



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Máster en Investigación en CC.de la Salud: Farmacología,
Neurobiología y Nutrición Molecular

Trabajo de Fin de Máster:

Reparación de neurectomías experimentales mediante
injerto de nervio autólogo en ratas.

Presentado por Noa Feás Rodríguez

Tutor: Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. Consideraciones previas: Estructura del sistema nervioso	3
2.2. Antecedentes: Degeneración y regeneración del tejido nervioso	6
2.3. Importancia y justificación	10
3. Objetivos	13
4. Materiales y Métodos	14
4.1. Materiales	14
4.1.1. Animales de experimentación	14
4.1.2. Productos químicos	15
4.1.3. Equipos e Instrumental	16
4.2. Métodos	17
4.2.1. Operaciones quirúrgicas: Implante de nervio autólogo	17
4.2.2. Elaboración de las prótesis tubulares	19
4.2.3. Estudio del comportamiento motor	20
4.2.4. Obtención y preparación del tejido	22
4.2.5. Estudio histológico	23
5. Resultados	24
5.1. Desarrollo de las intervenciones quirúrgicas	24
5.2. Comportamiento motor	26
5.3. Preparación de la muestra	28
5.4. Histología	29
6. Discusión	37
7. Referencias	44

Lista de abreviaturas:

BDNF	“Brain- derived Neurotrophic Factor”
CS	Célula/s de Schwann
DMEM	“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”
EPD	Extremidad posterior derecha
EPI	Extremidad posterior izquierda
EPL	Distancia de la pisada experimental
ETS	Anchura de la pisada experimental
FGF	“Fibroblast Growth Factor”
HE	Hematoxilina-eosina
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
ITS	Anchura intermedia de la pisada
ME	Microscopía electrónica
NGF	“Nerve Growth Factor”
NPL	Distancia de la pisada normal
NTS	Anchura de la pisada normal
PLC	Policaprolactona
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PMR	“Preferential Motor Reinnervation”
SFI	Índice Ciático Funcional
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TOF	Distancia a la extremidad posterior contraria

1. Resumen

Las lesiones en los nervios periféricos suponen un problema de gran relevancia socio-sanitaria debido a su frecuencia cada vez más elevada y a sus consecuencias negativas: generan dolor, incapacidad, gastos sanitarios, etc. Numerosos tipos de tratamiento han sido estudiados para conseguir la regeneración de los nervios dañados. En la actualidad, el estándar de tratamiento se basa en el implante de nervio autólogo. Este estudio profundiza en el estándar de tratamiento, llevado a cabo en la rata, como modelo animal. Para ello, hemos realizado una revisión de la literatura científica relacionada, así como un estudio experimental con catorce ratas Wistar, sobre las que hemos llevado a cabo una neurectomía del nervio ciático, que hemos reparado mediante injerto de nervio autólogo tomado del mismo individuo en el que se implanta. La histomorfología y las pruebas de comportamiento motor se realizan a las 3 semanas post-intervención, obteniendo una serie de resultados cualitativos que, en conjunto, señalan una reparación importante coincidente, en general, con la descrita en la literatura científica publicada.

2. Introducción:

La reparación de lesiones en los nervios periféricos continúa siendo un problema sin resolver en su totalidad, por ello, multitud de grupos de investigación se han centrado en buscar soluciones a dicho problema.

En este trabajo revisaremos el estado actual de la investigación en este campo, centrándonos en la aplicación de la técnica de implante de nervio autólogo, es decir, injertos tomados del mismo individuo en el que se aplican; para reparar este tipo de lesiones traumáticas. Tomando como modelo animal el nervio ciático de rata.

2.1. Consideraciones previas: Estructura del sistema nervioso.

El tejido nervioso está distribuido por todo el organismo formando una red de comunicaciones que constituye el sistema nervioso. Desde el punto de vista anatómico, este sistema se divide en: 1) sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal, y 2) el sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios y por pequeños grupos de neuronas denominadas ganglios nerviosos. Los nervios están formados principalmente por prolongaciones de las neuronas (células nerviosas) situadas en el SNC o en los ganglios nerviosos.

El tejido nervioso tiene dos componentes principales: las neuronas; que presentan distintas formas, tamaños y diferentes tipos de prolongaciones (dendritas, axones) de longitud variable; y diversos tipos de células de la glía o neuroglía, que realizan una función de soporte de las neuronas y que participan en otras funciones importantes.

Las neuronas están formadas por dendritas, cuerpo celular y axón, que es una prolongación única y especializada en la conducción de impulsos que transmite información desde la neurona a otras células o a otras neuronas.

En el concepto general de neuroglía se incluyen varios tipos celulares presentes en el sistema nervioso central, en la proximidad de las neuronas. Con tinciones como la de hematoxilina-eosina (HE) se distinguen con dificultad, por eso para el estudio de estas células se utilizan métodos especiales de impregnación con plata o con oro y técnicas de inmunohistoquímica. Las células de la glía son: oligodendrocitos, astrocitos, células ependimarias y microglía, en el SNC; y células de Schwann (CS) y células gliales de los ganglios nerviosos, en el SNP.

Centrándonos en las células de Schwann, que serán relevantes en los temas tratados en este trabajo, se trata de células que desempeñan un papel similar al de los oligodendrocitos: producción de vainas de mielina que actúan como aislantes eléctricos, aunque los oligodendrocitos lo hacen a nivel de neuronas del SNC, mientras que las CS actúan en relación a los axones del SNP. Cada célula de Schwann elabora la mielina de un segmento de un único axón o de grupos de fibras nerviosas amielínicas.

Los componentes del SNP son los nervios, los ganglios y las terminaciones nerviosas. Los nervios son haces de fibras nerviosas rodeados por tejido conjuntivo.

Las fibras nerviosas están formadas por un axón o dendrita y por la vaina que lo rodea. Todos los axones del tejido nervioso del adulto están rodeados por pliegues únicos o múltiples formados por una sola célula. En las fibras nerviosas periféricas la célula que rodea al axón es una célula de Schwann.

Existen dos tipos de fibras nerviosas: las fibras nerviosas amielínicas y las fibras nerviosas mielínicas.

En las fibras mielínicas del SNP, la membrana plasmática de la CS muestra un enrollamiento alrededor del axón. Esta membrana enrollada se

fusión dando lugar a la mielina, un complejo lipoproteico de coloración blanquecina que es eliminado parcialmente al aplicar las técnicas histológicas.

La vaina de mielina se interrumpe a intervalos regulares formando los nódulos de Ranvier que aparecen recubiertos por expansiones laterales de las células de Schwann. El intervalo entre los nódulos se denomina internodo y está recubierto por una única CS. El grosor de la vaina de mielina varía según el diámetro del axón, aunque es constante a lo largo de un mismo axón.

Tanto en el SNC como en el periférico, no todos los axones están recubiertos por mielina. Las fibras amielínicas periféricas también están rodeadas por CS, pero en este caso no tiene lugar el enrollamiento en espiral. Una única CS rodea a varias fibras nerviosas amielínicas.

En el SNP las fibras nerviosas se agrupan en haces que dan lugar a los nervios. Debido a su contenido en mielina y colágeno los nervios son blanquecinos. El tejido de sustentación de los nervios está formado por una capa fibrosa externa de tejido conjuntivo denso, o **epineuro**, que reviste el nervio y que rellena los espacios que quedan entre los haces de fibras nerviosas. Cada uno de estos haces está revestido por una vaina de varias capas de células aplanadas y yuxtapuestas, denominada **perineuro**. En el interior de la vaina perineural se sitúan los axones, cada uno de ellos rodeado por la vaina de células de Schwann con su lámina basal y con una cubierta de tejido conjuntivo, formado principalmente por células endoneurales (derivadas de fibroblastos) que producen reticulina y colágeno, denominada **endoneuro**. Los nervios establecen comunicación entre los centros nerviosos y los órganos sensoriales por un lado, y los efectores (músculos, glándulas) por otro (Figura 1) [1].

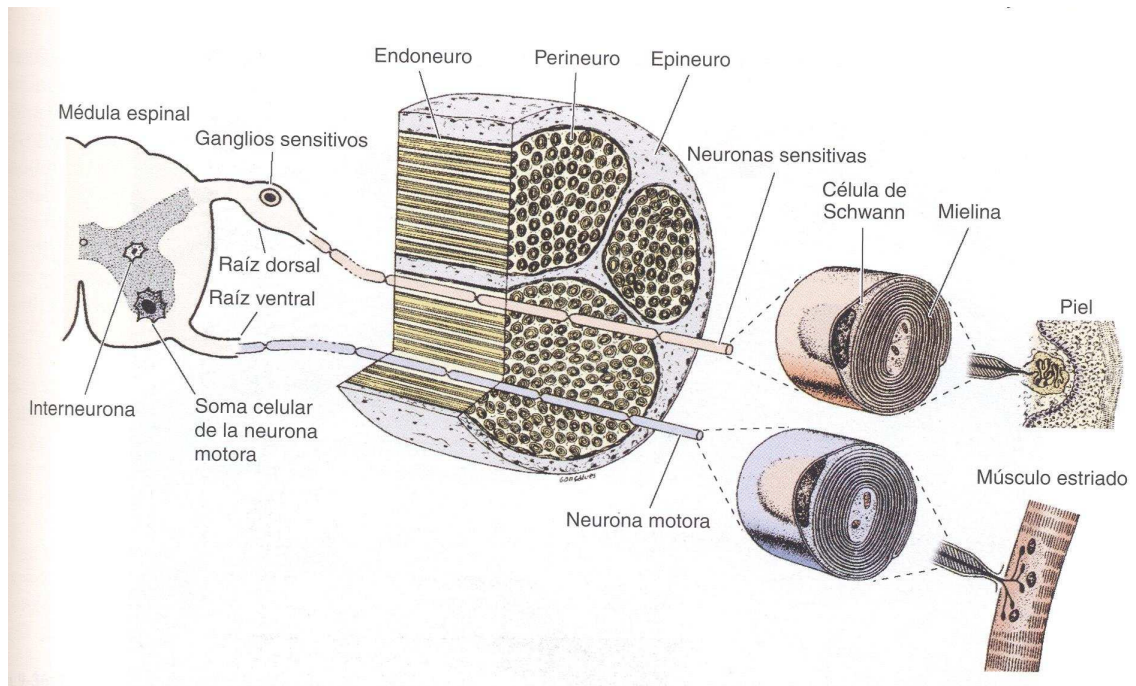


Fig.1. Representación esquemática de un nervio mixto y del arco reflejo más simple. Tomada de Junqueira LC *et al.*: Histología básica, 6ª ed. Masson, 2005.

2.2. Antecedentes: Degeneración y regeneración del tejido nervioso.

El sistema nervioso es uno de los tejidos más especializados en animales vertebrados, especialmente en mamíferos. Por esta razón también presenta una capacidad de regeneración menor que la de otros tejidos.

Dado que las neuronas de los mamíferos no suelen dividirse, la destrucción de una neurona constituye una pérdida permanente. Sin embargo, las prolongaciones neuronales pueden regenerarse dentro de ciertos límites debido a la actividad de síntesis del pericarion. Por ello, los nervios se pueden regenerar, aunque con dificultades.

Cuando se destruye una célula nerviosa, las que están unidas a ella no sufren alteraciones excepto en los casos infrecuentes en los que una neurona sólo recibe impulsos de otra. En este caso, la neurona queda completamente

privada de impulsos nerviosos debido a la destrucción de la otra neurona y sufre la denominada degeneración transneuronal.

Al contrario de lo que ocurre con las neuronas, las células de la glía del SNC, así como las células de Schwann y las células satélite de los ganglios del SNP, están dotadas de una gran capacidad de proliferación. Los espacios que dejan las células y las fibras nerviosas en el SNC a causa de alguna enfermedad o accidente son ocupados por las células de la neuroglía.

Debido a su distribución por todo el cuerpo, las lesiones de los nervios no son infrecuentes. Cuando se realiza la sección de un nervio tienen lugar alteraciones degenerativas seguidas de una fase de reparación.

En un nervio lesionado hay que diferenciar la parte de la fibra que se separa de la neurona a causa de la lesión (parte distal) de la parte que continúa unida a la neurona (parte proximal). Debido a que mantiene contacto con el pericarion, que es un centro trófico, el segmento proximal suele presentar regeneración, mientras que el segmento distal sufre una degeneración total y acaba por ser reabsorbido si no se ponen los medios para evitarlo [1].

Las lesiones en el sistema nervioso periférico, particularmente en nervios, responden a diferentes causas como, por ejemplo, traumatismos, enfermedades (e.g. cáncer), causas iatrogénicas (por procedimientos quirúrgicos etc.). El nervio periférico puede quedar parcial o totalmente dañado si no se trata [2].

Independientemente de las causas de estas lesiones, comúnmente se emplean dos métodos principales de tratamiento o reparación:

- Si la longitud o distancia (“gap”) entre los dos extremos es lo suficientemente pequeña: se suturan directamente.

- Si la distancia es demasiado grande (20 mm o más en humanos), actualmente se utilizan autoinjertos, esta técnica es considerada como el mejor tratamiento, o lo que se conoce como patrón de oro o “gold standard” para el tratamiento de lesiones severas o graves en nervios.

Sin embargo, este procedimiento requiere que otro sitio sea dañado para obtener un nervio intacto como fuente del implante. Debido a esto se han buscado alternativas desarrollando compuestos biomiméticos [3].

Una de las alternativas sobre las que más se ha trabajado desde 1880, es la basada en la aplicación de distintos tipos de tubos, fabricados con diferentes tipos de materiales [4].

En las últimas décadas, Lundborg y colaboradores han estandarizado un protocolo basado en modelos animales [5]. A pesar de que ciertos procedimientos están estandarizados, diferentes laboratorios han estudiado y siguen investigando otros métodos y materiales: distintas longitudes de separación, distintas especies animales, distintos sitios anatómicos, distintos dispositivos. Todo esto hace difícil su comparación [3].

Yannas *et al.*, señalaron en 2004 la necesidad de una metodología que permita normalizar los datos y compararlos. Los componentes críticos en la calidad de la regeneración nerviosa, que ellos mismos señalaron se clasifican en: factores de crecimiento, células de soporte, mallas o andamiajes y matriz extracelular insoluble. Una revisión breve de los hallazgos iniciales y recientes se describe a continuación [3].

Implantes tubulares y andamiajes:

Han sido utilizados materiales naturales y sintéticos para fabricar implantes. Existen tubos comerciales de silicona desarrollados por Lundborg y colaboradores así como por Williams *et al.* [5, 6]. Otros tubos basados en polímeros sintéticos biodegradables como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) se han utilizado mostrando un papel importante en la regeneración de nervios. Otra alternativa son las mallas de hidrogel y macroporos [7].

Otros estudios se han centrado en materiales naturales. Por señalar, brevemente, algunos ejemplos:

-Mallas de colágeno, Chamberlain *et al.* [8].

-Injerto venoso relleno de una matriz de colágeno que promueve regeneración axonal, Choi *et al.* [9].

-Gel de alginato, Hashimoto *et al.* [10].

-Injertos a base de tendón, músculo acelular y nervio acelular, (Lundborg *et al.*) que son apropiados para la reparación de nervios periféricos. Aunque comparados con los injertos de nervio “fresco” (“fresh nerve graft”) han mostrado periodos de retraso inicial en el proceso de reinervación del cabo proximal [5].

-Andamiajes de hidrogel anisotrópicos, contruidos como estructuras tridimensionales de agarosa con gradientes de glicoproteína promotora del crecimiento (laminina-1) que promueven extensión direccional de neuritas e incrementa la regeneración (Bellamkonda *et al.*) [11].

Factores de crecimiento:

Se ha postulado que los factores de crecimiento mejoran la supervivencia neuronal. Algunos de los factores de crecimiento utilizados que se ha encontrado que facilitan la regeneración en SNP son:

-NGF “nerve growth factor”

-BDNF “brain-derived neurotrophic factor”

-IGF-1 “insulin-like growth factor”

-FGF “fibroblast growth factor”

La eficacia de estos factores de crecimiento es altamente dependiente de diferentes variables: dosis, secuencia, tiempo de duración y liberación, etc. [3].

Células de soporte:

Diversos experimentos han demostrado que las células de Schwann proporcionan un sustrato predilecto para la migración de los axones y además liberan factores de crecimiento que implementan la regeneración nerviosa.

En los experimentos de Nilsson *et al.*, se usaron trozos de nervio de los cabos proximal y distal que se cortan en la reparación del injerto como fuente de células de Schwann. Estas células se inyectan posteriormente en un tubo de

silicona para rellenar una separación de 10 mm en el nervio ciático de rata. Los resultados apuntan a que los tubos que contenían células de Schwann tenían una regeneración mayor de fibras nerviosas en comparación con tubos sin células [12].

Otras células han sido probadas: fibroblastos [13], células embrionarias de riñón humanas, células madre de distintos tipos, etc. con resultados inferiores a los obtenidos con implantes de nervio autólogo.

Matriz extracelular insoluble, análogos y componentes:

Se han empleado diversos sustratos insolubles que han sido probados como agentes con actividad regenerativa. Un ejemplo es la utilización de tubos o guías de materiales basados en policaprolactona (PLC) con el fin de obtener un material biodegradable y biocompatible y encontraron que usando quitosano y gelatina como capas internas mejoraba la calidad de la regeneración [14].

Existen diversas teorías sobre los mecanismos por los que se produce la regeneración de nervios. En la revisión de Yannas de 2007, se llega a la conclusión de que en los experimentos con “gaps” de más de 1cm donde se utilizan tubos, la configuración tubular ideal debería ser una mezcla de varios factores, incluyendo la habilidad de bloquear a los miofibroblastos para que no formen cápsulas contráctiles y facilitando la formación de mircrotúbulos a través de estructuras orientadas axialmente y probablemente otras características [3].

2.3. Importancia y justificación:

Las lesiones de los nervios periféricos representan una parte importante de las intervenciones quirúrgicas. La pérdida funcional que conlleva la lesión no reparada puede producir una incapacidad muy importante de la que deriva su interés socio-sanitario. La regeneración de nervios periféricos sigue siendo un

problema clínico serio. Como hemos señalado, la mejora en la reparación de lesiones del SNP es de gran relevancia. Según los datos disponibles, en Estados Unidos 200.000 pacientes al año sufren una lesión en nervios periféricos que requiere de intervención quirúrgica [2]. En Europa se dan más de 300.000 casos al año [15].

Además de que la prevalencia pueda ser más o menos alta, se trata de lesiones que, de no repararse adecuadamente, generarán disminución de la calidad de vida del paciente, así como dolor crónico, discapacidad, etc.

Por otro lado, la resolución de este tipo de problema es de gran relevancia científica. Además, los avances en reparación del SNP pueden ayudar a mejorar también el panorama de la regeneración a nivel de SNC.

Ya indicamos que cuando se secciona un nervio periférico con una sección limpia, sin pérdida de tejido y sin una separación excesiva de los cabos proximal y distal, la regeneración nerviosa puede conseguirse mediante una simple sutura término-terminal. Así, puede obtenerse una reinervación periférica relativamente adecuada tanto de los músculos como de los receptores sensoriales. En cirugía humana se considera aceptable una recuperación de la capacidad funcional de un nervio entre un 30 y un 90% [9]. Sin embargo, en las lesiones de los nervios, lo más frecuente es que los cabos proximal y distal queden excesivamente separados, ya sea por pérdida traumática de tejido nervioso, por una cirugía necesaria o por la retracción de los cabos del nervio seccionado [16]. Cuando los dos cabos del nervio seccionado no pueden ser aproximados para suturarlos, sin someterlos a una tensión excesiva, es necesaria la colocación de un “puente biológico” que una los cabos proximal y distal del nervio lesionado y posibilite su reparación [17].

Aunque hemos comentado que existen numerosas técnicas y metodologías para favorecer la regeneración nerviosa y la reparación de lesiones en el SNP, la técnica que aquí nos ocupa es la de utilización de un injerto autólogo, que es la que ha demostrado mayor eficacia [11].

La técnica de autoinjerto: “gold standard”

Hasta el momento, la mejor manera de reparar las lesiones de los nervios, con separación de los extremos, es el implante de segmentos de nervio autólogo [11]. Esta técnica ha pasado a conocerse como “gold standard” o estándar de oro en regeneración y reparación nerviosa. Generalmente, se sacrifica un nervio sensorial del mismo paciente para regenerar un nervio motor [18].

Lo que se conoce en clínica humana como injerto de nervio autólogo se puede realizar en animales de experimentación: injertos de un mismo individuo que actúa como donante y receptor. En Medicina humana, el “estándar de oro” consiste en utilizar parte de un nervio sensorial, menos valioso, para reparar un nervio motor, con mayor importancia funcional.

Además los modelos animales han sido ampliamente utilizados y han demostrado ser extrapolables, con las debidas precauciones, a la clínica humana. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento de llevan a cabo en modelos animales, sobre todo en especies como la rata, ratones y conejos [11].

Investigaciones previas han demostrado que tras lesión del nervio periférico los axones motores reinervarán preferiblemente ramas motoras antes que sensoriales. Brushart *et al.*, 1998, mostraron que esta reinervación motora preferente (“preferential motor reinnervation”, PMR) era debida a un proceso de “brote” selectivo [19].

Los trasplantes autólogos presentan una serie de inconvenientes, tales como el aumento del tiempo y de la dificultad de la intervención quirúrgica, la escasez de nervio disponible, la desigualdad entre el tamaño del nervio implantado y el del nervio receptor, el dolor, la pérdida de sensibilidad o la formación de escaras o de neuomas [20, 21].

A pesar de los inconvenientes antes señalados, en la clínica humana se han utilizado tres tipos de prótesis comercialmente disponibles: tubos de colágeno

tipo I (NeuraGen), tubos de poli-ácido glicólico (Neurotube) y nervio alogénico descelularizado (Avance, AxoGen Inc.) según el método de Hudson et al.(2004) [22].

Con NeuraGen se han obtenido buenos resultados en defectos de nervio de la mano entre 0,5 y 3 cm [23]. En un modelo experimental de rata, Whitlock *et al.* (2009) obtuvieron los mejores resultados con los implantes isogénicos (equivalentes a los autólogos) seguidos por los nervios alogénicos descelularizados (Avance) y en tercer lugar los tubos de colágeno (NeuraGen) [24].

3. Objetivos:

El **objetivo general** de este trabajo se puede definir como la puesta a punto de un modelo de transplante autólogo de nervio ciático de rata.

Como **objetivos concretos** nos proponemos:

1. Llevar a cabo el aprendizaje de los métodos quirúrgicos para la realización de la neurectomía y neurorrafia del nervio ciático en un modelo animal.
2. Seleccionar pruebas de evaluación de función motora en animales con lesiones nerviosas
3. Adaptar las técnicas de perfusión e inclusión en epoxi-resina a este modelo experimental.
4. Abrir el camino para buscar técnicas y métodos alternativos a la técnica conocida como “gold standard” en regeneración nerviosa. El objetivo último será la comparación de este método con la aplicación de una prótesis tubular que proteja al injerto autólogo y

que obtenga mejores resultados que los utilizados hasta el momento.

Para cumplir con estos objetivos hemos empleado los materiales y métodos que se exponen a continuación.

4. Materiales y Métodos:

4.1. Materiales.

4.1.1. Animales de experimentación:

La especie animal empleada para la realización de los experimentos es la rata, *Rattus norvegicus* (Muridae, Rodentia, Mammalia). Se utilizaron concretamente 14 ratas Wistar, adultas jóvenes, tanto machos como hembras. El peso de los individuos oscilaba entre 190 y 400 g en el momento de la intervención quirúrgica, no se apreciaron diferencias en las dimensiones de los nervios ciáticos ni en los parámetros de regeneración entre los ejemplares. Se repartieron en 3 grupos: implante autólogo (12), prótesis tubular (1), control (1).

Los animales se mantuvieron estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Las condiciones de estabulación fueron las siguientes: temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas y alimentación *ad libitum* con agua y pienso para ratas.

Todos los animales se trataron siguiendo la normativa vigente de la Comunidad Europea (2010/636/EU), del Estado Español (RD 52/2013) y del Comité Ético de la Universidad de Valladolid.

4.1.2. Productos químicos:

Los productos químicos más destacados que se han empleado son:

- Acetona. CH_3COCH_3 #8222511000 Merck, Darmstadt, Alemania.
- Ácido acético glacial. CH_3COOH #100063 Merck, Darmstadt, Alemania.
- 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.).
- 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.
- Bencilpenicilina. Benzetacil®, Sandoz.
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). #31885 Gibco, Invitrogen.
- Entellan®. Medio de montaje para microscopía. #107961.0100 Merck, Darmstadt, Alemania.
- Formaldehído 35-40%. CH_2O #20910.294 BDH-Prolabo, Briare, Francia.
- H_2O Milli-Q, obtenida en nuestro laboratorio.
- Ibuprofeno. Dalsy®, 20mg/ml suspensión oral, Abbott Laboratories.
- Ketamina clorhidrato. Imalgene® 500, Merial S.A., Lyon, Francia.
- Osmio (VIII) óxido. OsO_4 #124505.0500 Merck, Darmstadt, Alemania.
- Óxido de propileno. $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ #110205 Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), EEUU.
- Paraformaldehído. $(\text{CH}_2\text{O})_n$ #104005.1000 Merck, Darmstadt, Alemania.

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

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

Disoluciones:

-Paraformaldehído tamponado. Está compuesto de 4% (p/v) paraformaldehído despolimerizado tamponado a pH 7.4.

-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 Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄. Se ajusta el pH a 7.4 a 25°C con NaOH 1 N y el volumen a 1 litro con H₂O Milli-Q.

-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 H₂SO₄ y 50 g de K₂Cr₂O₇ mezclados en 1 l de H₂O Milli-Q. Después se lavan los portaobjetos con H₂O Milli-Q 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 H₂O Milli-Q durante 2 min y se dejan secar a temperatura ambiente.

-Tampón fosfato 0.4M, pH 7.4 a 25° C. Se prepara mezclando 10.6 g de NaH₂PO₄·2H₂O y 56 g de K₂HPO₄ en 1 l de H₂O Milli-Q 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 H₂O Milli-Q.

4.1.3. Equipos e Instrumental:

-Balanza Kern EG 600-2M. Kern & Sohn GmbH; Balingen, Alemania.

- Balanza de precisión Sartorius-Werke 2402; Göttingen, Alemania.
- Campo abierto: diámetro externo, 120cm; altura de la chapa, 30cm; diámetro de la circunferencia interior, 80cm. Dividida en 12 sectores: longitud del arco de circunferencia interior: 21,5 cm, longitud del arco de circunferencia exterior: 30,0 cm, profundidad del sector de círculo: 20,0 cm.
- Esterilizador/autoclave Raypa 75 L. R. Espinar, S.L., Terrasa, España.
- Microscopio biológico Zeiss Axiophot equipado para microscopía de campo claro, campo oscuro, contraste interferencial de Nomarski y epifluorescencia, con objetivos PlanApo 1.25x y UPlanFl 4x, 10x,20x, 40x y 100x y sistema de captura de imágenes AxioCam HRC.
- Material quirúrgico necesario para las intervenciones, esterilizado en nuestro laboratorio.
- Microscopio quirúrgico de baja magnificación Optomic OP-C12. Optomic Spain, S.A., Madrid, España.
- Microtomo de rotación. Microm HM. Microm International GmbH, Walldorf, Alemania.
- Microscopio estereoscópico LEICA M80.
- Pasillo para el análisis de la huella al caminar, descrito por Bain *et al.* [28].
- Pipetas de precisión con rango entre 1.000 - 0.1 μ l Eppendorf Research; Alemania.

4.2. Métodos.

4.2.1. Operaciones quirúrgicas: Implante de nervio autólogo.

Se colocó un implante de nervio ciático autólogo en 12 ratas Wistar, el implante se tomó del mismo individuo en el que fue implantado en el mismo momento de la intervención, recogién dose de la extremidad posterior izquierda (EPI) y colocándose en la extremidad posterior derecha (EPD). Tan sólo en una de las ratas se implantó nervio autólogo en el interior de una de las prótesis tubulares que se describen en el siguiente apartado.

Las ratas Wistar receptoras del implante autólogo o la prótesis fueron anestesiadas por vía peritoneal con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000, Merial) 80 mg/kg de peso y xilacina (Rompun, Bayer) 8mg/kg de peso. Una vez expuesto el nervio ciático del lado derecho se extrajo un segmento de 2-3 mm que fue sustituido por un segmento de nervio procedente de ciático izquierdo del mismo animal.

Esta dosis de anestésicos permite de 60 a 90 minutos de sedación quirúrgica. Una vez comprobada la eficacia de la anestesia por ausencia de reflejo palpebral y, tras la pertinente preparación del campo quirúrgico, se practicó un corte en la piel del muslo de la pata derecha de 2 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 2-3 mm (longitud siempre inferior a la del injerto autólogo o la prótesis tubular para evitar tensiones en los puntos de sutura) y en su lugar se interpuso una prótesis de 5-8 mm 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 dos suturas de monofilamento no absorbible 8/0 de poliamida (Laboratorio Aragón) en el cabo nervioso proximal

separadas 180°. Estas suturas mantienen el cabo y el injerto alineados. 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. Es deseable un número pequeño de suturas para que la reacción inflamatoria causada por el material de sutura sea mínima. Swaim *et al.* determinaron que cuatro suturas equidistantes son suficientes para una adecuada reparación en el caso de la coaptación de dos cabos nerviosos seccionados [25].

Una vez implantada la prótesis, se cerró el campo operatorio suturando la fascia muscular con CatGut 5-0 y la piel con seda 6-0 o grapas. 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. Además, se aplicó una dosis de antibiótico de liberación retardada (bencilpenicilina) vía intramuscular y también se administró antiinflamatorio (ibuprofeno) en el agua de bebida.

En los ejemplares en los que fue posible, se unieron los cabos proximal y distal de la EPI con una sutura simple término-terminal. En otros se dejaron los cabos sin unir. Ambos casos han sido valorados histológicamente y también su comportamiento motor, utilizando esta extremidad como control negativo.

4.2.2. Elaboración de las prótesis tubulares:

Como decíamos, se colocó una prótesis tubular en una de las ratas. Pero se realizaron numerosas pruebas hasta obtener una prótesis que se adecuara a la intervención y los objetivos perseguidos.

La prótesis tiene un diseño tubular de 1 cm de longitud y un diámetro interior de 2.4 mm y está fabricada con ácido poli(láctico-co-glicólico).

Para la fabricación del tubo se elaboró una solución de ácido poli(láctico-co-glicólico) al 20% en ácido acético glacial, en agitación moderada y a temperatura ambiente durante 24 horas.

Una vez disuelto, se elaboraron láminas finas extendiendo 1 ml de la solución sobre un portaobjetos en posición horizontal. Tras la evaporación del exceso de ácido acético (el proceso lleva aproximadamente 72 horas), una fina película de PLGA cubre toda la superficie del portaobjetos de forma uniforme. Introduciendo el portaobjetos en un recipiente con H₂O Milli-Q durante unos segundos, la lámina se despegar 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:

La membrana se enrollan a lo largo de su eje menor formando un tubo hueco de 2.4 mm de diámetro interno aproximadamente. Se deja secar de nuevo para eliminar cualquier resto de ácido acético glacial.

En su interior antes de la implantación se introduce el injerto de nervio autólogo mediante aspiración.

4.2.3. Estudio del comportamiento motor:

Una vez transcurrido el correspondiente periodo de supervivencia, en este caso 3 semanas, se estudió el comportamiento motor, básicamente mediante la prueba de actividad en campo abierto, el análisis de la huella al caminar (“Walking track analysis”) y el cálculo del Índice Ciático Funcional (SFI).

El análisis del movimiento en el círculo de campo abierto se hizo sobre las imágenes tomadas con videocámara. Se trata de un test que mide no solo la actividad o función motora, sino también la reactividad emocional. Se valoraron los siguientes parámetros en un tiempo de 2 minutos: deambulación, cuantificado como el número de veces que la rata cambia de sección del círculo; excreciones, donde se tiene en cuenta la presencia de orina y/o defecaciones; presencia de vocalizaciones, como reacción a la manipulación [26].

Además, analizamos las huellas dejadas por los animales al caminar por un pasillo estrecho tras impregnarse las patas en tinta de tampón. En las huellas se midió la longitud total de la huella, la separación máxima entre los dedos, es decir, la distancia entre el primer y quinto dedo, así como la separación intermedia entre los dedos del segundo al cuarto [27]. Con estos parámetros se puede calcular el Índice Ciático Funcional mediante la fórmula siguiente fórmula [28, 29]:

$$SFI = 118.9 \left[\frac{ETS - NTS}{NTS} \right] - 51.2 \left[\frac{EPL - NPL}{NPL} \right] - 7.5$$

Donde ETS es la anchura de la pisada experimental y NTS de la normal. PL es la distancia de la pisada, miden la distancia entre el primer y el quinto dedo.

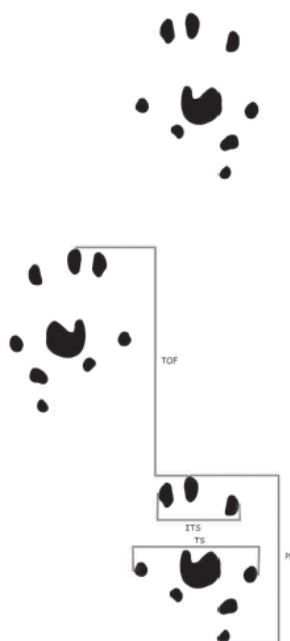


Fig.2. Relación espacial de las pisadas durante el “Walking track”. Se aprecian los parámetros descritos: ITS (distancia entre el segundo y el cuarto dedo), TS (distancia entre el primer y el quinto dedo), TOF (distancia al pie contrario), PL (longitud de la huella). Imagen tomada de Sarikcioglu BM et al., 2008.

Otra de las medidas realizadas fue el TOF: distancia a la extremidad posterior contraria. También se tiene en cuenta en alguna de las variantes de la fórmula, el ITS (distancia entre el segundo y el cuarto dedo) [30].

Las medidas que se tomaron como referencia aparecen representadas en la Figura 2.

4.2.4. Obtención y preparación del tejido:

Una vez transcurridas las 3 semanas y realizadas las pruebas de funcionamiento motor, se anestesió profundamente a los animales con una mezcla de ketamina y xilacina (35 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilacina).

Se llevó a cabo la perfusión de los tejidos para su mejor fijación y conservación lo más estable posible. Se disecaron las extremidades posteriores.

Se extrajeron los segmentos implantados, más una porción de aproximadamente 5 mm de nervio ciático antes y después de la bioprótesis en la EPD y también se obtuvo muestra de tejido nervioso de la EPI.

Se realizó el protocolo de inclusión, corte y tinción de las muestras que se describe a continuación:

Los fragmentos se fijaron por perfusión de los tejidos y posterior 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 epoxi-resina y seccionados con un microtomo de rotación siguiendo un plano longitudinal. 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%).

4.2.5. Estudio histológico:

Se realizó mediante Microscopía de luz en campo claro.

Se evaluó de forma cualitativa la presencia o ausencia de degeneración y regeneración nerviosa.

El análisis se llevó a cabo mediante la observación a diferentes aumentos panorámicos. Se valoraron tanto el tamaño, forma y disposición de las fibras nerviosas mielínicas, como la distribución general del nervio. También se tuvieron en cuenta otros factores como la presencia de cuerpos degenerativos derivados de la mielina, presencia de macrófagos fagocíticos y de células gigantes de cuerpo extraño, etc.

5. Resultados:

A continuación, se exponen los resultados obtenidos mostrando únicamente algún ejemplo de cada tipo de resultado, ya que pensamos continuar analizando dichos resultados en posteriores estudios.

5.1. Desarrollo de las intervenciones quirúrgicas:

Durante las operaciones realizadas se tomaron fotografías y vídeos para tener constancia de las medidas de los defectos creados mediante neurectomía así como de los implantes colocados.

En general, los animales responden adecuadamente a la anestesia y a la intervención. No se produce un sangrado excesivo debido a que las masas musculares se separan mediante una técnica de abordaje sin incisión traumática de los paquetes musculares (Figura 3).

La correcta colocación de las prótesis supuso un proceso de aprendizaje costoso con problemas en los inicios para el dominio de las técnicas microquirúrgicas. Pudimos comprobar que, durante el proceso quirúrgico, que implicaba colocación de un constructo de prótesis tubular e implante autólogo, la pared exterior de ácido poli(láctico-co-glicólico) no se desenrollaba al ser colocada, pero sí se observó cierta tendencia al colapso del tubo. El tubo de PLGA no 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.

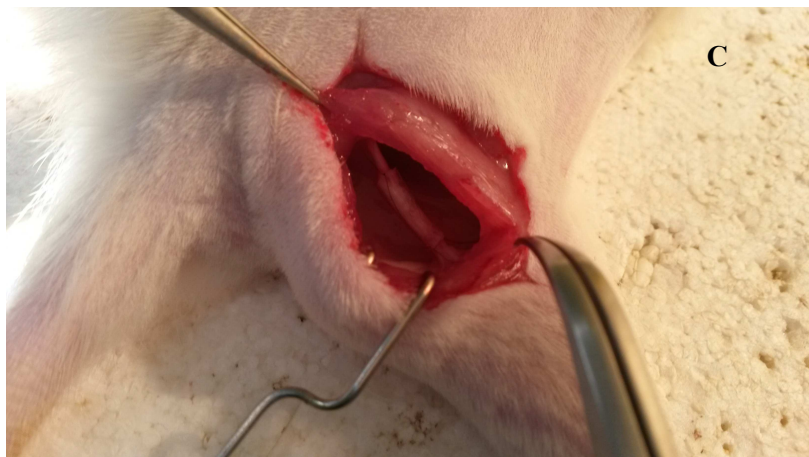
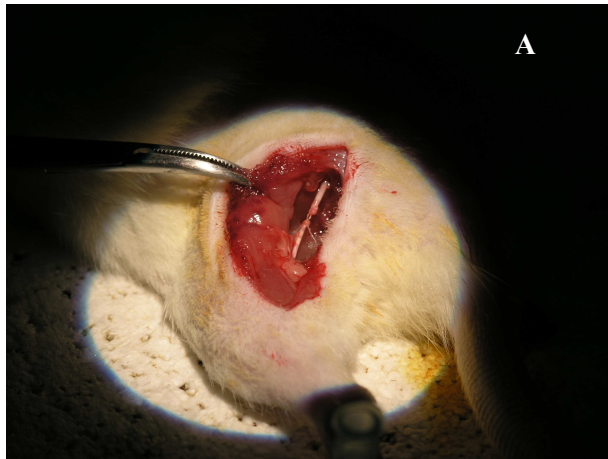


Fig.3. Imagen A: se observa la sutura término-terminal aproximando los cabos proximal y distal en la EPI, de la cual se ha tomado el implante autólogo que se aplicó en la EPD. Implante ciático autólogo (B). Implante autólogo con prótesis tubular de PLGA (C).

5.2. Comportamiento motor:

En cuanto a la función motora, se examinó a los 21 días post-intervención mediante las técnicas señaladas en “Métodos”.

Los resultados fueron, en general, positivos mostrando cierta regeneración nerviosa. Aunque cabe señalar que la recuperación en la rata es superior a la observada en humanos, incluso cuando las condiciones no son las óptimas.

Como ejemplo de este comportamiento motor, mostramos, a continuación, los resultados obtenidos por un animal en cada una de las pruebas.

Actividad en campo abierto:

Se observó que los sujetos mostraban confianza de movimientos y que alcanzaban la periferia del círculo en escasos segundos. También subían rampas y salvaban obstáculos sin mayor dificultad (Figura 4). En el grupo de ratas que habían sido intervenidas quirúrgicamente, se observó una actividad similar a la de la rata control. Por ejemplo, en uno de los individuos operados, la deambulación resultó ser de 45 cambios de sección en 2 minutos, vocalizó al ser manipulada y se produjeron excreciones mientras se encontraba en el campo abierto.

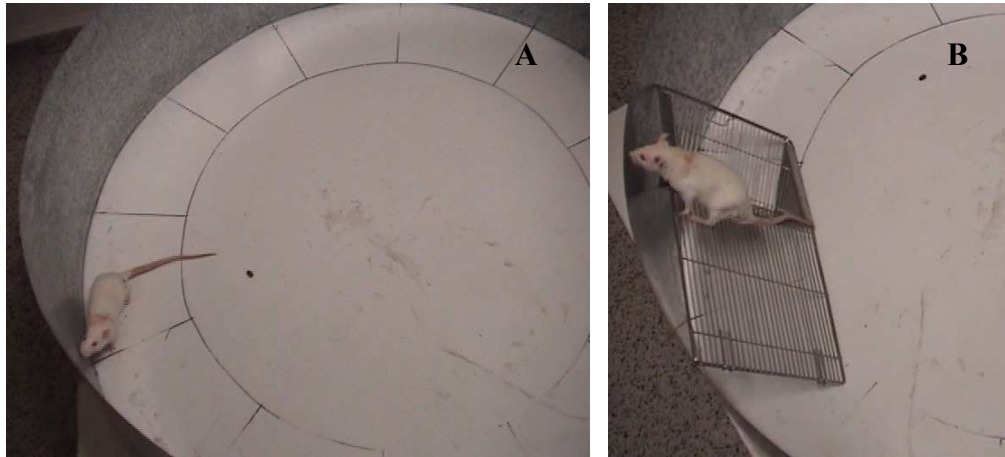


Fig.4. Imágenes tomadas con cámara de vídeo durante la prueba de comportamiento en campo abierto.

“Walking track” e Índice Ciático Funcional:

A partir de las huellas de las extremidades posteriores del “Walking track”, el SFI fue calculado, como se observa en el ejemplo (Figura 5). En aquellos sujetos en los que las EPI no es dañada para tomar implante autólogo, esta extremidad se puede usar como control o extremidad normal y la implantada se toma como experimental. En el caso de este estudio, ambas extremidades resultan dañadas, por lo que el SFI debe calcularse a partir de otros individuos que actúen como control, con una extremidad normal. Se observó modificación en la forma de la huella, tanto en la EPI (donante) como en la EPD (receptora del implante autólogo).

El cálculo del SFI sobre las Figura 5.C. y 5.D. nos da el siguiente resultado: en la EPI, -112.2; en la EPD, -121.4.

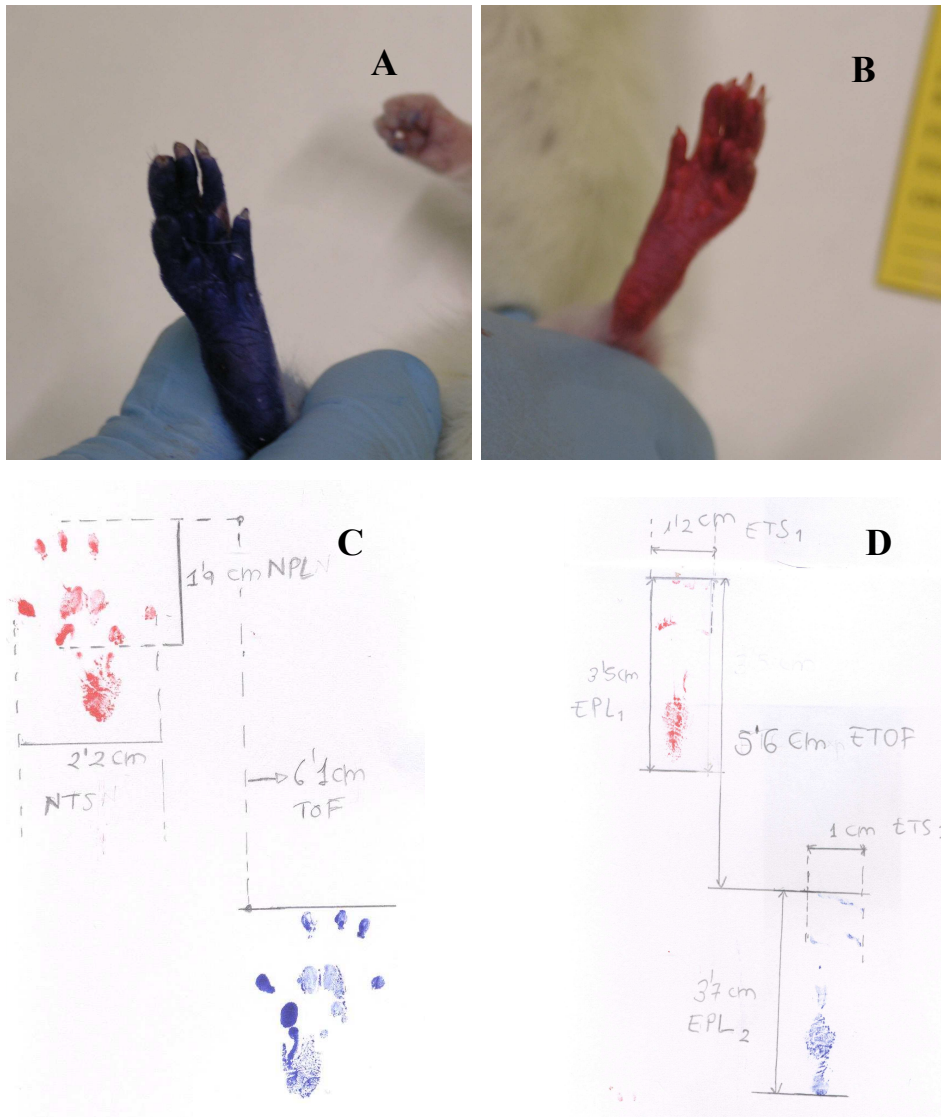


Fig.5. Las imágenes A y B muestran el aspecto de las extremidades en el momento de la impregnación en tinta de tampón. La EPI aparece coloreada de rojo y la EPD de azul. En un animal control, se aprecia que hay mayor apoyo de los dedos y menor del talón (C). A diferencia de la anterior, en un animal intervenido con neurectomía experimental, ambas extremidades muestran mayor apoyo del talón que de los dedos (D). Las medidas tomadas en C y D se emplearon para el cálculo del SFI.

5.3. Preparación de la muestra:

Para realizar el estudio histológico se obtuvieron segmentos del nervio intervenido así como del nervio donante. En el momento de la toma muestras, el

aspecto macroscópico y en observación mediante microscopio estereoscópico, era de buena cohesión del implante tanto con el cabo proximal como con el distal. En el caso del implante con tubo de PLGA, se observó que el tubo mostraba aspecto más blanquecino y era más frágil y quebradizo que en el momento de implantarlo (Figura 6).

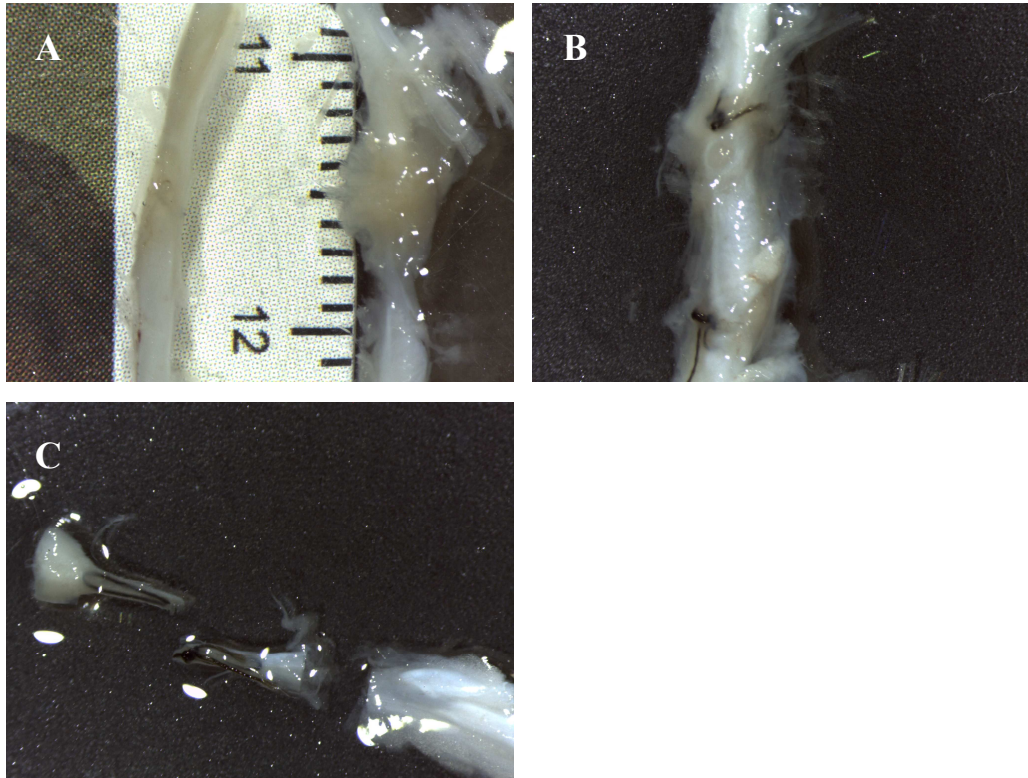


Fig.6. Aspecto de las muestras tras la perfusión con fijador. A: Se observa el trayecto del implante unido al cabo proximal y al distal, con regla de medida (1cm). B: Prótesis tubular, con aspecto blanquecino, muestra pérdida de transparencia y elasticidad. C: imagen del nervio en la extremidad donante, en aquellos individuos en los que se realiza sutura término-terminal.

5.4. Histología:

Las imágenes más representativas obtenidas mediante observación al Microscopio de luz de los cortes histológicos, organizadas de cabo proximal a cabo distal, son las que se describen a continuación.

Nervio normal:

En la rata control, podemos apreciar el aspecto de un nervio normal, tras el procesamiento empleado para conservación y tinción de las muestras. Esta muestra nos servirá como referencia a la hora de evaluar las histomorfología de las demás preparaciones (Figura 7).

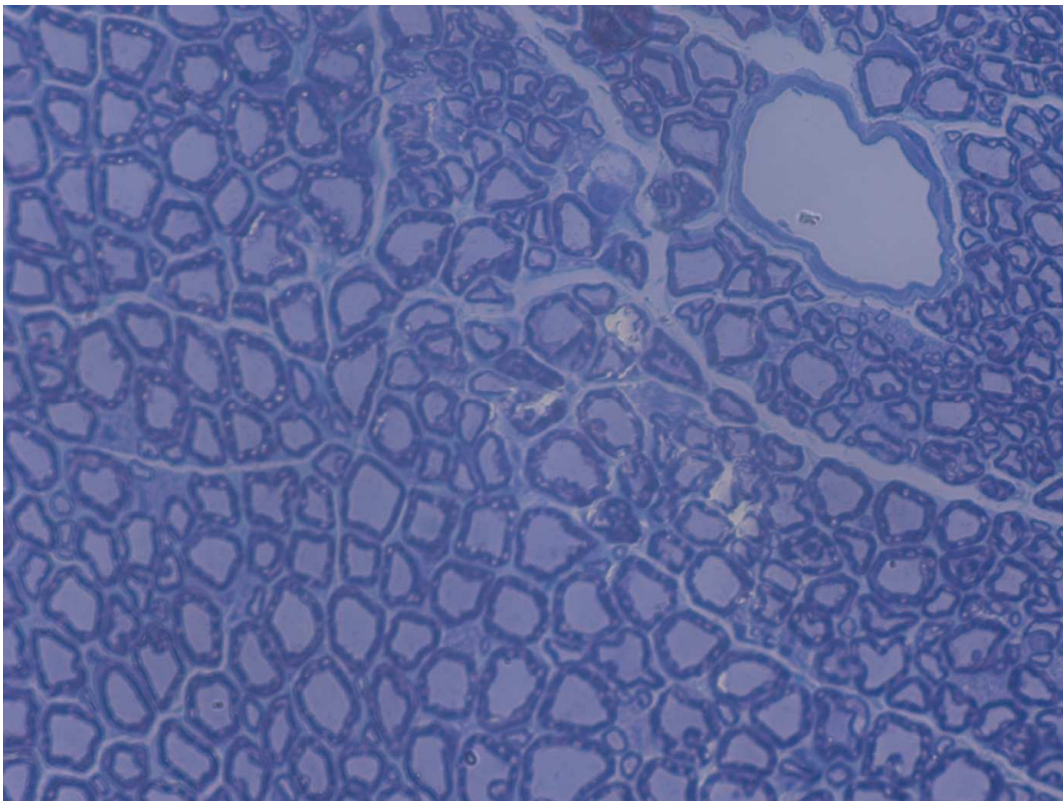


Fig.7. Sección transversal del nervio ciático de la rata control. Tinción con Azul de toluidina. Se observa la estructura del nervio normal, objetivo 40x. Se distingue el endoneuro. La vaina de mielina que rodea a cada axón ha sido parcialmente eliminada por el procesamiento histológico.

Cabo proximal:

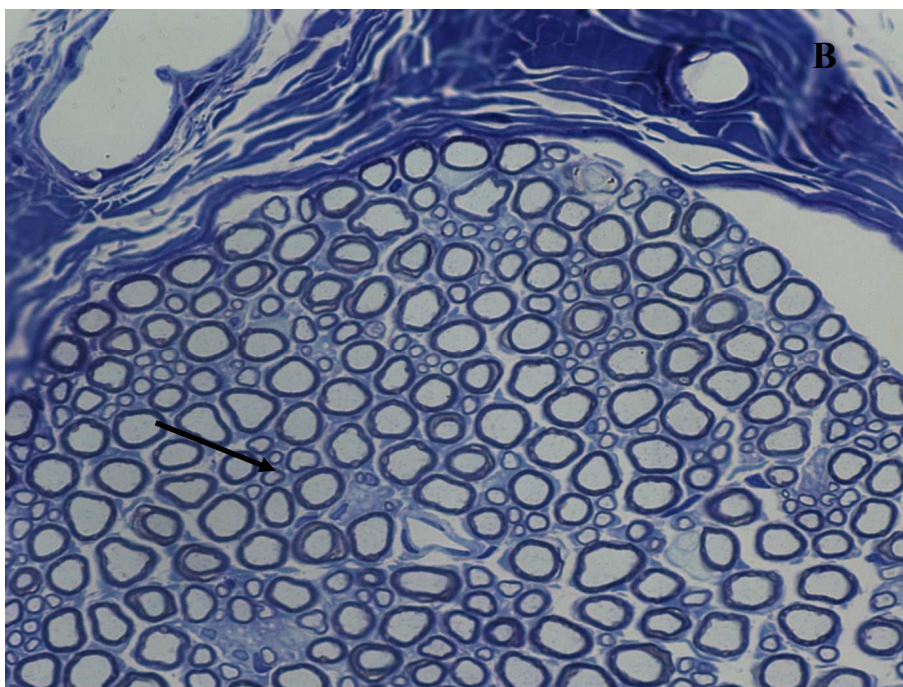
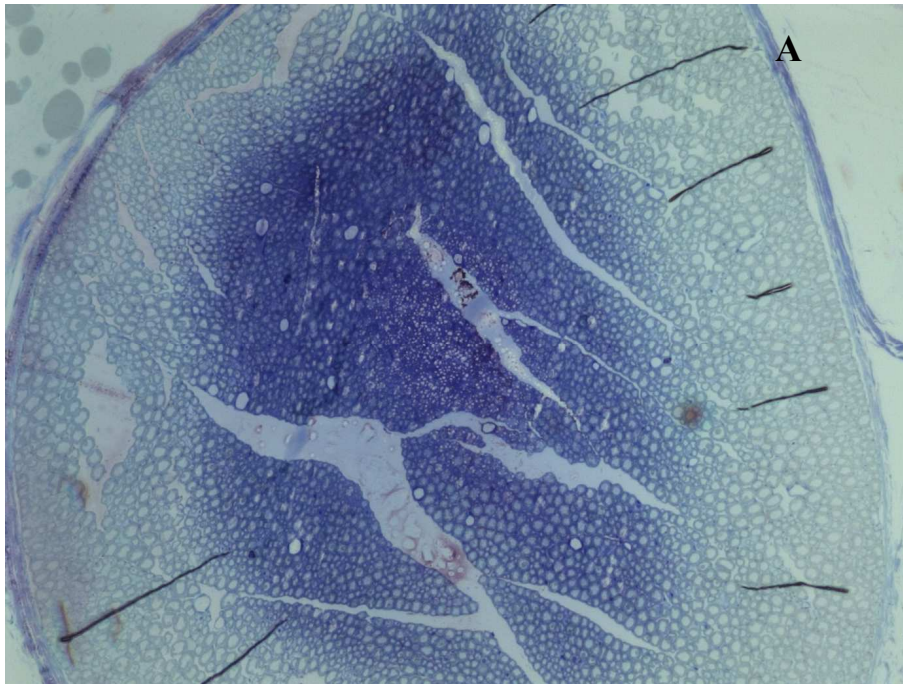


Fig.8. Sección transversal del cabo proximal a las 3 semanas post-intervención. (A) se observa la estructura más similar a la del nervio normal, objetivo 10x. (B) se aprecian fibras mielínicas normales, de mayor tamaño y fibras mielínicas de menor tamaño (flecha), objetivo 40x.

En el cabo proximal, la distribución de las fibras nerviosas se aproxima a la de un nervio normal (Figura 7). El perineuro en el cabo proximal suele aparecer algo engrosado. El epineuro de forma análoga parece prácticamente normal en la región proximal del nervio.

A pequeño aumento el aspecto es de fibras mielínicas de tamaño y disposición relativamente homogénea, similares al nervio normal, aunque a mayores aumentos se distinguen importantes diferencias:

Cerca de la prótesis aunque sin llegar a la misma, ya hay signos de regeneración: axones mielinizados grandes junto a pequeños axones que proceden de retoñamiento del nódulo de Ranvier anterior.

El endoneuro no es muy abundante al igual que en los nervios control normales. Las células de Schwann son más abundantes que en el nervio normal. Estudiándolo con mayor detalle podemos distinguir entre las fibras mielínicas de gran tamaño pequeñas fibras mielínicas rodeadas todas ellas por el citoplasma de las CS (Figura 8).

Prótesis/Implante autólogo:

A medida que avanzamos en el cabo proximal y en el implante, ya sea de nervio autólogo en solitario o unido a prótesis tubular, observamos cambios en la estructura del tejido nervioso.

El perineuro también aparece engrosado. En el endoneuro se aprecia mayor cantidad de células: algunas se identifican con CS.

El implante tiene una morfología más irregular y en sección transversal si distinguen axones mielinizados gruesos de 1 μm . Además, a mayor aumento, se observan grupos de CS con fibras pequeñas y regeneradas (Figura 9).

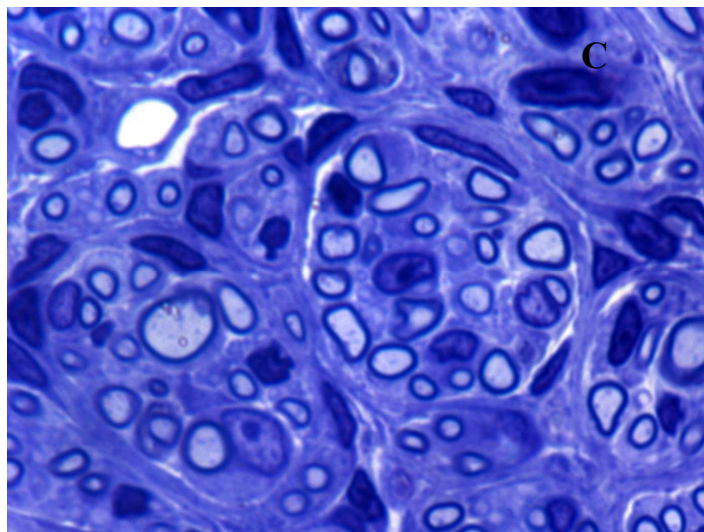
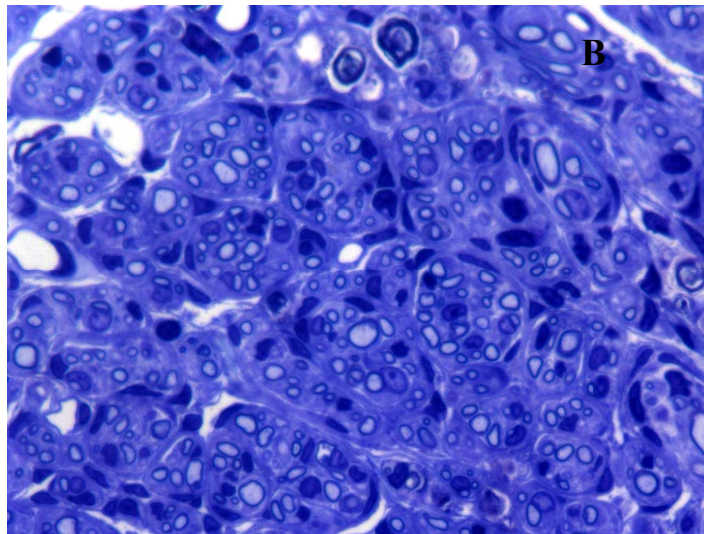
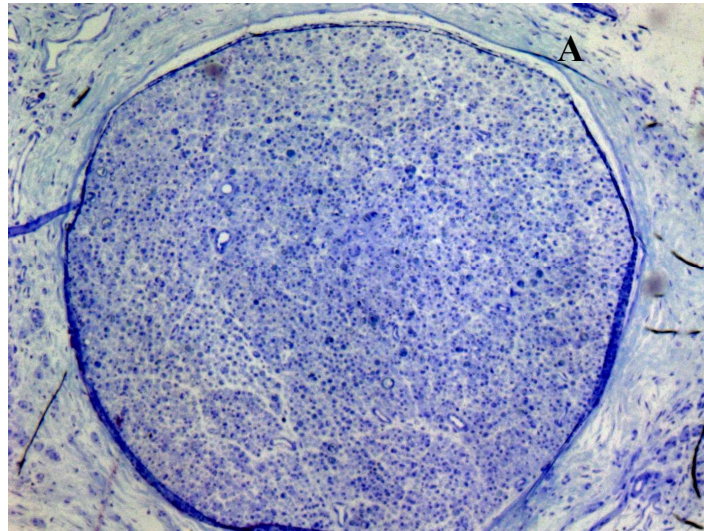


Fig.9. Sección transversal en la zona de implante autólogo, se aprecia la forma circular del nervio, así como el epineuro, perineuro y endoneuro, objetivo 5x (A). Se aprecian unidades de regeneración: grupos de pequeñas fibras nerviosas, CS y células alargadas de tipo endoneural, 40x (B). Unidades de regeneración a mayor aumento, 100x (C).

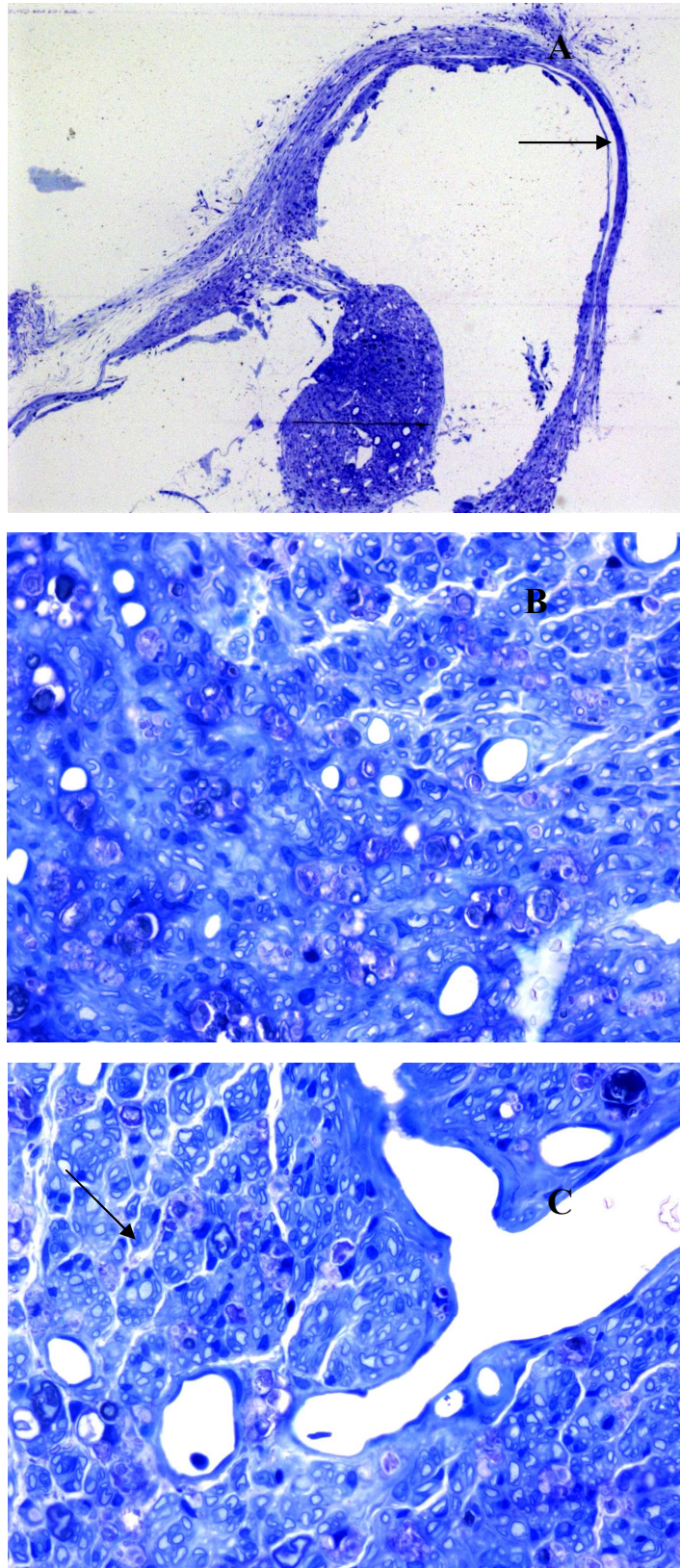


Fig. 10. Sección transversal a nivel de la parte distal del implante de nervio autólogo, en este caso con prótesis tubular. Se distingue la forma del tubo que rodea al implante autólogo (flecha), 5x (A). Se aprecian “bolas” de degeneración y alguna fibra en regeneración (flecha) 40x (B) y (C).

Más distalmente, en el implante autólogo, y también en el implante con prótesis tubular, se observan imágenes que se corresponden con regeneración nerviosa y con degeneración. De manera característica, se aprecian grupos de CS en disposiciones paralelas, lo que se denomina bandas de Büngner, es decir, fibras nerviosas mielínicas de pequeño diámetro y muy numerosas que coexisten con fibras degeneradas procedentes del segmento transplantado (Figura 10)

Cabo distal:

A pequeño aumento se distinguen las ramificaciones del nervio ciático de la rata en este punto (Figura 11.A.)

En general, en el cabo distal, a una distancia de 5-7mm del cabo proximal, ya no se observan los axones mielínicos de pequeño tamaño. De manera que a las 3 semanas tras la intervención la longitud de regeneración de sitúa en unos 6 mm.

Se observan imágenes que se corresponden con degeneración, parecida a la degeneración walleriana. Nuestros datos parecen indicar que en este punto hay menor o ninguna regeneración y menor cantidad de figuras de degeneración (Figura 11).

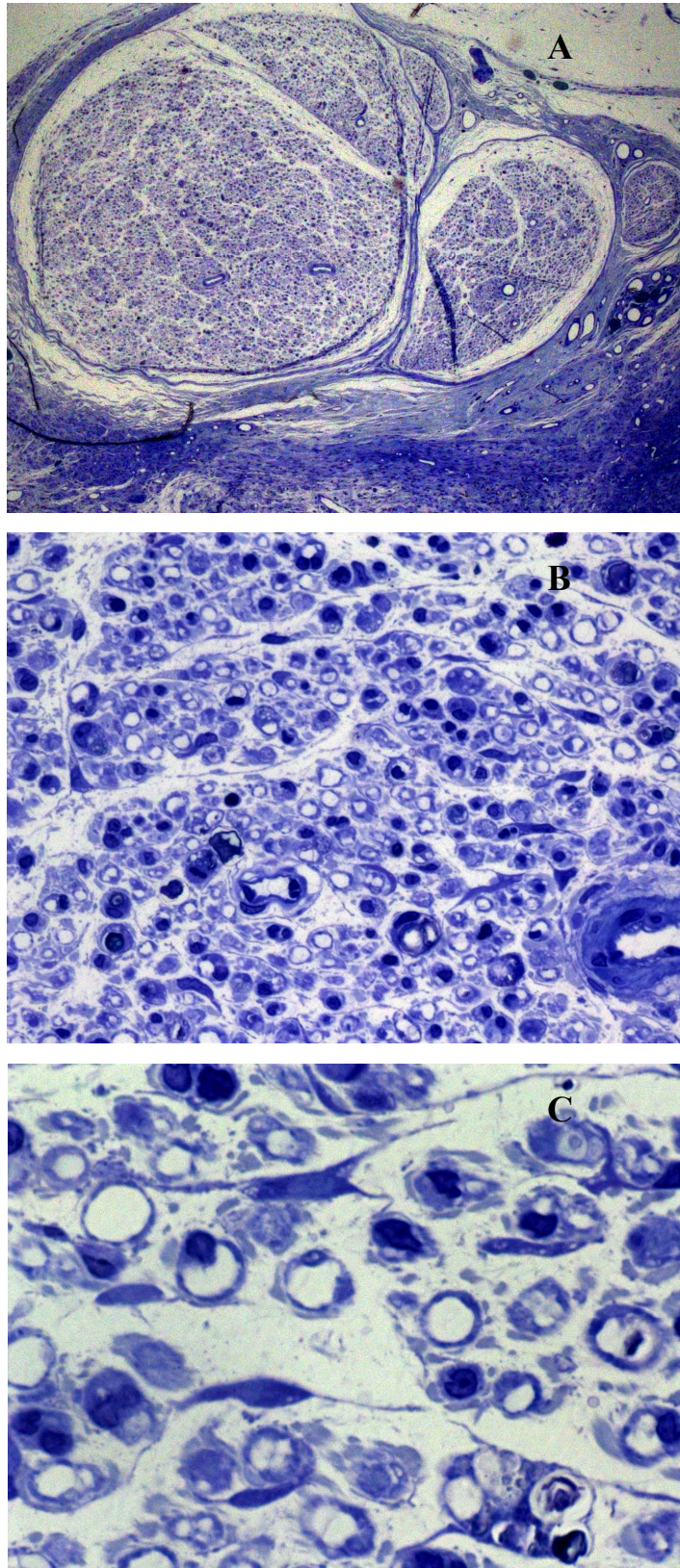


Fig.11. Corte transversal del cabo distal. Objetivo 5x, (A) Ramificaciones del ciático en su parte distal. Objetivo 40x (B) y 100x (C), se aprecia la disminución en la presencia de imágenes de degeneración y de regeneración.

6. Discusión:

Tras la lesión de un nervio periférico, se pueden observar diversos trastornos anatómicos y funcionales graves. La frecuencia de este tipo de lesión se ve incrementada con ciertas tecnologías en las sociedades industrializadas [31].

Uno de los factores cruciales para optimizar la regeneración nerviosa y la recuperación funcional tras una lesión en el sistema nervioso periférico es minimizar el tiempo en el que el nervio en regeneración alcanza su tejido diana. En el músculo, por ejemplo, se produce un descenso progresivo en la capacidad de recuperación proporcional a la duración de la denervación [32].

Hasta el momento, la mejor manera de obtener regeneración nerviosa, cuando no es posible la aproximación de los cabos separados por la sección, es el injerto autólogo. Se basa en la utilización de injertos de nervio sensitivo procedentes del propio paciente para reparar un nervio motor [18]. Por ello, es tan importante tener modelos de referencia con los que poder comparar cualquier nueva técnica alternativa al uso de implantes autólogos.

En este sentido, hemos realizado una serie de experimentos encaminados a la estandarización en nuestro laboratorio de las técnicas propias del denominado “patrón de oro” (Implante autólogo) para poder comparar posteriormente nuevas técnicas y metodologías con el mismo.

Los métodos empleados presentan una serie de ventajas a la hora de llevar a cabo nuestros objetivos. En cuanto a las técnicas microquirúrgicas, favorecen la utilización de un modelo animal en el cual testar los nuevos tratamientos previamente a la traslación de los descubrimientos a la clínica humana. El modelo de neurectomía en la rata está ampliamente respaldado por estudios anteriores [11, 32].

Los métodos histológicos empleados mediante inclusión en epoxi-resina, que es una técnica propia de la preparación de muestras para microscopía

electrónica, permiten no solo una mejor observación de los tejidos con microscopía de luz, sino la posibilidad de analizarlos posteriormente con M.E. de transmisión.

En este estudio, no hemos profundizado en el uso de otras técnicas como inmunohistoquímica, dado que, por el momento, nos ha parecido suficiente con la observación de la morfología de las células mediante la tinción con azul de toluidina.

Por otro lado, las pruebas de evaluación de comportamiento motor realizadas también se encuentran suficientemente establecidas. Aunque otros autores emplean otras diferentes o alguna más de apoyo: electromiografía, medición de la masa muscular, etc. [33,34]. Las pruebas que hemos escogido muestran que hay cierta recuperación funcional en los animales intervenidos. Sin embargo, tendríamos que realizar más experimentos con el propósito de demostrar diferencias estadísticamente significativas en la recuperación de las extremidades implantadas y las no implantadas o control.

En relación con los mecanismos de regeneración y degeneración nerviosa descritos hasta el momento en la literatura científica consultada, y a la vista de los resultados obtenidos en nuestros experimentos, podemos afirmar que en las neurectomías experimentales llevadas a cabo en este estudio y reparadas con implante de nervio autólogo, se cumplen los principios de degeneración y regeneración siguientes: (Figura 12)

En el soma neuronal cuyo axón sufre una lesión se producen las alteraciones siguientes:

1. Cromatólisis: es decir, fragmentación de los corpúsculos de Nissl con la consiguiente disminución de la basofilia citoplasmática.
2. Aumento del volumen del pericarion.
3. Desplazamiento del núcleo hacia la periferia del pericarion.

En lo que se refiere a la fibra nerviosa, hay que diferenciar las alteraciones de la parte que queda unida al cuerpo neuronal de las que tienen lugar en la parte distal, que queda separada de éste y que no tiene forma de reponer sus constituyentes. En la proximidad de la zona de lesión se produce la degeneración del último segmento intermodal de la fibra que queda unida al pericarion (cabo proximal) y puede retoñar para alcanzar su diana fisiológica. Pero el crecimiento de estas fibras neuronales tiene lugar después de que los restos alterados son eliminados por los macrófagos.

En el extremo distal, tanto el axón como la vaina de mielina muestran una degeneración total y son fagocitados por los macrófagos. Al finalizar el procesamiento de estas alteraciones, las CS muestran proliferación formando columnas celulares compactas. Estas columnas sirven de guía para que los axones puedan crecer durante la fase de regeneración.

El segmento proximal de los axones crece y se ramifica formando varios filamentos que progresan en la dirección indicada por las columnas de CS. No obstante, únicamente las fibras que se introducen en el interior de estas columnas tienen posibilidades de alcanzar un órgano efector.

La eficacia funcional de la regeneración depende de que las fibras se introduzcan en el interior de las columnas de CS destinadas a las localizaciones correctas. Por ejemplo, si las fibras sensitivas regeneradas de un nervio mixto ocupan las columnas destinadas a las placas motoras del músculo estriado, no se restablece la función del músculo. La posibilidad de recuperación funcional aumenta debido al hecho de que cada fibra en regeneración da origen a varias prolongaciones, y que de cada columna recibe prolongaciones de varias fibras [1].

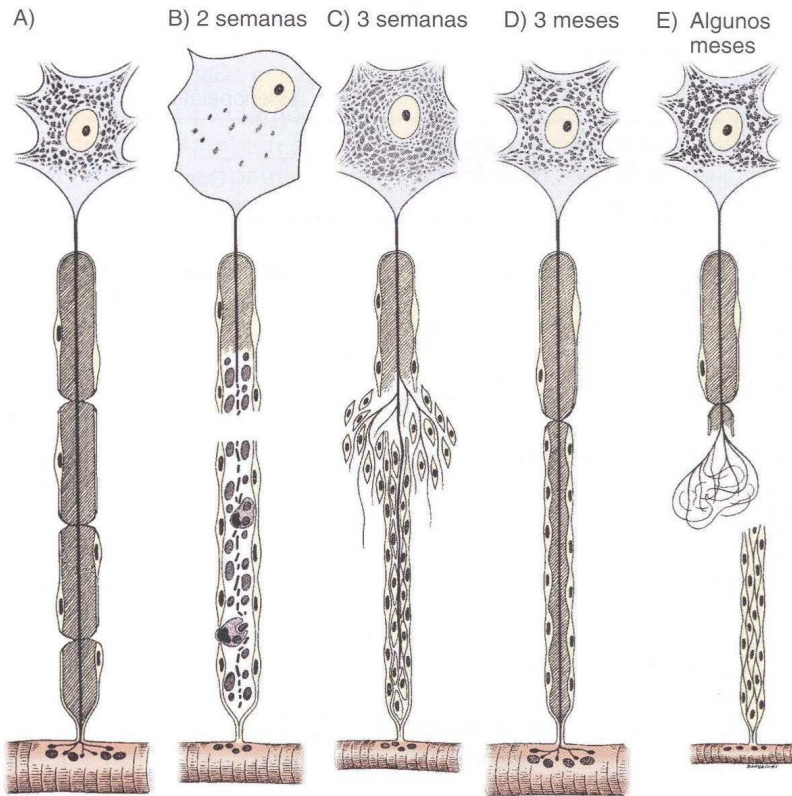


Fig. 12. Representación esquemática de las modificaciones que se pueden producir tras la sección de una fibra nerviosa. Tomado de Junqueira LC et al.: Histología básica, 6ª ed. Masson, 2005. A) Fibra nerviosa normal. B) Tras una lesión la parte distal de la fibra nerviosa muestra degeneración y se produce fragmentación de la mielina, que es fagocitada por los macrófagos. C) La proliferación de las CS da origen a una estructura cilíndrica que ocupan los axones en crecimiento. D) Si la regeneración tiene éxito, la fibra muscular vuelve a presentar su diámetro normal. E) Cuando se pierde la parte distal de un nervio, como ocurre en la amputación de un miembro, las fibras nerviosas crecen formando una estructura nodular muy dolorosa en la extremidad del nervio que se denomina neuroma de amputación.

Nuestras imágenes histológicas muestran presencia de regeneración en el cabo proximal y los primeros tramos del implante autólogo, aunque en pocas ocasiones alcanza el cabo distal. El periodo de supervivencia de 3 semanas es relativamente corto y consideramos que con periodos de supervivencia más prolongados, muchas de las neuritas en regeneración alcanzarían sus metas funcionales.

En los casos en los que se realizó aproximación mediante sutura de los cabos proximal y distal, en la EPI, se apreció unión a nivel macroscópico entre

los extremos, pero las muestras histológicas mostraron que la mayor parte del tejido se trataba de tejido cicatricial. Cierta regeneración podría ser explicada porque en distancias pequeñas, está establecido que la sutura término-terminal es la mejor opción para reparación de lesión nerviosa [3], pero en este caso no sería lo suficientemente pequeña para obtener una reparación adecuada.

Con tan solo un ejemplo de la utilización de una prótesis tubular, no se aprecian diferencias importantes en el grado de regeneración con respecto al implante autólogo en solitario y se precisaría un tamaño muestral mayor para poder decidir si efectivamente hay diferencias o no. Aunque se trata de una metodología compleja desde el punto de vista técnico y quirúrgico, consideramos que esta vía es interesante para continuar este estudio.

Cabe señalar que aunque el apartado de “Resultados” contiene datos originales, no se ha llevado a cabo el análisis estadístico pertinente, siendo comentados los hallazgos de otros autores en aquellas partes en las que nuestros resultados no son suficientes para hacer una valoración.

En estudios previos realizados por otros autores, se realizaron mediciones de la longitud que alcanzan las fibras nerviosas en regeneración, así como la velocidad de la misma, es decir en cuánto tiempo alcanzan dicha longitud. En estos estudios, se lleva a cabo el análisis estadístico sobre las medidas obtenidas y de este análisis se extraen las conclusiones.

Nuestros resultados apuntan a una longitud de regeneración de unos 7 mm en 3 semanas, que si bien no es la velocidad máxima descrita en la literatura, de 1 mm/día [35], es una buena velocidad de regeneración. Aunque en nuestros experimentos iniciales no se alcance la velocidad óptima propia del “gold standard”, si es una velocidad de regeneración suficiente para observar que se atraviesa la primera barrera: paso de las fibras en regeneración del cabo proximal al implante autólogo.

Este retraso en la regeneración de 3-4 días, puede deberse a diferentes factores, que, en un principio son difíciles de controlar: la cirugía es

complicada, en ocasiones se puede producir un mal alineamiento de cabos e implante, el tiempo de regeneración de 3 semanas no es suficiente, etc.

Una menor detección de la regeneración también puede deberse a que no hemos utilizado métodos para detectar fibras nerviosas amielínicas. De todas formas, los resultados iniciales a nivel de histomorfología son positivos. Si bien, como hemos indicado, 3 semanas de espera pueden suponer poco tiempo para observar una recuperación funcional más clara.

Como conclusiones, comentaremos el grado de consecución de los objetivos planteados. Así, el objetivo final del estudio sería llegar a obtener mejoras en la técnica de autoinjerto trasladables a la práctica en cirugía humana. Los objetivos de este Trabajo de Fin de Máster han sido más modestos, circunscribiéndose a realizar la investigación y revisión bibliográfica previa a dicho estudio y al aprendizaje de los métodos experimentales. Además de comprobar en la práctica los hallazgos obtenidos por otros autores hasta el momento, abriendo un campo de investigación con el que poder continuar, por ejemplo, con la realización de la Tesis Doctoral. En este sentido, consideramos que hemos cumplido con el objetivo general y que hemos desarrollado los objetivos concretos planteados.

Las alternativas al implante de nervio autólogo que se consideran para futuras investigaciones se basan en la utilización de algún tipo de prótesis tubular, en la línea de la empleada en uno de los experimentos de este estudio. Además podría ser de gran utilidad la adición de factores de crecimiento específicos de tejido nervioso, cuya liberación se podría regular para una óptima actividad regeneradora [11].

Para finalizar, nos gustaría reiterar la gran importancia socio-sanitaria de estas lesiones, de la que se deriva la relevancia de la investigación en este campo. Una mejor comprensión de los mecanismos de regeneración del sistema nervioso periférico ayudará a resolver los problemas referentes a resolución de lesiones en los nervios periféricos, así como a mejorar la regeneración y

disminuir el tiempo de la misma para una mejor recuperación funcional. Todas estas mejoras incrementarían la calidad de vida de los pacientes y podrían ser aplicadas también en investigación para regeneración del sistema nervioso central.

7. Referencias:

1. Junqueira LC, Carneiro J. Tejido nervioso. En: Histología básica. 6ª edición. Barcelona: Masson; 2005.p. 154-83.
2. Madison RM, Archibald SJ, Kraruo C. Peripheral nerve injury. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. Wound Healing. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p.450-87.
3. Yannas IV, Zhang M, Spilker MH. Standardized criterion to analyze and directly compare various materials and models for peripheral nerve regeneration. *J Biomater Sci Polym.* 2007; 18:943-66.
4. Gluck T. Ueber neuroplastic auf dem wege de transplantation. *Arch Klin Chir.* 1880, 25:606–16.
5. Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1982 Jul;41(4):412-22.
6. Williams LR, Danielsen N, Müller H, Varon S. Exogenous matrix precursors promote functional nerve regeneration across a 15-mm gap within a silicone chamber in the rat. *J Comp Neurol.* 1987 Oct;264(2):284-90.
7. Katayama Y, Montenegro R, Freier T, Midha R, Belkas JS, Shoichet MS. Coil-reinforced hydrogel tubes promote nerve regeneration equivalent to that of nerve autografts. *Biomaterials.* 2006 Jan;27(3):505-18.

8. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Spector M. Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the role of myofibroblasts. *J Comp Neurol*. 2000 Feb 21;417(4):415-30.
9. Choi BH, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Zhu SJ, et al. Microneural anastomosis using cyanoacrylate adhesives. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33:777-80.
10. Hashimoto T, Suzuki Y, Suzuki K, Nakashima T, Tanihara M, Ide C. Review: peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Jun;16(6):503-9.
11. Bellamkonda RV. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3515-8.
12. Nilsson A, Dahlin L, Lundborg G, Kanje M. Graft repair of a peripheral nerve without the sacrifice of a healthy donor nerve by the use of acutely dissociated autologous Schwann cells. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2005;39(1):1-6.
13. Patrick CW, Zheng B, Schmidt M, Herman PS, Chauvin BP, Fan Z, Stark B, Evans GR. Dermal fibroblasts genetically engineered to release nerve growth factor. *Ann Plast Surg*. 2001 Dec;47(6):660-5.
14. Ciardelli G1, Chiono V. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci*. 2006 Jan 5;6(1):13-26.

15. Taylor RS. Epidemiology of refractory neuropathic pain. *Pain Pract.* 2006;6(1): 22-6.
16. Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir.* 2000;40:187-99.
17. Cushing P, Bhalla R, Johnson AM, Rushlow WJ, Meakin SO, Belliveau DJ. Nerve growth factor increases connexin43 phosphorylation and gap junctional intercellular communication. *J Neurosci Res.* 2005;2:788-801.
18. Kang N, Clarke AJ, Nicholson IA, Chard RB. Circulatory arrest for repair of postcoarctation site aneurysm. *Ann Thorac Surg.* 2005;77:2029-33.
19. Brushart TM. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci.* 1988;8:1026-31.
20. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol.* 2010;92:245-76.
21. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 1998;795:44-54.
22. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;10:1346-58.

23. Donoghoe N, Rosson GD, Dellon AL. Reconstruction of the human median nerve in the forearm with the Neurotube. *Microsurgery*. 2007;27:595-600.
24. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*. 2009;39:787-99.
25. Swaim SF. Peripheral nerve surgery in the dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1972;161(8): 905-11.
26. Murai N, Hoshi K, Kang CH, Suzuki M. Effects of Diagnostic Ultrasound Irradiated during Foetal Stage on Emotional and Cognitive Behaviour in Rats. *J exp Med*. 1975;117:225-35.
27. Bervar M. Video analysis of standing – an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. 2000;102(2):109–16.
28. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *PlastReconstr Surg*. 1989;83:129–38.
29. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77:634-43.

30. Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol.* 2009;68(1):1-7.
31. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle nerve.*1990;13:771-84.
32. Finkelstein DI, Dooley PC, Luff AR. Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments. *Muscle Nerve.* 1993;16, 769-77.
33. Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter AD, Rickman SR, Mackinnon SE. Effect of motor versus sensory grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2004;190:347-55.
34. Belkas JS, Munro CA, Soichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restorative Neurol Neurosci.* 2005;23:19-29.
35. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fibre numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve.* 1991;14, 1116-22.