). De esta manera, es imaginable que este contacto de guía y el efecto de la NRG1 aumentando las funciones neurotróficas de las células de Schwann, estimulen la regeneración axonal.

La cantidad de células de Schwann regeneradas era notablemente mayor en los implantes con NRG1 cuando se comparaban con los individuos no tratados. La adición de NRG1 también aumentó paralelamente la cantidad de axones regenerados. Aunque la adición de NRG1 produjo el incremento más importante en la cantidad de células de Schwann y de axones en regeneración a los 15 días se pudieron observar los efectos hasta los 75 días como se demostró por la presencia de estructuras mielinizadas estables (ratio $G = 0.68$) en el interior del conducto.

7.2. Parámetros biológicos de la regeneración

En algunos estudios se ha observado que las neuritas no sólo son capaces de crecer sobre una membrana basal, sino que también lo pueden hacer directamente sobre la superficie de células de Schwann vivas (Barton, 1962; Kuffler, 1986; Nathaniel y Pease, 1963; Scherer y Easter, 1984; Schwab y Thoenen, 1985).

Cuando se insertan implantes acelulares de tejido nervioso central o periférico en secciones de nervio periférico, las células de Schwann vivas del receptor migran dentro del implante (Anderson y Turmaine, 1986; Ide et al., 1983). Cuando los axones crecen en tubos vacíos sin lámina basal, tienden a hacer contacto con la superficie de células vivas, como células de Schwann u otros axones (Ide et al., 1983; Schwab y Thoenen, 1985).

En nuestras muestras de microscopía electrónica de transmisión hemos observado mayoritariamente que las neuritas crecen sobre las láminas basales producidas por las células de Schwann, si bien, en alguna ocasión hemos caracterizado varios procesos axonales de pequeño calibre creciendo directamente sobre la superficie de una célula de Schwann o en contacto directo con otros axones (ver figura 41). El espacio intercelular tiende a ser ocupado por matriz extracelular en forma de capas superpuestas de fibras de colágeno, desplazando rápidamente al alginato. Las células de Schwann sintetizan matriz extracelular sólo tras el contacto con la neurona (Bunge *et al.*, 1986). En ningún caso hemos observado procesos axonales creciendo directamente sobre el alginato.

7.2.1. La célula de Schwann

Las funciones de las células de Schwann en el nervio periférico son muy variadas y difieren de las que presentan sus homólogos en el sistema nervioso central, los oligodendrocitos. Inmediatamente después de la lesión, las células de Schwann pueden actuar como células inflamatorias locales, produciendo citoquinas, sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS; una enzima con propiedades inflamatorias que genera óxido nítrico) y otras moléculas inflamatorias, antes de que los macrófagos sanguíneos invadan el nervio y asuman esta función. Las células de Schwann pueden transformarse de un fenotipo “estable”, mielínico, a células muy plásticas, proliferativas y migratorias que pueden dirigir la adecuada regeneración de los axones tras la lesión. Producen una gran multitud de moléculas tróficas para el nervio pero no necesariamente simultáneamente. En otras palabras, las células de Schwann parecen tener un sentido del ritmo y la coordinación de los productos que sintetizan. Aunque el mecanismo exacto no está claro, hay evidencias de que las células de Schwann evalúan su medio ambiente local y responden en consecuencia (Zochodne, 2008). Además, hay una íntima comunicación bidireccional entre el axón y la célula de Schwann. La molécula mediante la que se comunican es la NRG1. Esta comunicación es crucial durante la regeneración pero también está presente en los troncos nerviosos sanos (Fricker y Bennett, 2011).

Las células de Schwann se identifican por la expresión de la proteína ligante de Calcio S100 (Spreca *et al.*, 1989; Bianchi *et al.*, 1994b), característica de otros tipos de células gliales (astrocitos, células de Müller, etc.). Una subpoblación de células de Schwann - las no mielinizantes- expresa el receptor de baja afinidad de neurotrofinas p75^{NTR}. Este marcador también se encuentra, en ocasiones, en algunos fibroblastos perineurales. También puede localizarse en la superficie de axones en crecimiento (Yla-Kotola *et al.*, 2008). Se distinguió entre axones en crecimiento y células de Schwann p75^{NTR+} por la presencia de tinción nuclear con DAPI en éstas últimas. Se diferenciaron las células de Schwann inmaduras de los fibroblastos perineurales por las características morfológicas y la localización de ambas estructuras.

7.2. Parámetros biológicos de la regeneración

Las células de Schwann asociadas a axones mielinizados no expresan factor de crecimiento nervioso (NGF). Si pierden el contacto con el axón, comienzan a expresar el receptor de NGF de baja afinidad p75 en sus superficies, y producen NGF (Taniuchi *et al.*, 1988). Cuando tiene lugar la regeneración y el contacto con el axón se ha restablecido, las células de Schwann dejan de producir NGF y el receptor p75 de baja afinidad de NGF (Taniuchi *et al.*, 1988; Bradley *et al.*, 1998). Estas referencias coinciden con los datos observados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, sin embargo, hemos podido comprobar que en los injertos suplementados con NRG1 la expresión de p75^{NTR} es detectable en células de Schwann y células perineurales hasta la cota de los 75 días. La estimulación con NRG1 de las células de Schwann durante las primeras etapas de la regeneración parece favorecer la presencia de p75^{NTR} en su superficie durante largos periodos de tiempo. De esta manera, las células de Schwann mantendrían su capacidad para acumular NGF en su superficie, multiplicando así su disponibilidad para nuevos axones en regeneración. Estos elementos p75^{NTR+} se observan en regiones colonizadas por células de Schwann con fuerte expresión de proteína S100 (ver figura 42). Muchas de las CS presentes en el extremo distal del injerto tratado con NRG1 después de 75 días, presentan ambos marcadores. En estas preparaciones, las células de Schwann están involucradas activamente en la mielinización de los axones (expresando moléculas propias de CS mielinizantes maduras, como MBP, S100 o la proteína P0) y, paralelamente, acumulan neurotrofinas en su superficie para estimular la asociación de nuevos axones.

La presencia de receptores de neurotrofinas en el nervio periférico seccionado es un requisito previo para la respuesta mediada por neurotrofinas. La presencia de ARNm de p75^{NTR} y de inmunorreactividad para esta proteína aumentan en el extremo distal de la lesión. Después del contacto axonal durante la regeneración, la expresión de p75^{NTR} en las células de Schwann es reducida a los niveles observados en el nervio sano (Taniuchi *et al.*, 1988; Funakoshi *et al.*, 1993). La inducción de expresión de p75^{NTR} después de la axotomía se ha propuesto como mecanismo de concentración de NGF en la superficie de las células de Schwann, anclando el ligando y estimulando la regeneración nerviosa (Taniuchi *et al.*, 1988). Este supuesto se puede ampliar a todas las neurotrofinas, ya que todas ellas se unen al p75^{NTR} con afinidad similar y son expresadas en el cabo distal después de la neurectomía. Es interesante que los niveles de ARNm de *trkB* que codifican para formas truncadas del receptor TrkB, están reducidos en las células de Schwann del cabo distal. Esto contrasta con el incremento notable de p75^{NTR} (Funakoshi *et al.*, 1993),

7. Discusión

indicando que estos dos receptores tienen regulaciones opuestas en el cabo distal del nervio lesionado. Los bajos niveles de receptor TrkB pueden favorecer la unión de BDNF y de NT-4 a la gran cantidad de receptores p75^{NTR} presentes. Estos ligandos serán después presentados a los receptores TrkB funcionales presentes en la superficie de los axones en regeneración (Funakoshi *et al.*, 1993).

Las proteínas S100 participan en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular (Baimbridge *et al.*, 1992; Barger y Van Eldik, 1992; Heizmann, 2002), aunque en las neuronas actúan como proteínas activadoras y no como tamponadoras de Ca²⁺ (Schafer y Heizmann, 1996). Además, la S100β tiene actividad neurotrófica y estimula la elongación de las neuritas y la supervivencia de las neuronas (Winningham-Major *et al.*, 1989; Marshak, 1990; Van Eldik *et al.*, 1991; Bhattacharyya *et al.*, 1992; Huttunen *et al.*, 2000). La S100β también participa en otras funciones tales como la inhibición de la fosforilación o la inducción de la apoptosis (Fano *et al.*, 1995; Donato, 1999; 2003) y en la regulación de la estabilidad del citoesqueleto (Bianchi *et al.*, 1994a; Bianchi *et al.*, 1994b; Garbuglia *et al.*, 2000; Sorci *et al.*, 2000). Si embargo, las funciones de las proteínas S100 *in vivo* no son muy conocidas, y no se han observado cambios en el sistema nervioso periférico de animales transgénicos para las proteínas S100 (Gerlai y Roder, 1995; Roder *et al.*, 1996).

La proteína S100 se encuentra principalmente en glía y células relacionadas con la glía, pero también en una pequeña subpoblación de neuronas periféricas. Además, a nivel de ARNm o de proteína, algunos miembros de la superfamilia de la S100 están presentes en varios tejidos humanos normales y neoplásicos, especialmente de origen epitelial (Gibbs *et al.*, 1995; Ilg *et al.*, 1996; Takenaga *et al.*, 1997; Zimmer *et al.*, 1997; Barraclough, 1998; Gribenko *et al.*, 2001; Levett *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002).

Tanto las células de Schwann maduras mielinizantes como las no mielinizantes muestran una fuerte inmunoreactividad a la proteína S100 (Stefansson *et al.*, 1982b; Sugimura *et al.*, 1989; Vega *et al.*, 1996). Perez y Moore (1968) observaron un descenso en la concentración de proteína durante la degeneración axonal. El axón podría ejercer algún control sobre la expresión de la S100 en las células de Schwann (Stefansson *et al.*, 1982a). Este mismo fenómeno lo hemos observado tras la sección del nervio. Hemos observado que es más acentuado en los casos en los que hemos tratado el conducto con NRG1. La explicación de este acentuamiento podría ser que la NRG1 presente en el medio mantiene a las células de Schwann en un fenotipo muy cercano al de célula de la

7.2. Parámetros biológicos de la regeneración

Schwann inmadura, cuya expresión de proteína S100 es significativamente menor. En el ser humano se ha demostrado que la compresión de un nervio o su sección modifica la expresión de la proteína S100 en los corpúsculos de Meissner. La inmunorreactividad persiste tan sólo a niveles residuales (Marquez *et al.*, 1997; Albuérne *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 1998). Asimismo, la ausencia de proteína S100 en tumores malignos de la envuelta del nervio periférico está relacionada con la desdiferenciación de las células de Schwann (Perry *et al.*, 2001).

La expresión de la proteína S100 en las células de Schwann y en los corpúsculos sensoriales está regulada por el contacto entre las células de Schwann y el axón (Perez y Moore, 1968; Spreca *et al.*, 1989; De Leon *et al.*, 1991; Del Valle *et al.*, 1993). Nosotros pensamos que a medida que la relación entre el axón y la célula de Schwann se estabiliza, la expresión de proteína S100 se ve aumentada hasta los niveles normales de una célula de Schwann madura. Este hecho coincide con las células de Schwann S100⁺ encontradas en secciones seriadas correspondientes a áreas en las que hemos observado axones mielinizados. Además, en los animales a los que se les implantaron prótesis suplementadas con NRG1, el aumento de expresión de S100 no implica una desaparición total de las células p75^{NTR+}; en estos animales encontramos una etapa en la asociación célula de Schwann – axón en la que coexisten ambos marcadores.

8. Conclusiones

1. Una prótesis de PLGA con doble envoltura exterior y un andamiaje interno compuesta por dos láminas perpendiculares es adecuada para posibilitar la regeneración nerviosa en una neurectomía de 30 mm, sin la necesidad de añadir elementos celulares exógenos.
2. El alginato de sodio es un biomaterial adecuado para inmovilizar moléculas bioactivas, como la NRG1, y liberarlas gradualmente, aunque sus características no favorecen la adhesión y avance de las CS y de los axones.
3. La velocidad de la regeneración a través de la prótesis acelulares con NRG1 es suficiente para la correcta mielinización de las fibras nerviosas durante la reparación de lesiones de 30 mm.
4. La NRG1 es un factor de crecimiento eficaz para ejercer un fuerte efecto sobre la proliferación y la migración de las células de Schwann en los primeros días de la reparación con una prótesis bioabsorbible acelular. Además, tiene un efecto a largo plazo sobre las células de Schwann favoreciendo su plasticidad.
5. El fenotipo de las células de Schwann está determinado por el modo de asociación al axón y por la exposición a NRG1. De esta manera, en las zonas de lesión reciente se reduce la expresión de S100 en las CS, mientras que aumenta la de p75^{NTR} y las capacidades de proliferación y migración. Cuando la asociación entre un axón y una célula de Schwann se vuelve estable y se da la mielinización, se recupera la expresión de S100 y disminuye p75^{NTR}. La exposición a NRG1 provoca que la presencia de p75^{NTR} sea abundante en células de Schwann, 75 días después del implante. Estos elementos se observan en regiones colonizadas por células de Schwann con fuerte expresión de proteína S100.

9. *Bibliografía*

- Abe Y, Doi K, Katoh Y, Yamamoto H, Kataoka H y Kawai S (1996). The limit of low speed peripheral nerve elongation; neurological and circulatory aspects. *J Neurol Sci* 140(1-2): 61-66.
- Adlkofer K y Lai C (2000). Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* 29(2): 104-111.
- Aguayo AJ, David S y Bray GM (1981). Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95: 231-240.
- Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R y Jayakumar R (2005). Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst* 10(1): 17-30.
- Albert E (1885). Einige operationen an Nerven. 26: 1285.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2007). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Albuerne M, Lopez S, Naves FJ, Martinez-Almagro A, Represa J y Vega JA (1998). S100alpha and S100beta proteins in human cutaneous sensory corpuscles: effects of nerve and spinal cord injury. *Anat Rec* 251(3): 351-359.
- Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S y Hoffman RM (2005). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49): 17734-17738.
- Amsden B y Turner N (1999). Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnol Bioeng* 65(5): 605-610.
- Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B y Rifkin DB (1999). Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell* 10(5): 1429-1444.
- Arvidsson J, Ygge J y Grant G (1986). Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res* 373(1-2): 15-21.
- Asai T, Watanabe K, Ichihara-Tanaka K, Kaneda N, Kojima S, Iguchi A, Inagaki F y Muramatsu T (1997). Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 66-70.
- Atanasoski S, Scherer SS, Sirkowski E, Leone D, Garratt AN, Birchmeier C y Suter U (2006). ErbB2 signaling in Schwann cells is mostly dispensable for maintenance of myelinated peripheral nerves and proliferation of adult Schwann cells after injury. *J Neurosci* 26(7): 2124-2131.
- Audisio C, Nicolino S, Scevola A, Tos P, Geuna S, Battiston B y Perroteau I (2008). ErbB receptors modulation in different types of peripheral nerve regeneration. *Neuroreport* 19(16): 1605-1609.
- Augst AD, Kong HJ y Mooney DJ (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 6(8): 623-633.
- Baek SY y Kim SU (1998). Proliferation of human Schwann cells induced by neu differentiation factor isoforms. *Dev Neurosci* 20(6): 512-517.

9. Bibliografía

- Baimbridge KG, Celio MR y Rogers JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15(8): 303-308.
- Bampton ET y Taylor JS (2005). Effects of Schwann cell secreted factors on PC12 cell neuritogenesis and survival. *J Neurobiol* 63(1): 29-48.
- Bao J, Wolpowitz D, Role LW y Talmage DA (2003). Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161(6): 1133-1141.
- Barger SW y Van Eldik LJ (1992). S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem* 267(14): 9689-9694.
- Barracough R (1998). Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 190-199.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR y Coleman MP (2005). The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci* 6(1): 6.
- Beirowski B, Berek L, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR y Coleman MP (2004). Quantitative and qualitative analysis of Wallerian degeneration using restricted axonal labelling in YFP-H mice. *J Neurosci Methods* 134(1): 23-35.
- Bellamkonda RV (2006). Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials* 27(19): 3515-3518.
- Berger A, Hierner R y Walter GF (2007). The allogenic nerve graft. *Acta Neurochir Suppl* 100: 39-41.
- Berthold CH, Fraher JP, King RHM y Rydmark M (2005). Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In *Peripheral Neuropathy*. Dyck PJ y Thomas PK. Philadelphia, Elsevier Saunders 35-91.
- Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R y Ratner N (1992). S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol* 23(4): 451-466.
- Bianchi R, Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I y Donato R (1994a). Calpactin I binds to the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and cosediments with glial filaments in a Ca(2+)-dependent manner: implications for concerted regulatory effects of calpactin I and S100 protein on glial filaments. *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 361-367.
- Bianchi R, Verzini M, Garbuglia M, Giambanco I y Donato R (1994b). Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization. *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 354-360.
- Bouhadir KH, Alsberg E y Mooney DJ (2001). Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials* 22(19): 2625-2633.
- Bovolenta P y Feraud-Espinosa I (2000). Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* 61(2): 113-132.
- Bowe CM, Evans NH y Vlachy V (1992). Progressive morphological abnormalities observed in rat spinal motor neurons at extended intervals after axonal regeneration. *J Comp Neurol* 321(4): 576-590.
- Boyd JG y Gordon T (2001). The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *J Neurobiol* 49(4): 314-325.
- Boyd JG y Gordon T (2002). A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 15(4): 613-626.

- Boyd JG y Gordon T (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol* 183(2): 610-619.
- Boyles JK, Notterpek LM y Anderson LJ (1990). Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 265(29): 17805-17815.
- Bradley JL, Abernethy DA, King RH, Muddle JR y Thomas PK (1998). Neural architecture in transected rabbit sciatic nerve after prolonged nonreinnervation. *J Anat* 192 (Pt 4): 529-538.
- Braga-Silva J (1999). The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg Br* 24(6): 703-706.
- Britsch S (2007). The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190: 1-65.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C y Wegner M (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15(1): 66-78.
- Bronner-Fraser M (1993). Neural development: crest destiny. *Curr Biol* 3(4): 201-203.
- Brown RE, Erdmann D, Lyons SF y Suchy H (1996). The use of cultured Schwann cells in nerve repair in a rabbit hind-limb model. *J Reconstr Microsurg* 12(3): 149-152.
- Bruck W (1997). The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7(2): 741-752.
- Bruck W, Bruck Y, Maruschak B y Friede RL (1995). Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 89(4): 363-367.
- Brunelli GA, Vigasio A y Brunelli GR (1994). Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 15(3): 176-178.
- Brushart TM (1993). Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* 13(6): 2730-2738.
- Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG y Royall RM (1998). Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci* 18(21): 8674-8681.
- Buckmaster EA, Perry VH y Brown MC (1995). The rate of Wallerian degeneration in cultured neurons from wild type and C57BL/WldS mice depends on time in culture and may be extended in the presence of elevated K⁺ levels. *Eur J Neurosci* 7(7): 1596-1602.
- Bunge MB, Wood PM, Tynan LB, Bates ML y Sanes JR (1989). Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243(4888): 229-231.
- Bunge RP (1987). Tissue culture observations relevant to the study of axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve development and repair. *J Exp Biol* 132: 21-34.
- Bunge RP, Bunge MB y Eldridge CF (1986). Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells. *Annu Rev Neurosci* 9: 305-328.
- Butí M, Verdú E, Labrador RO, Vilches JJ, Fores J y Navarro X (1996). Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp Neurol* 137(1): 26-33.
- Cajal S (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford, Oxford University Press.
- Carey DJ, Eldridge CF, Cornbrooks CJ, Timpl R y Bunge RP (1983). Biosynthesis of type IV collagen by cultured rat Schwann cells. *J Cell Biol* 97(2): 473-479.

9. Bibliografía

- Carpenter EM y Hollyday M (1992). The distribution of neural crest-derived Schwann cells from subsets of brachial spinal segments into the peripheral nerves innervating the chick forelimb. *Dev Biol* 150(1): 160-170.
- Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS y Corbett JA (1997). Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17(5): 1642-1659.
- Chalfoun CT, Wirth GA y Evans GR (2006). Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J Cell Mol Med* 10(2): 309-317.
- Chandross KJ (1998). Nerve injury and inflammatory cytokines modulate gap junctions in the peripheral nervous system. *Glia* 24(1): 21-31.
- Chen MH, Chen PR, Hsieh ST, Huang JS y Lin FH (2006). An in vivo study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 77(1): 89-97.
- Chen YY, McDonald D, Cheng C, Magnowski B, Durand J y Zochodne DW (2005). Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(7): 613-622.
- Cheng C y Zochodne DW (2002). In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience* 115(1): 321-329.
- Cheng L, Esch FS, Marchionni MA y Mudge AW (1998). Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol Cell Neurosci* 12(3): 141-156.
- Chernousov MA y Carey DJ (2000). Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol* 15(2): 593-601.
- Chernousov MA, Stahl RC y Carey DJ (1998). Schwann cells use a novel collagen-dependent mechanism for fibronectin fibril assembly. *J Cell Sci* 111 (Pt 18): 2763-2777.
- Chernousov MA, Yu WM, Chen ZL, Carey DJ y Strickland S (2008). Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* 56(14): 1498-1507.
- Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH y Jung JH (2005). Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34(5): 537-542.
- Citri A, Skaria KB y Yarden Y (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284(1): 54-65.
- Colognato H, Winkelmann DA y Yurchenco PD (1999). Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* 145(3): 619-631.
- Colognato H y Yurchenco PD (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218(2): 213-234.
- Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N y Peles E (2004). Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci* 24(42): 9250-9260.
- Court FA, Wrabetz L y Feltri ML (2006). Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol* 16(5): 501-507.
- Csaba N, Koping-Hoggard M y Alonso MJ (2009). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *Int J Pharm* 382(1-2): 205-214.

- Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, Diaz-Gonzalez D y Reimers D (2002). Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 24(7): 634-638.
- Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, Yan M y Dujovny M (2004). Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res* 26(2): 230-232.
- Custer AW, Kazarinova-Noyes K, Sakurai T, Xu X, Simon W, Grumet M y Shrager P (2003). The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. *J Neurosci* 23(31): 10032-10039.
- David S y Aguayo AJ (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214(4523): 931-933.
- de la Fuente I, Alcalde I, Gamboa OL, Garrosa M y Gayoso MJ (2012). A method for obtaining Schwann cell cultures from adult rabbit nerve based on "in vitro" pre-degeneration and neuregulin treatment. *Histol Histopathol* 27(1): 95-102.
- De Leon M, Van Eldik LJ y Shooter EM (1991). Differential regulation of S100 beta and mRNAs coding for S100-like proteins (42A and 42C) during development and after lesion of rat sciatic nerve. *J Neurosci Res* 29(2): 155-162.
- Deckwerth TL y Johnson EM, Jr. (1994). Neurites can remain viable after destruction of the neuronal soma by programmed cell death (apoptosis). *Dev Biol* 165(1): 63-72.
- Del Valle ME, Cabal A, Alvarez-Mendez JC, Calzada B, Haro JJ, Collier W y Vega JA (1993). Effect of denervation on lamellar cells of Meissner-like sensory corpuscles of the rat. An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 39(7): 801-807.
- Delgado JM, Ferrús A, Mora F y Mora FJ (1998). Manual de Neurociencia. Madrid, Ed. Síntesis.
- Dellon AL y Mackinnon SE (1988). Basic scientific and clinical applications of peripheral nerve regeneration. *Surg Annu* 20: 59-100.
- Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J y Brook GA (2010). Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol* 92(3): 245-276.
- Dezawa M (2002). Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anatomical Science International* 77(1): 12-25.
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M y Sawada H (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 14(11): 1771-1776.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM y Wiegand SJ (1992). The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8(5): 983-993.
- Donato R (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450(3): 191-231.
- Donato R (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60(6): 540-551.
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R y Jessen KR (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15(3): 585-596.
- Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R y Jessen KR (1999). Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res* 56(4): 334-348.

9. Bibliografía

- Donnerer J (2003). Regeneration of primary sensory neurons. *Pharmacology* 67(4): 169-181.
- Dubovy P y Svizenska I (1992). Migration of Schwann cells from the distal stump of the sciatic nerve 1 week after transection: the effects of insulin and cytosine arabinoside. *Glia* 6(4): 281-288.
- Dubovy P y Svizenska I (1994). Denervated skeletal muscle stimulates migration of Schwann cells from the distal stump of transected peripheral nerve: an in vivo study. *Glia* 12(2): 99-107.
- Dubovy P, Svizenska I, Klusakova I, Zitkova A, Houst'ava L y Haninec P (2001). Laminin molecules in freeze-treated nerve segments are associated with migrating Schwann cells that display the corresponding alpha6beta1 integrin receptor. *Glia* 33(1): 36-44.
- Eccleston PA, Jessen KR y Mirsky R (1987a). Control of peripheral glial cell proliferation: a comparison of the division rates of enteric glia and Schwann cells and their response to mitogens. *Dev Biol* 124(2): 409-417.
- Eccleston PA, Jessen KR y Mirsky R (1989). Transforming growth factor-beta and gamma-interferon have dual effects on growth of peripheral glia. *J Neurosci Res* 24(4): 524-530.
- Eccleston PA, Mirsky R, Jessen KR, Sommer I y Schachner M (1987b). Postnatal development of rat peripheral nerves: an immunohistochemical study of membrane lipids common to non-myelin forming Schwann cells, myelin forming Schwann cells and oligodendrocytes. *Brain Res* 432(2): 249-256.
- Edbladh M, Fex-Svenningsen A, Ekstrom PA y Edstrom A (1994). Insulin and IGF-II, but not IGF-I, stimulate the in vitro regeneration of adult frog sciatic sensory axons. *Brain Res* 641(1): 76-82.
- Edwards JA (1968). The external development of the rabbit and rat embryo. *Advances in teratology*. New York, American Press.
- Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB y Salzer JL (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J Cell Biol* 129(2): 443-458.
- Elgazzar RF, Abdulmajeed I y Mutabbakani M (2007). Cyanoacrylate glue versus suture in peripheral nerve reanastomosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104(4): 465-472.
- Erickson AC y Couchman JR (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 48(10): 1291-1306.
- Evans GR (2003). Approaches to tissue engineered peripheral nerve. *Clin Plast Surg* 30(4): 559-563, viii.
- Evans PJ, MacKinnon SE, Midha R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y y Hare GM (1999). Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery* 19(3): 115-127.
- Faham S, Linhardt RJ y Rees DC (1998). Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8(5): 578-586.
- Fajardo-Ochoa R, Osuna-Castro JA, Velazquez-Mendoza CV, Escalante-Minakata P y Ibarra-Junquera V (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Acta Química Mexicana* 3(6): 42-56.
- Falls DL (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284(1): 14-30.
- Fan X y Gelman BB (1992). Schwann cell nerve growth factor receptor expression during initiation of remyelination. *J Neurosci Res* 31(1): 58-67.
- Fano G, Biocca S, Fulle S, Mariggio MA, Belia S y Calissano P (1995). The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol* 46(1): 71-82.

- Fansa H, Dodic T, Wolf G, Schneider W y Keilhoff G (2003). Tissue engineering of peripheral nerves: Epineurial grafts with application of cultured Schwann cells. *Microsurgery* 23(1): 72-77.
- Fansa H, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G y Schneider W (2000). Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve* 23(8): 1227-1233.
- Fansa H, Schneider W, Wolf G y Keilhoff G (2002). Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle Nerve* 26(1): 87-93.
- Fawcett JW y Keynes RJ (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13: 43-60.
- Fernandez-Valle C, Bunge RP y Bunge MB (1995). Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 24(9): 667-679.
- Ferri CC y Bisby MA (1999). Improved survival of injured sciatic nerve Schwann cells in mice lacking the p75 receptor. *Neurosci Lett* 272(3): 191-194.
- Fields RD y Ellisman MH (1986). Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. *Exp Neurol* 92(1): 48-60.
- Fine EG, Valentini RF y Aebischer P (2000). Nerve regeneration. In Principles of Tissue Engineering. Lanza RP, Langer R y Vacanti J. San Diego, Academic Press 383 - 397.
- Fornaro M, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG y Battiston B (2001). Confocal imaging of Schwann-cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat. *Microsurgery* 21(4): 153-155.
- Frerichs O, Fansa H, Schicht C, Wolf G, Schneider W y Keilhoff G (2002). Reconstruction of peripheral nerves using acellular nerve grafts with implanted cultured Schwann cells. *Microsurgery* 22(7): 311-315.
- Fricker FR y Bennett DL (2011). The role of neuregulin-1 in the response to nerve injury. *Future Neurol* 6(6): 809-822.
- Frizell M y Sjostrand J (1974). The axonal transport of (3H)ucose labelled glycoproteins in normal and regenerating peripheral nerves. *Brain Res* 78(1): 109-123.
- Fu AK, Fu WY, Cheung J, Tsim KW, Ip FC, Wang JH y Ip NY (2001). Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nat Neurosci* 4(4): 374-381.
- Fu SY y Gordon T (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14(1-2): 67-116.
- Fujimoto E, Mizoguchi A, Hanada K, Yajima M y Ide C (1997). Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol* 26(8): 511-528.
- Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM y Persson H (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 123(2): 455-465.
- Ganfornina MD, Do Carmo S, Martinez E, Tolia J, Navarro A, Rassart E y Sanchez D (2010). ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia* 58(11): 1320-1334.
- Garbuglia M, Verzini M, Hofmann A, Huber R y Donato R (2000). S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochim Biophys Acta* 1498(2-3): 192-206.

9. Bibliografía

- Garratt AN, Britsch S y Birchmeier C (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22(11): 987-996.
- Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A y Faissner A (1999). DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J Neurosci* 19(10): 3888-3899.
- George A, Kleinschnitz C, Zelenka M, Brinkhoff J, Stoll G y Sommer C (2004). Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 188(1): 187-191.
- George EB, Glass JD y Griffin JW (1995). Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* 15(10): 6445-6452.
- Gerlai R y Roder J (1995). Abnormal exploratory behavior in transgenic mice carrying multiple copies of the human gene for S100 beta. *J Psychiatry Neurosci* 20(2): 105-112.
- Gershon MD, Chalazonitis A y Rothman TP (1993). From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J Neurobiol* 24(2): 199-214.
- Geuna S, Raimondo S, Nicolino S, Boux E, Fornaro M, Tos P, Battiston B y Perroteau I (2003). Schwann-cell proliferation in muscle-vein combined conduits for bridging rat sciatic nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 19(2): 119-123; discussion 124.
- Gibbs FE, Barraclough R, Platt-Higgins A, Rudland PS, Wilkinson MC y Parry EW (1995). Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J Histochem Cytochem* 43(2): 169-180.
- Glazner GW, Lupien S, Miller JA y Ishii DN (1993). Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience* 54(3): 791-797.
- Goodman SL, Sims PA y Albrecht RM (1996). Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials* 17(21): 2087-2095.
- Gordon T, Sulaiman O y Boyd JG (2003). Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8(4): 236-250.
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L y Neufeld G (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8(2): 95-114.
- Gribenko AV, Hopper JE y Makhatadze GI (2001). Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry* 40(51): 15538-15548.
- Griffin CG y Letourneau PC (1980). Rapid retraction of neurites by sensory neurons in response to increased concentrations of nerve growth factor. *J Cell Biol* 86(1): 156-161.
- Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M y Scherer SS (1996). Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* 16(19): 6107-6118.
- Groves MJ, Christopherson T, Giometto B y Scaravilli F (1997). Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *J Neurocytol* 26(9): 615-624.
- Groves MJ, Schanzer A, Simpson AJ, An SF, Kuo LT y Scaravilli F (2003). Profile of adult rat sensory neuron loss, apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J Neurocytol* 32(2): 113-122.
- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA y Kim HA (2005). Microanatomy of axon/glial signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 25(13): 3478-3487.

- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF y Angelov DN (2005). Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci* 21(2): 391-402.
- Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E y Stennert E (1996). Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 286(3): 537-541.
- Haase J, Bjerre P y Simesen K (1980). Median and ulnar nerve transections treated with microsurgical interfascicular cable grafting with autogenous sural nerve. *J Neurosurg* 53(1): 73-84.
- Hadlock T, Elisseeff J, Langer R, Vacanti J y Cheney M (1998). A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124(10): 1081-1086.
- Hall SM, Li H y Kent AP (1997). Schwann cells responding to primary demyelination in vivo express p75NTR and c-erbB receptors: a light and electron immunohistochemical study. *J Neurocytol* 26(10): 679-690.
- Hara Y, Tsujino A, Abe I, Ichimura H y Ochiai N (2004). Pre-degenerated nerve shows enhanced regeneration after incremental elongation in rats. *J Orthop Res* 22(1): 189-193.
- Harkonen MH y Kauffman FC (1974). Metabolic alterations in the axotomized superior cervical ganglion of the rat. II. The pentose phosphate pathway. *Brain Res* 65(1): 141-157.
- Harris D (1980). Microsurgical methods in peripheral nerve repair. *J R Soc Med* 73(1): 48-53.
- Hartmann U y Maurer P (2001). Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* 20(1): 23-35.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y y Ide C (2002). Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Exp Brain Res* 146(3): 356-368.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Suzuki K, Nakashima T, Tanihara M y Ide C (2005). Review: peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. *J Mater Sci Mater Med* 16(6): 503-509.
- Haynes LW (1988). Fibroblast (heparin-binding) growing factors in neuronal development and repair. *Mol Neurobiol* 2(4): 263-289.
- Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M y Thompson WJ (2006). Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26(25): 6873-6884.
- Heath CA y Rutkowski GE (1998). The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol* 16(4): 163-168.
- Heizmann CW (2002). The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* 172: 69-80.
- Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, Rullamas J, Evans T, McMahon SB, Armanini MP y et al. (1993). Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363(6426): 266-270.
- Henry MD y Campbell KP (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95(6): 859-870.
- Hirata H, Hibasami H, Yoshida T, Ogawa M, Matsumoto M, Morita A y Uchida A (2001). Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 36(3): 245-258.

9. Bibliografía

- Hirata K y Kawabuchi M (2002). Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microscopy Research & Technique* 57(6): 541-547.
- Hoang TX, Akhavan M, Wu J y Havton LA (2008). Minocycline protects motor but not autonomic neurons after cauda equina injury. *Exp Brain Res* 189(1): 71-77.
- Hoffman PN y Lasek RJ (1980). Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain Res* 202(2): 317-333.
- Hoffman PN, Lasek RJ, Griffin JW y Price DL (1983). Slowing of the axonal transport of neurofilament proteins during development. *J Neurosci* 3(8): 1694-1700.
- Horie H, Fukuda N y Bando Y (1991). Hepatocytes enhance neurite regeneration and survival from transected nerve terminals. *Neuroreport* 2(9): 521-524.
- Hudson TW, Evans GR y Schmidt CE (2000). Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthop Clin North Am* 31(3): 485-498.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R y Rauvala H (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275(51): 40096-40105.
- Ide C (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25(2): 101-121.
- Ijkema-Paassen J, Meek MF y Gramsbergen A (2001). Transection of the sciatic nerve and reinnervation in adult rats: muscle and endplate morphology. *Equine Vet J Suppl*(33): 41-45.
- Ilg EC, Schafer BW y Heizmann CW (1996). Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 68(3): 325-332.
- Jaquet JB, Luijsterburg AJ, Kalmijn S, Kuypers PD, Hofman A y Hovius SE (2001). Median, ulnar, and combined median-ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. *J Trauma* 51(4): 687-692.
- Jenq CB, Jenq LL, Bear HM y Coggeshall RE (1988). Conditioning lesions of peripheral nerves change regenerated axon numbers. *Brain Res* 457(1): 63-69.
- Jessen KR (2004). Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(10): 1861-1867.
- Jessen KR y Mirsky R (1991). Schwann cell precursors and their development. *Glia* 4(2): 185-194.
- Jessen KR y Mirsky R (1992). Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 2(5): 575-581.
- Jessen KR y Mirsky R (1998). Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech* 41(5): 393-402.
- Jessen KR y Mirsky R (2002). Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200(4): 367-376.
- Jessen KR y Mirsky R (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6(9): 671-682.
- Jessen KR y Mirsky R (2008). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56(14): 1552-1565.
- Jessen KR, Mirsky R y Morgan L (1987). Axonal signals regulate the differentiation of non-myelin-forming Schwann cells: an immunohistochemical study of galactocerebroside in transected and regenerating nerves. *J Neurosci* 7(10): 3362-3369.

- Jessen KR, Morgan L, Brammer M y Mirsky R (1985). Galactocerebroside is expressed by non-myelin-forming Schwann cells in situ. *J Cell Biol* 101(3): 1135-1143.
- Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ y Mirsky R (1990). Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109(1): 91-103.
- Jimenez JC, Tyson DR, Dhar S, Nguyen T, Hamai Y, Bradshaw RA y Evans GR (2004). Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells): characterization and dose-response relationship for modulated release of nerve growth factor for nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 113(2): 605-610.
- Johnson EO, Zoubos AB y Soucacos PN (2005). Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury* 36 Suppl 4: S24-29.
- Jones JT, Akita RW y Sliwkowski MX (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447(2-3): 227-231.
- Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M y Lemmon V (1998). Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21: 97-125.
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TH (2000). Principles of Neural Science, McGraw-Hill.
- Kanje M, Skottner A, Sjoberg J y Lundborg G (1989). Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 486(2): 396-398.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV y Parada LF (1991a). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252(5005): 554-558.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D y Parada LF (1991b). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350(6314): 158-160.
- Karant S, Yang G, Yeh J y Richardson PM (2006). Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol* 202(1): 161-166.
- Keilhoff G, Fansa H y Wolf G (2003). Nitric oxide synthase, an essential factor in peripheral nerve regeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49(6): 885-897.
- Keilhoff G, Pratsch F, Wolf G y Fansa H (2005). Bridging extra large defects of peripheral nerves: possibilities and limitations of alternative biological grafts from acellular muscle and schwann cells. *Tissue Eng* 11(7-8): 1004-1014.
- Kelly BM, Gillespie CS, Sherman DL y Brophy PJ (1992). Schwann cells of the myelin-forming phenotype express neurofilament protein NF-M. *J Cell Biol* 118(2): 397-410.
- Kim BS, Yoo JJ y Atala A (2004). Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res* 68A(2): 201-209.
- Kimura A, Ajiki T, Takeuchi K, Hakamata Y, Murakami T, Hoshino Y y Kobayashi E (2005). Transmigration of donor cells involved in the sciatic nerve graft. *Transplant Proc* 37(1): 205-207.
- Kingham PJ y Terenghi G (2006). Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat* 209(4): 511-526.
- Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y y Endo K (1996). Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res* 740(1-2): 66-74.

9. Bibliografía

- Klingenberg O, Wiedocha A, Citores L y Olsnes S (2000). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for translocation of exogenous aFGF to the cytosol and nucleus. *J Biol Chem* 275(16): 11972-11980.
- Klöck G, Pfeffermann A, Ryser C, Grohn P, Kuttler B, Hahn HJ y Zimmermann U (1997). Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* 18(10): 707-713.
- Knight MA y Evans GR (2004). Tissue engineering: progress and challenges. *Plast Reconstr Surg* 114(2): 26E-37E.
- Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA y Price DL (1994). Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *J Comp Neurol* 342(1): 35-44.
- Krarup C, Archibald SJ y Madison RD (2002). Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol* 51(1): 69-81.
- Kuo LT, Groves MJ, Scaravilli F, Sugden D y An SF (2007). Neurotrophin-3 administration alters neurotrophin, neurotrophin receptor and nestin mRNA expression in rat dorsal root ganglia following axotomy. *Neuroscience* 147(2): 491-507.
- Kury P, Bosse F y Muller HW (2001). Transcription factors in nerve regeneration. *Prog Brain Res* 132: 569-585.
- Kvist AP, Latvanlehto A, Sund M, Eklund L, Vaisanen T, Hagg P, Sormunen R, Komulainen J, Fassler R y Pihlajaniemi T (2001). Lack of cytosolic and transmembrane domains of type XIII collagen results in progressive myopathy. *Am J Pathol* 159(4): 1581-1592.
- Kvist AP, Latvanlehto A, Sund M, Horelli-Kuitunen N, Rehn M, Palotie A, Beier D y Pihlajaniemi T (1999). Complete exon-intron organization and chromosomal location of the gene for mouse type XIII collagen (col13a1) and comparison with its human homologue. *Matrix Biol* 18(3): 261-274.
- Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD y Pomeroy SL (1997). Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci* 17(21): 8293-8299.
- Lai C (2005). Peripheral glia: Schwann cells in motion. *Curr Biol* 15(9): R332-334.
- Landegren T, Risling M, Persson JK y Sonden A (2010). Cyanoacrylate in nerve repair: transient cytotoxic effect. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39(7): 705-712.
- Langer R y Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110): 920-926.
- Lansdown AB y Payne MJ (1994). An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (Kaltostat) following subcutaneous implantation in the rat. *J R Coll Surg Edinb* 39(5): 284-288.
- Laquerriere A, Peulve P, Jin O, Tiollier J, Tardy M, Vaudry H, Hemet J y Tadie M (1994). Effect of basic fibroblast growth factor and alpha-melanocytic stimulating hormone on nerve regeneration through a collagen channel. *Microsurgery* 15(3): 203-210.
- Lariviere RC y Julien JP (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58(1): 131-148.
- Le Douarin N, Dulac C, Dupin E y Cameron-Curry P (1991). Glial cell lineages in the neural crest. *Glia* 4(2): 175-184.
- Lee M, Brennan A, Blanchard A, Zoidl G, Dong Z, Taberner A, Zoidl C, Dent MA, Jessen KR y Mirsky R (1997). P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol Cell Neurosci* 8(5): 336-350.

- Lee SK y Wolfe SW (2000). Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 8(4): 243-252.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H y Barde YA (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341(6238): 149-152.
- Lemke G (2006). Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006(325): pe11.
- Levett D, Flecknell PA, Rudland PS, Barraclough R, Neal DE, Mellon JK y Davies BR (2002). Transfection of S100A4 produces metastatic variants of an orthotopic model of bladder cancer. *Am J Pathol* 160(2): 693-700.
- Levi-Montalcini R, Meyer H y Hamburger V (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* 14(1): 49-57.
- Li FQ, Fowler KA, Neil JE, Colton CA y Vitek MP (2010). An apolipoprotein E-mimetic stimulates axonal regeneration and remyelination after peripheral nerve injury. *J Pharmacol Exp Ther* 334(1): 106-115.
- Li Y, Rao PK, Wen R, Song Y, Muir D, Wallace P, van Horne SJ, Tennekoon GI y Kadesch T (2004). Notch and Schwann cell transformation. *Oncogene* 23(5): 1146-1152.
- Li Y, Tennekoon GI, Birnbaum M, Marchionni MA y Rutkowski JL (2001). Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* 17(4): 761-767.
- Li YS, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM, Kodner CM, Milbrandt J y Deuel TF (1990). Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 250(4988): 1690-1694.
- Lieberman AR (1971). The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14: 49-124.
- Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S y Schlosshauer B (2006). Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials* 27(8): 1425-1436.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L y Hung MC (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3(9): 802-808.
- Longo FM, Skaper SD, Manthorpe M, Williams LR, Lundborg G y Varon S (1983). Temporal changes of neuronotrophic activities accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. *Exp Neurol* 81(3): 756-769.
- Lopez SM, Perez-Perez M, Marquez JM, Naves FJ, Represa J y Vega JA (1998). p75 and TrkA neurotrophin receptors in human skin after spinal cord and peripheral nerve injury, with special reference to sensory corpuscles. *Anat Rec* 251(3): 371-383.
- Loring JF y Erickson CA (1987). Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev Biol* 121(1): 220-236.
- Lowrie MB, Lavalette D y Davies CE (1994). Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev Neurosci* 16(5-6): 279-284.
- Lundborg G (1988). *Nerve Injury and Repair*. New York, Churchill Livingstone.
- Lundborg G (1993). Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment. *J Hand Ther* 6(3): 179-188.

9. Bibliografía

- Lundborg G (2000). A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]* 25(3): 391-414.
- Lundborg G (2004). Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36(1): 1-7.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC y Varon S (1982). Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol* 76(2): 361-375.
- Lunn ER, Scourfield J, Keynes RJ y Stern CD (1987). The neural tube origin of ventral root sheath cells in the chick embryo. *Development* 101(2): 247-254.
- Luo X, Prior M, He W, Hu X, Tang X, Shen W, Yadav S, Kiryu-Seo S, Miller R, Trapp BD y Yan R (2011). Cleavage of Neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 Protein Produces Differential Effects on Myelination. *J Biol Chem* 286(27): 23967-23974.
- Lupu R, Colomer R, Kannan B y Lippman ME (1992). Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2287-2291.
- Lutz BS (2004). The role of a barrier between two nerve fascicles in adjacency after transection and repair of a peripheral nerve trunk. *Neurol Res* 26(4): 363-370.
- Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH y Sidman RL (1985). Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 88(3): 767-772.
- Madison RD, da Silva C, Dikkes P, Sidman RL y Chiu TH (1987). Peripheral nerve regeneration with entubulation repair: comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 95(2): 378-390.
- Mahanthappa NK, Anton ES y Matthew WD (1996). Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 16(15): 4673-4683.
- Margolis RK y Margolis RU (1993). Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* 49(5): 429-446.
- Marquez J, Perez-Perez M, Naves FJ y Vega JA (1997). Effect of spinal cord and peripheral nerve injury on human cutaneous sensory corpuscles. An immunohistochemical study. *J Peripher Nerv Syst* 2(1): 49-59.
- Marshak DR (1990). S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 86: 169-181.
- Martin LJ, Kaiser A y Price AC (1999). Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* 40(2): 185-201.
- Martini R (1994). Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23(1): 1-28.
- Martinsen A, Skjak-Braek G y Smidsrod O (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 33(1): 79-89.
- Martinsen A, Storro I y Skjark-Braek G (1992). Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnol Bioeng* 39(2): 186-194.
- Marusich MF y Weston JA (1991). Development of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 1(2): 221-229.
- Masuda T y Shiga T (2005). Chemorepulsion and cell adhesion molecules in patterning initial trajectories of sensory axons. *Neurosci Res* 51(4): 337-347.

- Matloub HS y Yousif NJ (1992). Peripheral nerve anatomy and innervation pattern. *Hand Clin* 8(2): 201-214.
- McConnell MP, Dhar S, Naran S, Nguyen T, Bradshaw RA y Evans GR (2004). In vivo induction and delivery of nerve growth factor, using HEK-293 cells. *Tissue Eng* 10(9-10): 1492-1501.
- McConnell MP, Dhar S, Nguyen T, Naran S, Calvert JW, Sundine MJ, Bradshaw RA y Evans GR (2005). Nerve growth factor expression response to induction agent booster dosing in transfected human embryonic kidney cells. *Plast Reconstr Surg* 115(2): 506-514.
- McKerracher L, Chamoux M y Arregui CO (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol Neurobiol* 12(2): 95-116.
- McQuarrie IG (1985). Peripheral nerve surgery. *Neurol Clin* 3(2): 453-466.
- McQuarrie IG y Lasek RJ (1989). Transport of cytoskeletal elements from parent axons into regenerating daughter axons. *J Neurosci* 9(2): 436-446.
- Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK y Margolis RU (1996). TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J Biol Chem* 271(26): 15716-15723.
- Millesi H (1984). Nerve grafting. *Clin Plast Surg* 11(1): 105-113.
- Millesi H, Meissl G y Berger A (1972). The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am* 54(4): 727-750.
- Mirnic ZK, Yan C, Portugal C, Kim TW, Saragovi HU, Sisodia SS, Mirnic K y Schor NF (2005). P75 neurotrophin receptor regulates expression of neural cell adhesion molecule 1. *Neurobiol Dis* 20(3): 969-985.
- Mirsky R, Dubois C, Morgan L y Jessen KR (1990). 04 and A007-sulfatide antibodies bind to embryonic Schwann cells prior to the appearance of galactocerebroside; regulation of the antigen by axon-Schwann cell signals and cyclic AMP. *Development* 109(1): 105-116.
- Mirsky R y Jessen KR (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol* 6(1): 89-96.
- Mirsky R y Jessen KR (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* 9(2): 293-311.
- Mohanna PN, Terenghi G y Wiberg M (2005). Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 39(3): 129-137.
- Mohanna PN, Young RC, Wiberg M y Terenghi G (2003). A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J Anat* 203(6): 553-565.
- Mohiuddin L, Delcroix JD, Fernyhough P y Tomlinson DR (1999). Focally administered nerve growth factor suppresses molecular regenerative responses of axotomized peripheral afferents in rats. *Neuroscience* 91(1): 265-271.
- Monje PV, Bartlett Bunge M y Wood PM (2006). Cyclic AMP synergistically enhances neuregulin-dependent ERK and Akt activation and cell cycle progression in Schwann cells. *Glia* 53(6): 649-659.
- Morgan L, Jessen KR y Mirsky R (1991). The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* 112(3): 457-467.

9. Bibliografía

- Morris JH, Hudson AR y Weddell G (1972). A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. IV. Changes in fascicular microtopography, perineurium and endoneurial fibroblasts. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124(2): 165-203.
- Morrison SJ, White PM, Zock C y Anderson DJ (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96(5): 737-749.
- Morrissey TK, Levi AD, Nuijens A, Sliwkowski MX y Bunge RP (1995). Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1431-1435.
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y y Ochi M (2003). Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res* 974(1-2): 17-24.
- Nacimiento W, Sappok T, Brook GA, Toth L, Schoen SW, Noth J y Kreutzberg GW (1995). Structural changes of anterior horn neurons and their synaptic input caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the adult rat: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 90(6): 552-564.
- Navarro X, Vivo M y Valero-Cabre A (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82(4): 163-201.
- Nave KA y Salzer JL (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16(5): 492-500.
- Nerem RM y Sambanis A (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1(1): 3-13.
- Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR y Mackinnon SE (2004). Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 190(2): 347-355.
- Nicholson B y Verma S (2004). Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* 5 Suppl 1: S9-S27.
- Noden DM y de Lahunta A (1990). Embriología de los animales domésticos. Mecanismos de desarrollo y malformaciones. Zaragoza, Ed. Acribia, S.A.
- Novakovic SD, Deerinck TJ, Levinson SR, Shrager P y Ellisman MH (1996). Clusters of axonal Na⁺ channels adjacent to remyelinating Schwann cells. *J Neurocytol* 25(6): 403-412.
- Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO y Novikov LN (2006). Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* 77(2): 242-252.
- Okuda T, Ishida O, Fujimoto Y, Tanaka N, Inoue A, Nakata Y y Ochi M (2006). The autotomy relief effect of a silicone tube covering the proximal nerve stump. *J Orthop Res* 24(7): 1427-1437.
- Oohira A, Katoh-Semba R, Watanabe E y Matsui F (1994). Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci Res* 20(3): 195-207.
- Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevetie DM y Wang S (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373(6512): 344-346.
- Oppenheim RW, Houenou LJ, Parsadanian AS, Prevetie D, Snider WD y Shen L (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. *J Neurosci* 20(13): 5001-5011.

- Osawa T y Ide C (1986). Changes in thickness of collagen fibrils in the endo- and epineurium of the mouse sciatic nerve during development. *Acta Anat (Basel)* 125(4): 245-251.
- Osawa T, Onodera M, Feng XY y Nozaka Y (2003). Comparison of the thickness of basement membranes in various tissues of the rat. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52(4): 435-440.
- Pannese E (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 65: 1-111.
- Pasterkamp RJ y Verhaagen J (2001). Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 35(1): 36-54.
- Patrick CW, Zheng B, Schmidt M, Herman PS, Chauvin BP, Fan Z, Stark B y Evans GR (2001). Dermal fibroblasts genetically engineered to release nerve growth factor. *Ann Plast Surg* 47(6): 660-665.
- Pellitteri R, Russo A y Stanzani S (2006). Schwann cell: a source of neurotrophic activity on cortical glutamatergic neurons in culture. *Brain Res* 1069(1): 139-144.
- Perez VJ y Moore BW (1968). Wallerian degeneration in rabbit tibial nerve: changes in amounts of the S-100 protein. *J Neurochem* 15(9): 971-977.
- Perry A, Roth KA, Banerjee R, Fuller CE y Gutmann DH (2001). NF1 deletions in S-100 protein-positive and negative cells of sporadic and neurofibromatosis 1 (NF1)-associated plexiform neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Am J Pathol* 159(1): 57-61.
- Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alimandi M, Kuo A, Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC y Yarden Y (1998). ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* 18(10): 6090-6101.
- Piotrowicz A y Shoichet MS (2006). Nerve guidance channels as drug delivery vehicles. *Biomaterials* 27(9): 2018-2027.
- Platt CI, Krekoski CA, Ward RV, Edwards DR y Gavrilovic J (2003). Extracellular matrix and matrix metalloproteinases in sciatic nerve. *J Neurosci Res* 74(3): 417-429.
- Powell SK y Kleinman HK (1997). Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 29(3): 401-414.
- Raabe TD, Clive DR, Neuberger TJ, Wen D y DeVries GH (1996). Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. *J Neurosci Res* 46(2): 263-270.
- Raabe TD, Deadwyler G, Varga JW y DeVries GH (2004). Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* 45(2): 197-207.
- Raabe TD, Francis A y DeVries GH (1998). Neuregulins in glial cells. *Neurochem Res* 23(3): 311-318.
- Raff MC, Whitmore AV y Finn JT (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296(5569): 868-871.
- Raimondo S, Nicolino S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I y Geuna S (2005). Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. *J Comp Neurol* 489(2): 249-259.
- Ramer MS, Bishop T, Dockery P, Mobarak MS, O'Leary D, Fraher JP, Priestley JV y McMahon SB (2002). Neurotrophin-3-mediated regeneration and recovery of proprioception following dorsal rhizotomy. *Mol Cell Neurosci* 19(2): 239-249.
- Raphael AR, Lyons DA y Talbot WS (2011). ErbB signaling has a role in radial sorting independent of Schwann cell number. *Glia* 59(7): 1047-1055.

9. Bibliografía

- Rath EM, Kelly D, Bouldin TW y Popko B (1995). Impaired peripheral nerve regeneration in a mutant strain of mice (Enr) with a Schwann cell defect. *J Neurosci* 15(11): 7226-7237.
- Reichert F, Levitzky R y Rotshenker S (1996). Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci* 8(3): 530-535.
- Ribeiro-Resende VT, Koenig B, Nichterwitz S, Oberhoffner S y Schlosshauer B (2009). Strategies for inducing the formation of bands of Bungner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 30(29): 5251-5259.
- Ricart K, J. Pearson R J, Viera L, Cassina P, Kamaid A, Carroll SL y Estevez AG (2006). Interactions between beta-neuregulin and neurotrophins in motor neuron apoptosis. *J Neurochem* 97(1): 222-233.
- Rich KM, Luszczynski JR, Osborne PA y Johnson EM, Jr. (1987). Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J Neurocytol* 16(2): 261-268.
- Richardson PM, Miao T, Wu D, Zhang Y, Yeh J y Bo X (2009). Responses of the nerve cell body to axotomy. *Neurosurgery* 65(4 Suppl): A74-79.
- Rickmann M, Fawcett JW y Keynes RJ (1985). The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morphol* 90: 437-455.
- Roder JK, Roder JC y Gerlai R (1996). Conspecific exploration in the T-maze: abnormalities in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav* 60(1): 31-36.
- Rosberg HE, Carlsson KS y Dahlin LB (2005). Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 39(6): 360-369.
- Rose FR y Oreffo RO (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 292(1): 1-7.
- Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, Siedman J y Pham HN (1992). Artificial nerve graft using glycolide trimethylene carbonate as a nerve conduit filled with collagen compared to sutured autograft in a rat model. *J Rehabil Res Dev* 29(2): 1-12.
- Rosenbaum C, Karyala S, Marchionni MA, Kim HA, Krasnoselsky AL, Happel B, Isaacs I, Brackenbury R y Ratner N (1997). Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin, and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop. *Exp Neurol* 148(2): 604-615.
- Ruohonen S, Khademi M, Jagodic M, Taskinen HS, Olsson T y Roytta M (2005). Cytokine responses during chronic denervation. *J Neuroinflammation* 2: 26.
- Salonen V, Aho H, Roytta M y Peltonen J (1988). Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol* 75(4): 331-336.
- Satou T, Nishida S, Hiruma S, Tanji K, Takahashi M, Fujita S, Mizuhara Y, Akai F y Hashimoto S (1986). A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of severed rat sciatic nerve in silicone tubes. *Acta Pathol Jpn* 36(2): 199-208.
- Scarlato M, Ara J, Bannerman P, Scherer S y Pleasure D (2003). Induction of neuropilins-1 and -2 and their ligands, Sema3A, Sema3F, and VEGF, during Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. *Exp Neurol* 183(2): 489-498.
- Schafer BW y Heizmann CW (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21(4): 134-140.

- Schlaepfer WW y Bunge RP (1973). Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol* 59(2 Pt 1): 456-470.
- Schmidt CE y Leach JB (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 5: 293-347.
- Schworer CM, Masker KK, Wood GC y Carey DJ (2003). Microarray analysis of gene expression in proliferating Schwann cells: synergistic response of a specific subset of genes to the mitogenic action of heregulin plus forskolin. *J Neurosci Res* 73(4): 456-464.
- Seddon H (1975). Surgical disorders of the peripheral nerves. London, Churchill Livingstone.
- Shapiro L y Cohen S (1997). Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 18(8): 583-590.
- Sher SE, Hull BE, Rosen S, Church D, Friedman L y Bell E (1983). Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplantation* 36(5): 552-557.
- Sheridan MH, Shea LD, Peters MC y Mooney DJ (2000). Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release* 64(1-3): 91-102.
- Sjoberg J y Kanje M (1989). Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res* 485(1): 102-108.
- Smetana K, Jr. (1993). Cell biology of hydrogels. *Biomaterials* 14(14): 1046-1050.
- Sobol JB, Lowe IJ, Yang RK, Sen SK, Hunter DA y Mackinnon SE (2003). Effects of delaying FK506 administration on neuroregeneration in a rodent model. *J Reconstr Microsurg* 19(2): 113-118.
- Sommer I y Schachner M (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83(2): 311-327.
- Sorci G, Agneletti AL y Donato R (2000). Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* 99(4): 773-783.
- Spreca A, Rambotti MG, Rende M, Saccardi C, Aisa MC, Giambanco I y Donato R (1989). Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *J Histochem Cytochem* 37(4): 441-446.
- Stanec S y Stanec Z (1998). Ulnar nerve reconstruction with an expanded polytetrafluoroethylene conduit. *Br J Plast Surg* 51(8): 637-639.
- Stefansson K, Wollmann R y Jerkovic M (1982a). S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *Am J Pathol* 106(2): 261-268.
- Stefansson K, Wollmann RL y Moore BW (1982b). Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Res* 234(2): 309-317.
- Stoll G, Griffin JW, Li CY y Trapp BD (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18(5): 671-683.
- Stoll G, Jander S y Myers RR (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 7(1): 13-27.
- Stoll G y Muller HW (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9(2): 313-325.

9. Bibliografía

- Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ y Llana J (1996). Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 12(8): 521-527.
- Sugimura K, Haimoto H, Nagura H, Kato K y Takahashi A (1989). Immunohistochemical differential distribution of S-100 alpha and S-100 beta in the peripheral nervous system of the rat. *Muscle Nerve* 12(11): 929-935.
- Sugita N, Ishida O, Ikuta Y, Takata H, Kajihara H, Tomita Y y Ochi M (2004). Interposed autologous nerve segment stimulates nerve regeneration in peripheral nerve allografts in a rat model. *J Reconstr Microsurg* 20(2): 167-174.
- Sund M, Vaisanen T, Kaukinen S, Ilves M, Tu H, Autio-Harmanen H, Rauvala H y Pihlajaniemi T (2001). Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. *Matrix Biol* 20(4): 215-231.
- Sunderland IR, Brenner MJ, Singham J, Rickman SR, Hunter DA y Mackinnon SE (2004). Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg* 53(4): 382-387.
- Sunderland S (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74(4): 491-516.
- Sunderland S (1990). The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve* 13(9): 771-784.
- Suri A, Mehta VS y Sarkar C (2002). Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India* 50(1): 23-26.
- Swaim SF (1972). Peripheral nerve surgery in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 161(8): 905-911.
- Syroid DE, Maycox PR, Burrola PG, Liu N, Wen D, Lee KF, Lemke G y Kilpatrick TJ (1996). Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17): 9229-9234.
- Syroid DE, Zorick TS, Arbet-Engels C, Kilpatrick TJ, Eckhart W y Lemke G (1999). A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. *J Neurosci* 19(6): 2059-2068.
- Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A y Endo H (1997). Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1): 2309-2316.
- Tanaka K, Zhang QL y Webster HD (1992). Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditioning lesions. *Exp Neurol* 118(1): 53-61.
- Tandrup T, Woolf CJ y Coggeshall RE (2000). Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol* 422(2): 172-180.
- Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB y Johnson EM, Jr. (1988). Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci* 8(2): 664-681.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L y Salzer JL (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47(5): 681-694.
- Taylor RS (2006). Epidemiology of refractory neuropathic pain. *Pain Pract* 6(1): 22-26.

- Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS y Barraclough R (2002). S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer* 86(3): 409-416.
- Thippeswamy T, Jain RK, Mumtaz N y Morris R (2001). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase results in neurodegenerative changes in the axotomised dorsal root ganglion neurons: evidence for a neuroprotective role of nitric oxide in vivo. *Neurosci Res* 40(1): 37-44.
- Thippeswamy T, McKay JS, Quinn J y Morris R (2005). Either nitric oxide or nerve growth factor is required for dorsal root ganglion neurons to survive during embryonic and neonatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 154(2): 153-164.
- Thomas PK (1963). The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. *J Anat* 97: 35-44.
- Thompson DM y Buettner HM (2004). Oriented Schwann cell monolayers for directed neurite outgrowth. *Ann Biomed Eng* 32(8): 1120-1130.
- Thompson DM y Buettner HM (2006). Neurite outgrowth is directed by schwann cell alignment in the absence of other guidance cues. *Ann Biomed Eng* 34(1): 161-168.
- Tinel J (1918). Nerve wounds, symptomatology of peripheral nerve lesions caused by war wounds. New York, William Wood & Company.
- Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR y Mirsky R (2002). Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 22(15): 6696-6703.
- Tohill M, Mantovani C, Wiberg M y Terenghi G (2004). Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett* 362(3): 200-203.
- Tohill M y Terenghi G (2004). Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem* 40(Pt 1): 17-24.
- Torigoe K, Tanaka HG, Takahashi A y Hashimoto K (1997). Early growth of regenerating neurites in acrylamide neuropathic mice: application of a film model. *Brain Res* 746(1-2): 269-274.
- Tos P, Battiston B, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Hill MA, Lanzetta M y Owen ER (2000). Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery* 20(2): 65-71.
- Tos P, Calcagni M, Gigo-Benato D, Boux E, Geuna S y Battiston B (2004). Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: experimental results. *Microsurgery* 24(6): 459-464.
- Trachtenberg JT y Thompson WJ (1996). Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 379(6561): 174-177.
- Trumble TE (1992). Peripheral nerve transplantation: the effects of predegenerated grafts and immunosuppression. *J Neural Transplant Plast* 3(1): 39-49.
- Ushiki T y Ide C (1986). Three-dimensional architecture of the endoneurium with special reference to the collagen fibril arrangement in relation to nerve fibers. *Arch Histol Jpn* 49(5): 553-563.
- Ushiki T y Ide C (1987). Scanning electron microscopic studies of the myelinated nerve fibres of the mouse sciatic nerve with special reference to the Schwann cell cytoplasmic network external to the myelin sheath. *J Neurocytol* 16(6): 737-747.

9. Bibliografía

- Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X y Neiss WF (2004). Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma* 21(1): 95-108.
- Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM y Whetsell WO, Jr. (1991). Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res* 542(2): 280-285.
- Vanden Noven S, Wallace N, Muccio D, Turtz A y Pinter MJ (1993). Adult spinal motoneurons remain viable despite prolonged absence of functional synaptic contact with muscle. *Exp Neurol* 123(1): 147-156.
- Vega JA, Llamosas MM, Huerta JJ y Garcia-Fernandez JM (1996). Study of human cutaneous sensory corpuscles using double immunolabelling and confocal laser scanning microscopy. *Anat Rec* 246(4): 557-560.
- Verdú E y Navarro X (1997). Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 146(1): 187-198.
- Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE y Fawcett JW (2005). Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci* 25(2): 331-342.
- Vestergaard S, Tandrup T y Jakobsen J (1997). Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J Comp Neurol* 388(2): 307-312.
- Walicke PA y Baird A (1988). Trophic effects of fibroblast growth factor on neural tissue. *Prog Brain Res* 78: 333-338.
- Walker JC, Brenner MJ, Mackinnon SE, Winograd JM y Hunter DA (2004). Effect of perineurial window size on nerve regeneration, blood-nerve barrier integrity, and functional recovery. *J Neurotrauma* 21(2): 217-227.
- Waller A (1850). Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 140: 423-429.
- Wallquist W, Plantman S, Thams S, Thyboll J, Kortessmaa J, Lannergren J, Domogatskaya A, Ogren SO, Risling M, Hammarberg H, Tryggvason K y Cullheim S (2005). Impeded interaction between Schwann cells and axons in the absence of laminin alpha4. *J Neurosci* 25(14): 3692-3700.
- Watson WE (1974). The binding of actinomycin D to the nuclei of axotomised neurones. *Brain Res* 65(2): 317-322.
- Wen D, Peles E, Cupples R, Suggs SV, Bacus SS, Luo Y, Trail G, Hu S, Silbiger SM, Levy RB y et al. (1992). Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69(3): 559-572.
- Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM y Shakesheff KM (2001). Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 53(11): 1427-1437.
- Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G y Varon S (1983). Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 218(4): 460-470.
- Willis D, Li KW, Zheng JQ, Chang JH, Smit A, Kelly T, Merianda TT, Sylvester J, van Minnen J y Twiss JL (2005). Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci* 25(4): 778-791.

- Willis DE y Twiss JL (2006). The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 16(1): 111-118.
- Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S y Van Eldik LJ (1989). Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 3063-3071.
- Witzel C, Rohde C y Brushart TM (2005). Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 485(3): 183-190.
- Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R y Jessen KR (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci* 12(7): 839-847.
- Yan Q, Wang J, Matheson CR y Urich JL (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* 38(3): 382-390.
- Yang DP, Zhang DP, Mak KS, Bonder DE, Pomeroy SL y Kim HA (2008). Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 38(1): 80-88.
- Ygge J (1989). Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* 478(1): 193-195.
- Yip HK, Rich KM, Lampe PA y Johnson EM, Jr. (1984). The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 4(12): 2986-2992.
- Yla-Kotola TM, Kauhanen MS, Asko-Seljavaara SL, Haglund CH, Tukiainen E y Leivo IV (2008). P75 nerve growth factor receptor is expressed in regenerating human nerve grafts. *J Surg Res* 146(2): 254-261.
- Young RC, Wiberg M y Terenghi G (2002). Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *Br J Plast Surg* 55(3): 235-240.
- Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X y Gu X (2004). The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 25(18): 4273-4278.
- Yudin D, Hanz S, Yoo S, Iavnilovitch E, Willis D, Gradus T, Vuppalanchi D, Segal-Ruder Y, Ben-Yaakov K, Hieda M, Yoneda Y, Twiss JL y Fainzilber M (2008). Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron* 59(2): 241-252.
- Yurchenco PD y Cheng YS (1994). Laminin self-assembly: a three-arm interaction hypothesis for the formation of a network in basement membranes. *Contrib Nephrol* 107: 47-56.
- Zhang J, Lineaweaver WC, Oswald T, Chen Z y Zhang F (2004). Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. *J Reconstr Microsurg* 20(4): 323-327.
- Zhang Z, Prentiss L, Heitzman D, Stahl RC, DiPino F, Jr. y Carey DJ (2006). Neuregulin isoforms in dorsal root ganglion neurons: effects of the cytoplasmic domain on localization and membrane shedding of Nrg-1 type I. *J Neurosci Res* 84(1): 1-12.
- Zimmer DB, Chessher J, Wilson GL y Zimmer WE (1997). S100A1 and S100B expression and target proteins in type I diabetes. *Endocrinology* 138(12): 5176-5183.

9. Bibliografía

Zochodne DW (2008). Neurobiology of peripheral nerve regeneration. Cambridge, Cambridge University Press.

Zochodne DW y Cheng C (2000). Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat* 196 (Pt 2): 279-283.

Zorick TS y Lemke G (1996). Schwann cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 8(6): 870-876.