

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**VALORACIÓN FUNCIONAL DE RATAS CON  
ALOINJERTO DE NERVIO DESCELULARIZADO**

**POR  
MAURICIO MANUEL GARCÍA PÉREZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**DICIEMBRE 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**VALORACIÓN FUNCIONAL DE RATAS CON  
ALOINJERTO DE NERVIO DESCELULARIZADO**

**POR  
MAURICIO MANUEL GARCÍA PÉREZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**DICIEMBRE 2016**

# **VALORACIÓN FUNCIONAL DE RATAS CON ALOINJERTO DE NERVIO DESCELULARIZADO**

Aprobación de tesis:

---

**Dr. med. José Félix Vélchez Cavazos**  
Director de Tesis

---

**Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**  
Co-Director de Tesis

---

**Dr. med. Oscar Fernando Mendoza Lemus**  
Miembro de la Comisión de Tesis

---

**Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez**  
Miembro de la Comisión de Tesis

---

**Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña**  
Miembro de la Comisión de Tesis

---

**Dra. med. Raquel Garza Guajardo**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

# **VALORACIÓN FUNCIONAL DE RATAS CON ALOINJERTO DE NERVIOS DESCELULARIZADO**

Por:

**Mauricio Manuel García Pérez**

Este trabajo se realizó en el Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y en los Departamentos de Bioquímica y Medicina Molecular, Anatomía Humana e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Bajo la dirección del Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos y la Co-Dirección de la Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

**Firmas:**

---

**Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos**  
Director de Tesis

---

**Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez**  
Co-Directora de Tesis

## DEDICATORIA

A Dios, que me ha heredado el tesoro más valioso que pudo darme: mis padres.

A mis padres, quiénes sin escatimar esfuerzo alguno, sacrificaron gran parte de su vida para educarme y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

A mi esposa, por su amor, cariño, comprensión y constante estímulo.

A mis hijos, por su paciencia y su comprensión de no estar junto a ellos, gracias a ese amor y esa alegría que me brindan, me dieron la fortaleza necesaria para salir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos**, Profesor del Servicio de Ortopedia y Traumatología y Coordinador del Banco de Huesos y Tejidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL por creer en este proyecto, gracias por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para concretar este trabajo.

A la **Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez**, Jefa del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL por aceptar participar como Co-Directora de mi tesis, por todo su apoyo incondicional y por sentar las bases en el laboratorio de bioquímica para poder realizar este proyecto, haciendo realidad la unión entre departamentos básicos y servicios clínicos en nuestra Facultad.

A los doctores **Dr. med. Oscar Fernando Mendoza Lemus**, **Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez**, y al **Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña** por participar como miembros de mi comisión de tesis y por todos sus consejos y ayuda para la realización de la presente tesis.

Al **Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**, **Dr. C. Adolfo Soto Domínguez**, **Dr. C. Mario Simental Mendia**, **M.C. Gysela G. López Guerra**, **M.C. Azalea Arreola Romero**, **Dr. Rodolfo Morales Ávalos**, **Est. Marina Castillo Galván**

y a la **Est. Lucero Méndez Aguilar** por ser colaboradores y compartir mi interés para realizar el presente estudio.

A todo el personal académico y administrativo que conforma el Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González de la UANL por su constante apoyo, soporte y confianza.

Y a todas aquellas personas que comparten conmigo este triunfo.

**“PER ASPERA AD ASTRA”**

*(A través del esfuerzo hacia las estrellas)*



# TABLA DE CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Índice (tabla de contenido).....	viii
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tablas.....	xx
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Resumen.....	2
Introducción.....	4
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
1.1 Prevalencia de las lesiones nerviosas periféricas.....	7
1.2 Anatomía e Histología del nervio periférico.....	8
1.3 Fisiología del nervio periférico .....	9
1.4 Tipos de lesión nerviosa periférica.....	11
1.4.1 Lesión por compresión.....	11
1.4.2 Lesión por doble aplastamiento.....	11
1.4.3 Lesiones por sección.....	12
1.4.4 Lesiones balísticas.....	12
1.4.5 Lesiones por estiramiento.....	12
1.5 Clasificación de la lesión nerviosa periférica.....	13
1.6 Degeneración Walleriana.....	15
1.6.1 Cambios en el segmento distal.....	16
1.6.2 Cambios en el segmento proximal.....	16

1.7 Regeneración del nervio periférico.....	16
1.8 Recuperación del nervio periférico.....	18
1.8.1 Deficiencias en la recuperación del nervio periférico.....	18
1.9 Investigación del nervio periférico.....	19
1.9.1 Estrategias experimentales <i>in vitro</i> .....	19
1.9.2 Estrategias experimentales <i>in vivo</i> .....	19
<b>CAPÍTULO 2 22</b>	
ANTECEDENTES.....	23
2.0 Panorama General.....	23
2.1 Estudios previos de lesiones nerviosas periféricas.....	25
2.2 Desventajas del uso de autoinjertos de nervios periféricos.....	26
2.3 Aloinjertos cadavéricos.....	26
2.4 Aloinjertos sintéticos.....	27
2.5 Descelularización.....	30
2.6 Aloinjertos descelularizados.....	32
2.7 Métodos de descelularización.....	34
2.7.1 Métodos por congelación.....	37
2.7.2 Descelularización química con detergentes.....	38
2.8 Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% por 15 días.....	41
2.9 Células de Schwann.....	43
2.10 Tejido adiposo y células madre mesenquimales.....	44
2.11 Uso de aloinjertos descelularizados en nervio facial.....	46
2.12 Uso de aloinjertos descelularizados en cirugía de mano.....	47

2.14 Direcciones futuras.....	48
<b>CAPÍTULO 3</b>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
<b>CAPÍTULO 4</b>	
JUSTIFICACIÓN.....	52
<b>CAPÍTULO 5</b>	
ORIGINALIDAD / CONTRIBUCIÓN.....	54
<b>CAPÍTULO 6</b>	
HIPÓTESIS.....	57
6.1 Hipótesis de trabajo.....	58
6.2 Hipótesis nula.....	58
<b>CAPÍTULO 7</b>	
VARIABLES DEL ESTUDIO.....	59
<b>CAPÍTULO 8</b>	
OBJETIVOS.....	61
8.1 Objetivo General.....	62
8.2 Objetivos Específicos.....	62
<b>CAPÍTULO 9</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
9.1 Tipo de estudio.....	64
9.2 Diseño del estudio.....	64
9.3 Consideraciones éticas.....	64
9.4 Fases del Estudio.....	65
9.5 Características y criterios de la población.....	65

9.5.1 Criterios de Inclusión.....	66
9.5.2 Criterios de Exclusión.....	66
9.5.3 Criterios de Eliminación.....	66
9.6 Tamaño de la población y fundamento del cálculo.....	66
9.7 Condiciones de los animales de laboratorio.....	67
9.8 Método de sacrificio de los animales y manejo de los cadáveres.....	67
9.9 Lugar de referencia.....	68
9.10 Estrategia general del estudio.....	69
9.11 Descripción del diseño del estudio.....	70
9.11.1 Descelularización de los nervios ciáticos.....	70
9.11.2 Pruebas histológicas post-descelularización.....	70
a) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E).....	71
b) Tinción Tricrómico de Masson (TCM).....	71
c) Tinción de Klüver-Barrera (K-B).....	72
d) Tinción de Marsland, Glees y Erickson (M-G-E).....	72
e) Inmunohistoquímica.....	73
9.11.3 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo .....	74
9.11.4 Diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.....	75
9.11.5 Recelularización del nervio.....	76
9.11.6 Técnica quirúrgica y generación de los grupos experimentales.....	77

9.11.7 Índice de función ciática.....	81
9.11.8 Evaluación funcional: Medición del índice de función ciática.....	82
9.11.9 Análisis Morfológico y Microdensitométrico.....	85
9.12 Análisis estadístico.....	87
<b>CAPÍTULO 10</b>	
RESULTADOS.....	88
10.1 Resultados de la fase 1.....	89
10.2 Resultados de la fase 2.....	93
10.3 Resultados de la fase 3.....	95
10.4 Resultados de la fase 4.....	95
10.5 Resultados de la fase 5.....	99
10.5.1 Análisis morfológico e inmunohistoquímico.....	99
10.5.2 Análisis microdensitométrico.....	100
<b>CAPÍTULO 11</b>	
DISCUSIÓN.....	107
<b>CAPÍTULO 12</b>	
CONCLUSIONES.....	117
<b>CAPÍTULO 13</b>	
REFERENCIAS.....	119
<b>CAPÍTULO 14</b>	
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	134
<b>CAPÍTULO 15</b>	
ANEXOS.....	137
15.1 Deshidratación de muestras fijadas.....	138
15.1.1 Deshidratación de muestras fijadas.....	138

15.2 Desparafinización y montaje.....	138
15.2.1 Desparafinización de cortes incluidos en parafina.....	138
15.2.2 Deshidratación y montaje de los cortes ya teñidos.....	139
15.3 Preparación de soluciones para la tinción de hematoxilina y eosina	139
15.3.1 Hematoxilina de Gil.....	139
15.3.2 Eosina.....	139
15.3.3 Solución de Alcohol-Ácido (decolorador o decolorante)	140
15.3.4 Solución de Agua Amoniacal (Virador).....	140
15.4 Preparación de soluciones para la tinción de Marsland, Glee y Erickson.....	140
15.4.1 Solución de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 20%.....	140
15.4.2 Solución de $\text{AgNO}_3$ amoniacal.....	140
15.5 Preparación de soluciones para la tinción de tricrómico de Masson.....	140
15.5.1 Solución de Fucsina ácida y escarlata de Biebrich.....	140
15.5.2 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.....	141
15.5.3 Solución de azul de anilina.....	141
15.5.4 Solución acuosa de ácido acético al 1%.....	141
15.6 Preparación de soluciones para la tinción Klüver-Barrera.....	142
15.6.1 Azul de luxol 0.1%.....	142
15.6.2 Violeta de cresilo 0.1%.....	142
15.6.3 Carbonato de litio 0.05% (p/v).....	142

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Ejemplo de una lesión nerviosa periférica producida en la extremidad superior de un paciente adulto.	23
<b>Figura 2.</b> Ejemplo esquemático de la medición del análisis de la marcha realizado sobre el papel de las huellas entintadas de los animales de experimentación.	25
<b>Figura 3.</b> Cortes histológicos de técnicas de descelularización previamente utilizadas para la descelularización de los nervios periféricos.	31
<b>Figura 4.</b> Comparación entre grupos de isoinjertos, aloinjertos procesados con detergentes, injertos sintéticos y aloinjertos procesados por técnicas de congelamiento respecto al número de fibras nerviosa, densidad de las fibras nerviosas y espesor de las fibras.	40
<b>Figura 5.</b> Cortes representativos del método de descelularización previamente descrito por nuestro equipo de trabajo.	42
<b>Figura 6.</b> Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la UANL.	68
<b>Figura 7.</b> Estrategia general utilizada en el presente estudio.	69
<b>Figura 8.</b> Fotografías de una disección de nervio ciático en rata.	78
<b>Figura 9.</b> Fotografías en las que puede apreciarse el procedimiento para la realización del autoinjerto.	79

<b>Figura 10.</b> Fotografías donde puede observarse el procedimiento de implantación del nervio descelularizado y recelularizado como injerto de nervio ciático.	80
<b>Figura 11.</b> Parámetros morfométricos a evaluar en la huella dejada por la extremidad de la rata sobre el papel de pruebas para el cálculo del índice de función ciático.	82
<b>Figura 12.</b> Fórmula matemática elaborada por Bain, Mackinnon and Hunter en 1989 para la obtención del índice de función ciática.	82
<b>Figura 13.</b> Formato de recolección de datos elaborado para el registro de las huellas del animal de experimentación, así como el registro de las mediciones y el índice de función ciática obtenido.	83
<b>Figura 14.</b> Método de marcaje del segmento proximal de las muestras extraídas de los animales de experimentación al finalizar las 16 semanas del estudio.	84
<b>Figura 15.</b> Microfotografía representativa en la que puede evidenciarse la remoción completa del material celular utilizando la técnica de descelularización propuesta por nuestro grupo de trabajo.	89
<b>Figura 16.</b> Detección de mielina en el nervio descelularizado.	90
<b>Figura 17.</b> Detección de colágeno tipo I en el nervio descelularizado.	91
<b>Figura 18.</b> Tinción de M-G-E (A y B) e inmunohistoquímica para NF en el nervio descelularizado (C y D).	92



<b>Figura 19.</b> Caracterización de CMM-TA y drSC y recelularización de un nervio descelularizado con drSC.	94
<b>Figura 20.</b> Patrones de comportamiento del IFC a lo largo de las 16 semanas de observación del estudio.	96
<b>Figura 21.</b> Microfotografías representativas de todos los grupos de experimentación en la totalidad de las tinciones utilizadas en el presente estudio.	100
<b>Figura 22.</b> Cuantificación de la señal de mielina en el cabo proximal.	102
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de la señal de mielina en el cabo dista.	103
<b>Figura 24.</b> Comparación de la señal de mielina en el cabo distal con el estándar de oro	105

# ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Tipos de fibras nerviosas y sus propiedades	10
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de la lesión Nerviosa propuesta por Seddon, Sunderland, Mackinnon y Dellon	14
<b>Tabla 3.</b> Resultados promedio del IFC en los 4 grupos de experimentación durante las 16 semanas del estudio	97
<b>Tabla 4.</b> Comparación estadística entre los resultados promedio obtenidos por los diferentes grupos experimentales entre sí, a lo largo de las 16 semanas de duración del estudio **Diferencias significativas**	98
<b>Tabla 5.</b> Indicaciones, contraindicaciones, ventajas y desventajas del uso de aloinjertos nerviosos	110
<b>Tabla 6.</b> Resultados clínicos de diversos estudios del uso de aloinjertos de nervios descelularizados	113

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>MEC.-</b>	Matriz extracelular
<b>SB-10.-.</b>	Sulfobetaina 10
<b>SB-16.-.</b>	Sulfobetaina 16
<b>IFI.-</b>	Índice de función ciática
<b>TFE.-</b>	Tetrafluoroetileno
<b>PGLA.-</b>	Ácido poliglicólico
<b>PLLA.-</b>	Ácido poliláctico
<b>FDA.-</b>	Administración Federal de Drogas y Alimentos
<b>LNP.-</b>	Lesión nerviosa periférica
<b>MBP.-</b>	Proteína básica de la mielina
<b>MSCs.-</b>	Células mesenquimales del estroma
<b>ARNm.-</b>	Ácido desoxirribonucleico mensajero
<b>CSPGs.-</b>	Proteoglicanos de sulfato de condroitina
<b>BMSCs-</b>	Células madre mesenquimales de la médula ósea
<b>ADSCs.-</b>	Células madre derivadas de tejido adiposo
<b>rpm.-</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBF.-</b>	Suero bovino fetal
<b>ATRA.-</b>	Ácido transretinoico
<b>bFGF.-</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante tipo b.
<b>PDGF-AA.-</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante tipo AA.
<b>drSC.-</b>	Células de Schwann de rata diferenciadas
<b>T-B.-</b>	Tinción de Klüver-Barrera
<b>TCM.-</b>	Tinción Tricrómico de Masson

**M-G-E.-** Tinción de Marsland, Glees y Erickson

**NF.-** Neurofilamentos

**MBP.-** Proteína básica de la mielina

**DAB.-** Diaminobenzidina **PL.-**

Longitud de la huella **TS.-**

Longitud externa

**ITS.-** Longitud interna

**GFAP.-** Proteína ácida fibrilar glial

**CMM-TA.-** Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo

**CMM.-** Células madre mesenquimales

**ANA** Aoinjerto de nervio acelular

# VALORACIÓN FUNCIONAL DE RATAS CON ALOINJERTO DE NERVIO DESCELULARIZADO

Por:

Mauricio Manuel García Pérez

# RESUMEN

# RESUMEN

---

**Alumno:** Dr. Mauricio Manuel García Pérez  
Candidato para el grado de Doctor en Medicina

**Fecha de Graduación:** Diciembre del 2016

**Título del Estudio:** Valoración funcional de ratas con aloinjerto de nervio descelularizado

**Número de Páginas:** 162                      **Área de Estudio:** Cirugía Plástica y Reconstructiva

**Introducción.** A pesar de los recientes avances tecnológicos, la lesión de nervio periférico sigue siendo un problema clínico de relevancia, teniendo una prevalencia de pérdida funcional del 2.8% en los pacientes traumatizados. En los Estados Unidos, se realizan alrededor de 50,000 procedimientos anualmente para reparar nervios periféricos, con un costo anual aproximado de 7 mil millones de dólares. **Objetivo.** El objetivo del presente estudio fue evaluar y comparar mediante métodos morfológicos y funcionales aloinjertos de nervio descelularizado-recelularizado con células de Schwann y autoinjertos de nervio periférico en un modelo animal de rata Wistar. **Materiales y Métodos.** El estudio consistió en 5 fases: 1) Obtención de nervios ciáticos descelularizados mediante la aplicación del protocolo de descelularización química con Triton X-100 al 3% y Desoxicolato de sodio al 4% durante 15 días; 2) Recelularización nervios ciáticos *in vitro* con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata diferenciadas a células de Schwann; 3) Realización de los autoinjertos y trasplante de los nervios descelularizados y recelularizados en un modelo de rata Wistar; 4) Evaluación de la funcionalidad de los grupos experimentales mediante la aplicación del índice de función ciática; y 5) Evaluación de los grupos de estudio mediante un análisis morfológico inmunohistoquímico y microdensitométrico. **Resultados.** Al realizar el análisis entre grupos de manera individual mediante pruebas de t student de dos colas para variables independientes, fue posible evidenciar diferencias significativas al comparar los resultados promedio. Al comparar los resultados promedio, obtenidos en la señal de mielina por el grupo descelularizado y recelularizado, contra su extremidad control contralateral en el segmento de nervio proximal se evidenciaron diferencias significativas ( $p=0.01$  para el grupo descelularizado y  $p=0.003$  para el grupo recelularizado), así como en los grupos autoinjerto y descelularizado ( $p=0.001$  y  $p=0.002$ ) para el segmento distal del nervio, mientras que en el grupo recelularizado, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que indica que se ha alcanzado una remielinización completa. **Conclusiones.** El análisis morfológico demostró una mayor intensidad de señal de mielina en el grupo recelularizado, al compararlo con el grupo autoinjerto y descelularizado. A las 16 semanas no existió diferencia en este parámetro entre la extremidad control y la extremidad experimental del grupo recelularizado. Las pruebas funcionales arrojaron diferencias significativas a las 16 semanas en el IFC entre el grupo recelularizado y los grupos autoinjerto y descelularizado.

**Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos**    **Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez**  
Director de Tesis    Co-Director de Tesis

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

Las lesiones de los nervios periféricos son frecuentes, con una prevalencia entre el 0.3 y 3.7%. Su pronóstico se ha transformado gracias a los progresos de la microcirugía. Sin embargo, se debe reconocer la dificultad del tratamiento secundario y la posibilidad de que se produzcan secuelas funcionales. La macro y la microanatomía del nervio periférico son elementos indispensables que se deben tener en cuenta para comprender estas lesiones. La degeneración walleriana, que se conoce desde hace más de medio siglo, aún es motivo de discusión en cuanto a sus fenómenos biológicos.

Las lesiones nerviosas agudas tienen como etiología común traumatismo previo en la mayor parte de los casos. Son lesiones graves, que no comprometen la viabilidad de la extremidad afectada, pero si pueden comprometer la funcionalidad del miembro y limitar las actividades del sujeto que las sufre, generando en un porcentaje elevado de casos, una minusvalía física que se asocia a una serie de secuelas psicológicas no sólo por las limitaciones del sujeto, sino también por el dolor crónico que a veces perdura en estos pacientes.

En este momento existen un gran número de investigaciones destinadas a la implementación de nuevas técnicas de tratamiento para el manejo de las lesiones nerviosas periféricas, este trabajo tiene como objetivo contribuir al desarrollo de estas técnicas.

# CAPÍTULO 1

## Marco teórico

- 1.1 Prevalencia de las lesiones nerviosas periféricas
- 1.2 Anatomía e histología del nervio periférico
- 1.3 Fisiología del nervio periférico
- 1.4 Tipos de lesión de nervio periférico
  - 1.4.1 Lesión por compresión
  - 1.4.2 Lesión por doble aplastamiento
  - 1.4.3 Lesiones por sección
  - 1.4.4 Lesiones balísticas
  - 1.4.5 Lesiones por estiramiento
- 1.5 Clasificación de lesiones de nervio periférico
- 1.6 Degeneración Walleriana
  - 1.6.1 Cambios en el segmento distal
  - 1.6.2 Cambios en el segmento proximal
- 1.7 Regeneración del nervio periférico
- 1.8 Recuperación del nervio periférico
  - 1.8.1 Deficiencias en la recuperación del nervio periférico
- 1.9 Investigación del nervio periférico
  - 1.9.1 Estrategias experimentales *in vitro*
  - 1.9.2 Estrategias experimentales *in vivo*

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Prevalencia de las lesiones nerviosas periféricas

Alrededor de 29 mil estadounidenses sufren algún daño de nervio periférico al año; siendo la primera causa traumatismo. Esto tiene un costo anual de aproximadamente 7mil millones de dólares en este país (Evans, 2001). Las lesiones traumáticas de nervio periférico tienen una prevalencia entre el 1.3 y 2.8%. Estas lesiones ocurren usualmente en edad productiva, lo que produce pérdidas económicas relacionadas al tiempo de recuperación, incluso resultando en incapacidades permanentes; se relaciona con trabajadores en actividades elementales y de soporte, menores de edad y personas sin ocupación. La extremidad superior representa la localización con mayor frecuencia de lesión de nervio periférico (LNP), siendo las lesiones de plexo braquial y el nervio cubital las más comunes. En Estados Unidos y Canadá, la principal causa de LNP son los accidentes automovilísticos (26-46%); en cambio, en otros países como México, las lesiones por arma blanca representan el principal mecanismo (61%) (Castillo-Galván *et al.*, 2014).

## **1.2 Anatomía e histología del nervio periférico**

El cerebro y la médula espinal están conectados a los órganos blanco por medio de el sistema nervioso periférico, que está compuesto de nervios motores, sensitivos y autónomos. Las neuronas eferentes (motores y autónomos) reciben señales a través de sus dendritas del sistema nervioso central, principalmente usando el neurotransmisor acetilcolina. Las neuronas aferentes (sensitivas) reciben sus señales a través células especializadas, como los corpúsculos de Pacini (Menorca et al., 2013).

Un nervio está compuesto por fibras conductoras y tejido conjuntivo de sostén (Wavreille et al., 2011). El cuerpo neuronal (soma celular) se encuentra en la médula espinal y las extensiones citoplasmáticas de gran longitud, llamadas axones, se dirigen a un órgano diana lejano. Estos axones se agrupan en fascículos (unidades funcionales del nervio) y están rodeados por capas de tejido conectivo (endoneuro, perineuro y epineuro) definiendo estas la anatomía del nervio (Grinsell y Keating, 2014). Las células de Schwann revisten las fibras nerviosas. Las fibras nerviosas y los fascículos presentan una disposición ondulada que permite su deslizamiento. Dos redes vasculares recorren el nervio: extra e intrafascicular, alimentadas por arterias segmentarias que cubren ampliamente todos los territorios nerviosos periféricos (Wavreille et al., 2011).

### 1.3 Fisiología del nervio periférico

La homeostasis del entorno neuronal interno, al igual que el de todas las células, es regulada por interacciones hidroelectrolíticas (Grinsell y Keating, 2014). Los flujos intracelulares anterógrados (rápidos: 50-400 mm/día y lentos: 0.2-8 mm/día) y retrógrados rápidos (200-300 mm/día) permiten transportar distintas sustancias a lo largo de las fibras nerviosas. La conducción nerviosa es un fenómeno iónico de despolarización eléctrica, donde entran en juego canales de sodio y potasio (Wavreille et al., 2011).

La conducción nerviosa se realiza lentamente sobre una fibra no mielinizada y de forma rápida sobre una fibra mielinizada (de nódulo de Ranvier a nódulo de Ranvier). La señal está codificada temporal y espacialmente (Wavreille et al., 2011). La mielina mejora la velocidad de conducción mediante la limitación de los sitios de transferencia iónica a lo largo del axón. Las fibras más fuertemente mielinizadas son las neuronas motoras grandes, seguido de las neuronas aferentes sensitivas. (Menorca et al., 2013). La tabla 1 muestra los tipos de fibras nerviosas y sus propiedades de conducción y ubicación topográfica.

Clasificación de fibra	Mielina	Diámetro (mm)	Velocidad de conducción (m/s)	Cordón espinal	Localización	Función
<b>A alfa</b>	+	6-22	30-120	Columna Ipsilateral Dorsal	Eferente a los músculos	Motor
<b>A beta</b>	+	6-22	30-120	Tracto espinotalámico contralateral	Aferente desde la piel y articulaciones	Táctil. Propiocepción
<b>A gamma</b>	+	3-8	15-35	Columna Ipsilateral dorsal	Eferente de los husos musculares	Tono muscular
<b>A delta</b>	+	1-4	5-30	Tracto espinotalámico contralateral	Nervios sensoriales aferentes	Dolor, frío, temperatura, tacto
<b>B</b>	+	1-3	3-15	Preganglionar	Simpático preganglionar	Varias funciones autónomas
<b>sC</b>	-	0.3-1.3	0.7-1.3	-	Simpático postganglionar	Varias funciones autónomas
<b>dC</b>	-	0.4-1.2	0.1-2.0	Tracto espinotalámico contralateral	Nervios sensoriales aferentes	Varias funciones autónomas, dolor, calor, temperatura, tacto

**Tabla 1.** Tipos de fibras nerviosas y sus propiedades.

## **1.4 Tipos de lesión de nervio periférico**

### *1.4.1 Lesiones por compresión*

Estas lesiones causan un grado de lesión I (neuropraxia), comúnmente ocurren en lugares en donde los nervios pasan a través de aberturas estrechas anatómicas, la mayoría en las extremidades superiores (túnel del carpo, túnel cubital, etc.). La lesión Grado I, se define por la desmielinización focal en el lugar de la compresión y ausencia de daño en tejido conjuntivo o en el axón. Las compresiones pueden ser agudas o crónicas. La compresión aguda, como se ve en la mononeuropatía radial, son comúnmente adquiridos tras una noche de compresión externa y por lo general se presentan con parestesia transitoria, entumecimiento y caída de la muñeca. La recuperación completa del nervio comprimido de forma aguda puede variar desde semanas a meses. En contraste, las compresiones crónicas, como se ve en el síndrome del túnel del carpo, empeoran progresivamente y representan condiciones que persisten sin una intervención terapéutica adecuada. Los síntomas pueden comenzar con parestesia y entumecimiento distal, pero a diferencia de las compresiones agudas, a menudo progresa con el tiempo a debilidad y pérdida de masa muscular (Menorca et. al., 2013).

### *1.4.2 Lesiones por doble aplastamiento*

Se refiere al aumento de la susceptibilidad de un nervio para desarrollar una neuropatía compresiva cuando se encuentra una lesión compresiva proximal del mismo nervio. La morfología de la lesión es idéntica a las lesiones observadas en

la compresión crónica, con el efecto aditivo único de presentar múltiples sitios de compresión (Menorca et. al., 2013).

#### *1.4.3 Lesiones por sección*

Causan diferentes grados de daño neuronal que se pueden representar por cualquiera de los esquemas descritos por Seddon y Sunderland , son comúnmente conocidas como neurotmesis o lesión nerviosa grado V, son causadas por una interrupción completa del nervio, comúnmente debido a un desgarro de un cuchillo, arma de fuego o fragmento de vidrio (Menorca et. al., 2013).

#### *1.4.4 Lesiones balísticas*

Son un caso especial de lesión, que tiende a combinar tanto la transección y aplastamiento del nervio por la onda de choque que se mueve a través del tejido, tras el paso de la bala (Menorca et al., 2013).

#### *1.4.5 Lesiones por estiramiento*

Son el tipo más común de lesión, se presentan cuando las fuerzas de tracción exceden la capacidad del nervio para estirarse. El ejemplo más común es la lesión del plexo braquial relacionada con el parto o en fracturas de extremidades en los puntos donde los nervios y el hueso están en estrecha aproximación (nervio axilar, nervio radial, nervio tibial, nervio cubital, etc.) (Burnett y Zager, 2004)



## 1.5 Clasificación de la lesión nerviosa periférica

El éxito de la reparación de los nervios periféricos depende de la extensión de la lesión, el tiempo de evolución, la técnica utilizada y la habilidad del cirujano que la atiende. Clínicamente un sistema útil de clasificación de estas lesiones se ha desarrollado y nos permite correlacionar los cambios microscópicos que ocurren después de la lesión del nervio con la sintomatología del paciente (Burnett y Zager, 2004). Las clasificaciones de mayor aceptación son las desarrolladas por Seddon y Sunderland (Seddon, 1943; Sunderland, 1978).

En 1943, Seddon fue el primero en clasificar las lesiones nerviosas en tres categorías en función de la presencia de desmielinización y la extensión del daño a los axones y los tejidos conectivos del nervio. La forma más leve de lesión se denomina *neuropraxia* y es definida por la desmielinización focal del nervio sin daño a los axones o el tejido conectivo. La neuropraxia se produce normalmente a partir de compresión suave o tracción del nervio y resulta en una disminución de la velocidad de conducción. El siguiente nivel es llamado *axonotmesis*, el cual implica un daño directo a los axones, además de desmielinización focal, pero manteniendo la continuidad de los tejidos conectivos del nervio. La forma más grave de lesión se llama *neurotmesis*, que es una transección completa de los axones y el tejido conectivo, en esta se observa una discontinuidad completa del nervio. En 1978 Sunderland expandió esta clasificación para distinguir el alcance de los daños en el tejido conectivo. Su esquema de clasificación va el grado I al grado V que corresponden a neuropraxia y neurotmesis respectivamente en la clasificación de Seddon. Sin embargo, los grados II a IV corresponden a variedades de axonotmesis

con cantidades crecientes de daño en el tejido conectivo. El grado II, se observa daño al axón sin existir daño en el tejido conectivo; el grado III implica daño al endoneuro y el grado IV incluye daños en el perineuro. El grado VI de lesión se introdujo más tarde por Mackinnon y Dellon para denotar combinaciones de lesiones de los grados III a V a lo largo de un nervio dañado. (Menorca RM et. al., 2013). La tabla 2 resume la clasificación de la lesión nerviosa establecida por estos autores.

<b>Seddon</b>	<b>Sunderland</b>	<b>Lesión</b>
<b>Neuropraxia</b>	Grado I	Desmielinización focal y segmentaria
<b>Axonotmesis</b>	Grado II	Lesión del axón con endoneuro intacto
<b>Axonotmesis</b>	Grado III	Lesión del axón y el endoneuro con el perineuro intacto
<b>Axonotmesis</b>	Grado IV	Lesión del axón, endoneuro, perineuro con epineuro intacto
<b>Neurotmesis</b>	Grado V	Sección nerviosa completa
	Grado VI (Mackinnon, Dellon)	Lesions mixtas a lo largo del nervio

**Tabla 2.** Clasificación de la lesión Nerviosa propuesta por Seddon, Sunderland, Mackinnon y Dellon.

## 1.6 Degeneración Walleriana

Antes de la regeneración de las fibras nerviosas ocurre una serie de procesos degenerativos, los cuales son preludios directos a la regeneración. El éxito de la regeneración depende en gran medida de la gravedad de la lesión inicial y de los cambios degenerativos. Los cambios patológicos son leves o ausentes en las lesiones de primer grado donde el mecanismo de bloqueo de la conducción es solo leve y no hay una verdadera degeneración. En las lesiones de segundo grado (axonotmesis) hay pocos cambios histológicos en la parte proximal a la lesión; sin embargo, en el segmento distal a la lesión, se inicia un proceso mediado por el calcio conocido como degeneración Walleriana (o anterógrada). En la degeneración Walleriana el cambio histológico primario implica la fragmentación física de los axones; lo cual ocurre en las primeras 48 a 96 horas después de la lesión, esto implica que la conducción de los impulsos nerviosos no sea posible. La desintegración de mielina, está muy avanzada entre las 36 a 48 horas posteriores a la lesión. Las células de Schwann desempeñan un papel clave en la degeneración Walleriana, estas se activan dentro de las primeras 24 horas posteriores a la lesión con un aumento en la tasa mitótica; esto con la finalidad de ayudar en el proceso de degeneración y reparación al eliminar restos de mielina junto a los macrófagos, estos fagocitan y limpian el lugar de la lesión, proceso que requiere al menos de una semana a varios meses (Burnett y Zager, 2004).

Durante las etapas iniciales, los tubos endoneurales pueden edematizarse en respuesta al trauma. El trauma vascular local conduce a hemorragia y edema, lo

que da lugar a una inflamación vigorosa. Los fibroblastos proliferan y producen tejido cicatricial interfascicular (Burnett y Zager, 2004)

#### *1.6.1 Cambios en el segmento distal*

Los cambios axonales en el extremo distal del nervio seccionado finalmente conducen a la ruptura del muñón del nervio, para dar paso a una nueva regeneración axonal. El sello distintivo de esta fase es la desintegración granular del citoesqueleto. Esto se produce después de la llegada repentina de iones extracelulares, principalmente calcio y sodio, lo que conduce a una cascada de eventos que se asemejan a la apoptosis, que sirven para reclutar macrófagos utilizando señales elaboradas a partir de células de Schwann (Menorca et al., 2013).

#### *1.6.2 Cambios en el segmento proximal*

Los cambios en el muñón proximal varían en función de la localización de la lesión con relación al cuerpo neuronal y la gravedad de la lesión. La desintegración del muñón proximal es limitada y progresa típicamente sólo al primer nodo de Ranvier. Sin embargo, si el lugar de lesión es muy cerca del cuerpo neuronal, se puede producir apoptosis. En lesiones graves, la porción proximal del nervio se someterá a cromatólisis (Menorca et. al., 2013).

### **1.7 Regeneración del nervio periférico**

En lesiones severas, la regeneración nerviosa comienza sólo después de la degeneración Walleriana. Para las lesiones de primer y segundo grado, la restauración de la función es la regla, a través de la inversión del bloqueo de la

conducción, la recuperación funcional, morfológica y fisiológica es completa en los primeros grados de lesión (Burnett y Zager, 2004).

La recuperación después de una lesión nerviosa compleja implica una serie de pasos, cada uno de los cuales pueden retrasar o disminuir el proceso regenerativo. La secuencia de la regeneración puede dividirse en zonas anatómicas: 1) el cuerpo celular neuronal; 2) el segmento entre el cuerpo celular y el sitio de la lesión; 3) el sitio de la lesión; 4) el segmento distal entre el sitio de la lesión y el órgano final y 5) el propio órgano terminal (Burnett y Zager, 2004).

La regeneración y la fase de reparación pueden durar muchos meses. Los primeros signos de esta fase son cambios visibles en el cuerpo celular, que indican la reversión del proceso de cromatólisis. El núcleo regresa al centro de la célula y sus nucleoproteínas se reorganizan. La cromatólisis anuncia un cambio fundamental en la función de las células de la transmisión sináptica. El axoplasma sirve para regenerar la punta del axón, que surge desde el segmento proximal y el cuerpo celular (Burnett y Zager, 2004).

El humano tiene la capacidad de iniciar una respuesta regenerativa persistente, durante al menos 12 meses después de la lesión primaria. Los primeros signos de nuevo crecimiento axonal pueden observarse 24 horas después de la lesión. El cono de crecimiento del axón es especializado, contiene filopodios que se adhieren a la lámina basal de la célula de Schwann y la utiliza como una guía. El desarrollo axonal y la maduración es abortada si el órgano final pierde su función, debido a la

denervación prolongada. Las fibras musculares se atrofian con bastante rapidez; hasta un 70% en 2 meses (Burnett y Zager, 2004).

## **1.8 Recuperación del nervio periférico**

La tasa de regeneración axonal es de 1 a 2 mm por día. Hasta el momento, no se han ideado métodos terapéuticos para acelerar este ritmo de regeneración. El período de ventana aceptado para lograr la reinervación muscular es de 12-18 meses, a fin de lograr la recuperación funcional antes de volverse irreversible (Grinsell y Keating, 2014).

### *1.8.1 Deficiencias en la recuperación del nervio periférico*

La reinervación no es sinónimo de la recuperación funcional completa. Los elementos clave de la regeneración son la distancia entre ambos segmentos seccionados, la degeneración Walleriana, la orientación específica del axón y la viabilidad de los órganos diana (Menorca et. al., 2013).

La presencia de un tubo endoneural conduce a un mejor resultado en la regeneración. Así, las lesiones de grado II, que confieren daños en los axones sin ningún daño al tejido conectivo circundante, tiene las condiciones óptimas para el nuevo crecimiento axonal. Las lesiones de grado III y IV sin embargo, no sólo tienen un tubo endoneural perturbado, sino también han aumentado el tejido cicatricial que puede ser un obstáculo considerable para el cono de crecimiento. Mientras más distal es la lesión, más probable es recuperar la función. Las fibras musculares sufren atrofia a las 3 semanas después de la denervación. Sin embargo la

arquitectura de la estructura muscular y la integridad de la placa, se pueden mantener durante 1 año. Después de 2 años, la fibrosis muscular es irreversible. Los órganos sensoriales terminales pueden durar hasta 2-3 años, su función todavía puede recuperarse incluso después de perder la función muscular. (Menorca et. al., 2013).

## **1.9 Investigación del nervio periférico**

### *1.9.1 Estrategias experimentales in vitro*

Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal son los más comúnmente utilizadas en cultivos de células neuronales experimentales. Una línea común de células cultivadas son las de la rata y líneas de células de feocromocitoma (ya que tiene función neuroendocrina y puede ser inducido para diferenciarse en neuronas simpáticas). Los cultivos celulares son comúnmente utilizados para estudios *in vitro* de los efectos directos de fármacos, sustratos y factores de crecimiento en neuronas. El cultivo de células neuronales también ha proporcionado información sobre la dependencia de las células neuronales en un microambiente apropiado para una recuperación óptima. La ingeniería tisular 3D utiliza tejido artificial para estudiar el crecimiento neuronal. Del mismo modo se utilizan señales de contacto para estudiar la trayectoria axonal y orientación a través del tubo endoneural. (Menorca et al., 2013).

### *1.9.2 Estrategias experimentales in vivo*

Los modelos de lesión nerviosa en animales incluyen lesiones por aplastamiento y laceración directa, de este modo pueden semejar lesiones clínicamente relevantes y permitir un mayor estudio molecular y de los procesos celulares involucrados. Los roedores son los animales más utilizados, debido a su bajo costo y distribución similar de troncos nerviosos con los de los seres humanos. El modelo de lesión más común es el del nervio ciático. Aunque las lesiones del nervio ciático en los seres humanos son raras debido a la localización anatómica en lo profundo de la extremidad inferior, el modelo animal proporciona una gran cantidad de información con respecto a la recuperación de los nervios periféricos y particularmente su potencial para la recuperación.



# CAPÍTULO 2

## Antecedentes

2.0 Panorama General

2.1 Estudios previos de lesiones nerviosas periféricas

2.2 Desventajas del uso de autoinjertos de nervio periférico

2.3 Aoinjertos cadavéricos

2.4 Aoinjertos sintéticos

2.5 Descelularización

2.6 Aoinjertos descelularizados

2.7 Métodos de descelularización

2.7.1 Métodos por congelación

2.7.2 Descelularización química con detergentes

2.8 Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% por 15 días

2.9 Células de Schwann

2.10 Tejido adiposo y células madre mesenquimales

2.11 Uso de aoinjertos descelularizados en modelos animales en nervio facial

2.12 Uso de aoinjertos descelularizados en cirugía de mano

2.13 Direcciones futuras

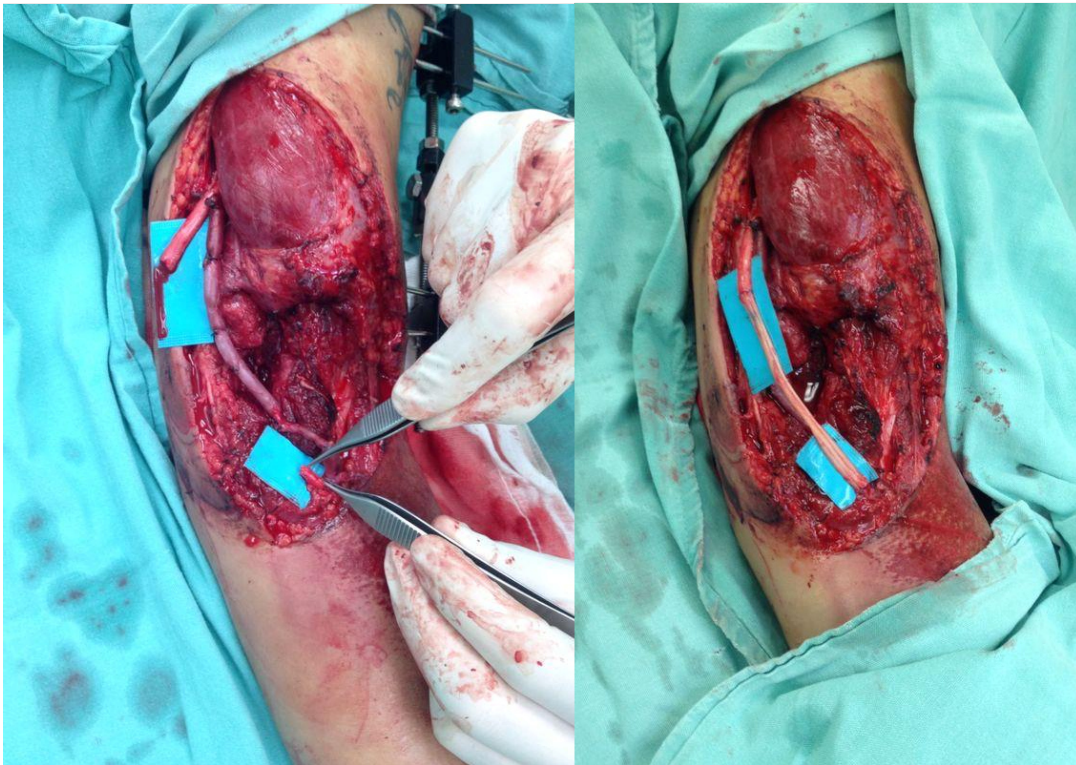
## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.0 Panorama General**

La estructura especializada de un haz de nervios periféricos es esencial para la función sensitiva, motora y autonómica normal. La lesión de nervio periférico resulta en una disfunción neurológica temporal o permanente que puede posteriormente conducir a una discapacidad social o económica de por vida (Moore et al., 2011).

A pesar de los recientes avances tecnológicos, la lesión de nervio periférico sigue siendo un problema clínico de relevancia, teniendo una prevalencia de pérdida funcional del 2.8% en los pacientes traumatizados (Noble et al, 1998). Se realizan alrededor de 50,000 procedimientos anualmente para reparar nervios periféricos, con un costo anual aproximado de 7 mil millones de dólares anuales, solamente en los Estados Unidos (Evans, 2001) (Figura 1).



**Figura 1.** Ejemplo de una lesión nerviosa periférica producida en extremidad superior de un paciente adulto. En la imagen de la izquierda puede observarse el aislamiento quirúrgico de los extremos proximal y distal del nervio lesionado. En la imagen de la derecha puede observarse la colocación de un autoinjerto para la reparación del defecto nervioso.

Las lesiones de nervios periféricos tienen una incidencia entre 13 y 23 personas por cada 100,000 habitantes al año. Las causas más comúnmente reportadas incluyen a los accidentes de tránsito, laceraciones con objetos punzocortantes, fracturas de huesos largos y lesiones deportivas (Asplund et al., 2009). Estas estadísticas pueden estar subestimadas porque solo incluyen las lesiones que llegan al sistema de salud. Las lesiones no traumáticas o las lesiones asociadas a cirugías

abdominales o pélvicas que no son tratadas en un establecimiento de salud, generalmente no son tomadas en cuenta (Asplund et al., 2009).

## **2.1 Estudios previos de lesiones nerviosas periféricas**

Las lesiones de nervios periféricos representan una de las causas más comunes de déficit sensitivo y motor; además de la pérdida de la capacidad productiva en los pacientes adultos (Noble et al., 1998). En casos de defectos simples de los nervios periféricos, se puede obtener una adecuada recuperación funcional mediante la unión quirúrgica de los extremos del nervio. En contraste, la reconstrucción funcional de defectos nerviosos grandes, típicamente requiere el uso de autoinjertos nerviosos de interposición. A pesar de que el uso de autoinjertos representa el tratamiento “gold estándar” para el manejo de las lesiones complejas de nervios periféricos, presentan un gran número de limitaciones (Moore et al., 2011).

La reconstrucción de los nervios periféricos lesionados representa un reto formidable en el campo de la cirugía reconstructiva. Los injertos nerviosos están indicados para la reparación nerviosa, cuando el cierre directo o unión primaria no es posible o cuando existe una pérdida total de un segmento nervioso (Lundborg, 2000). El material más utilizado como puente para la corrección de estos defectos nerviosos es el autoinjerto nervioso (Mackinnon, 1989).

## **2.2 Desventajas del uso de autoinjertos de nervios periféricos**

Aunado a la escasez de estos injertos para su uso, la utilización de nervios autólogos trae consigo una elevada morbilidad en el sitio de extracción, un incremento en el riesgo de infecciones del sitio quirúrgico y tiempos intraoperativos más elevados. Como resultado, se ha generado gran interés en el desarrollo de alternativas efectivas a los autoinjertos nerviosos para el manejo de las lesiones de nervio periférico (Moore et al., 2011). Las desventajas de los autoinjertos nerviosos implican un aumento en el tiempo quirúrgico, una cantidad limitada de sitios para la obtención del autoinjerto, morbilidad en el sitio quirúrgico (dolor, cicatrización, formación de un neuroma y pérdida sensorial en el área donde el autoinjerto es obtenido) (Rappaport et al., 1993).

La morbilidad asociada con el uso de autoinjertos de nervio ha motivado a los investigadores a buscar alternativas a su uso, así como a mejorar el proceso de la regeneración del nervio periférico (Karabekmez et al., 2009). También ha sido reportado que los nervios sensitivos donadores, como el nervio sural, limita la regeneración axonal en comparación con los injertos de nervios mixtos (sensitivos y motores) (Moradzadeh et al., 2008).

## **2.3 Aloinjertos cadavéricos**

Una alternativa a los autoinjertos de nervios es la utilización de aloinjertos frescos cadavéricos. Los aloinjertos tienen la ventaja de estar altamente disponibles y pueden proveer una fuente ilimitada de material para injerto, ofrecen el potencial de

selectividad de tamaño y longitud del injerto. Estos aloinjertos contienen dos características importantes, células de Schwann del donador y una microestructura endoneural, las cuales proveen el mismo nivel de soporte regenerativo que los autoinjertos de nervio con una inmunosupresión adecuada (Mackinnon et al., 2001). La utilización de aloinjertos de donador cadavérico requiere el uso de inmunosupresión sistémica en el paciente por aproximadamente 18 meses. La inmunosupresión permite a los axones y a las células de Schwann regenerarse a través del andamiaje del aloinjerto, pero deja al paciente vulnerable a la aparición de infecciones oportunistas y a la formación de tumores, así como la aparición de intoxicación relacionada a los fármacos utilizados para conseguir la inmunosupresión (Mackinnon et al., 2001). Por estas razones, los aloinjertos de nervios humanos previamente descelularizados se han convertido en una alternativa atractiva, ya que son capaces de actuar temporalmente como un andamiaje viable para la regeneración axonal, eludiendo la necesidad de la utilidad de inmunosupresión (Mackinnon et al., 2001).

#### **2.4 Aloinjertos sintéticos**

Numerosos materiales sintéticos han sido generados para servir como guía para la regeneración axonal posterior a una lesión nerviosa periférica. Estos materiales biosintéticos incluyen polímeros absorbibles y no absorbibles, como la silicona, el tetrafluoroetileno (TFE), el ácido poliglicólico (PGLA) y el ácido poliláctico (PLLA) han sido usados en ensayos en roedores y en humanos (Kim et al., 2000). Debido a la falta de biocompatibilidad de estos materiales biosintéticos; algunos materiales derivados de la naturaleza como la laminina, fibronectina y el colágeno han sido

utilizados para preparar conductos nerviosos, cuya función consiste en servir como puentes para unir la brecha entre ambos cabos del nervio periférico lesionado al permitir la regeneración axonal (Zhang et al., 2010).

Varios conductos nerviosos sintéticos han sido aprobados por la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA) y comercializados en los Estados Unidos para la restauración de brechas cortas de nervio seccionado. Entre estas se encuentran el Neuolac®, Cultiguide®, Avance® y Salubridge® (Zhang et al., 2010). Aún así, estos conductos nerviosos procesados a partir de biomateriales no contienen ciertas características de regeneración, como lo son la estructura natural de un nervio periférico y los factores de crecimiento, los cuales son necesarios para la elongación axonal. Por ello, el éxito de reparación utilizando estos conductos es limitado cuando la lesión nerviosa es larga (Zhang et al., 2010).

La mayoría de los estudios clínicos han examinado el uso de conductos nerviosos, para la reparación de defectos de nervios sensitivos de 20 milímetros o menos (Heath y Rutkowski, 1998; Meek y Coert, 2002). Weber et al. (2000) reportaron sus resultados después de utilizar conductos nerviosos a base de ácido poliglicólico para el tratamiento de lesiones nerviosas distales a la muñeca. Ellos mostraron una recuperación promedio de 6.8 mm de movimiento en la discriminación de dos puntos, para pacientes bajo reparaciones de 8 mm o mayores. Bushnell et al. (2008) reportaron la eficacia de conductos nerviosos a base de colágeno para la reparación de defectos nerviosos en los dedos. En su estudio, se le dió seguimiento a 12 pacientes por 15 meses, ellos encontraron una recuperación promedio de 6.99 mm

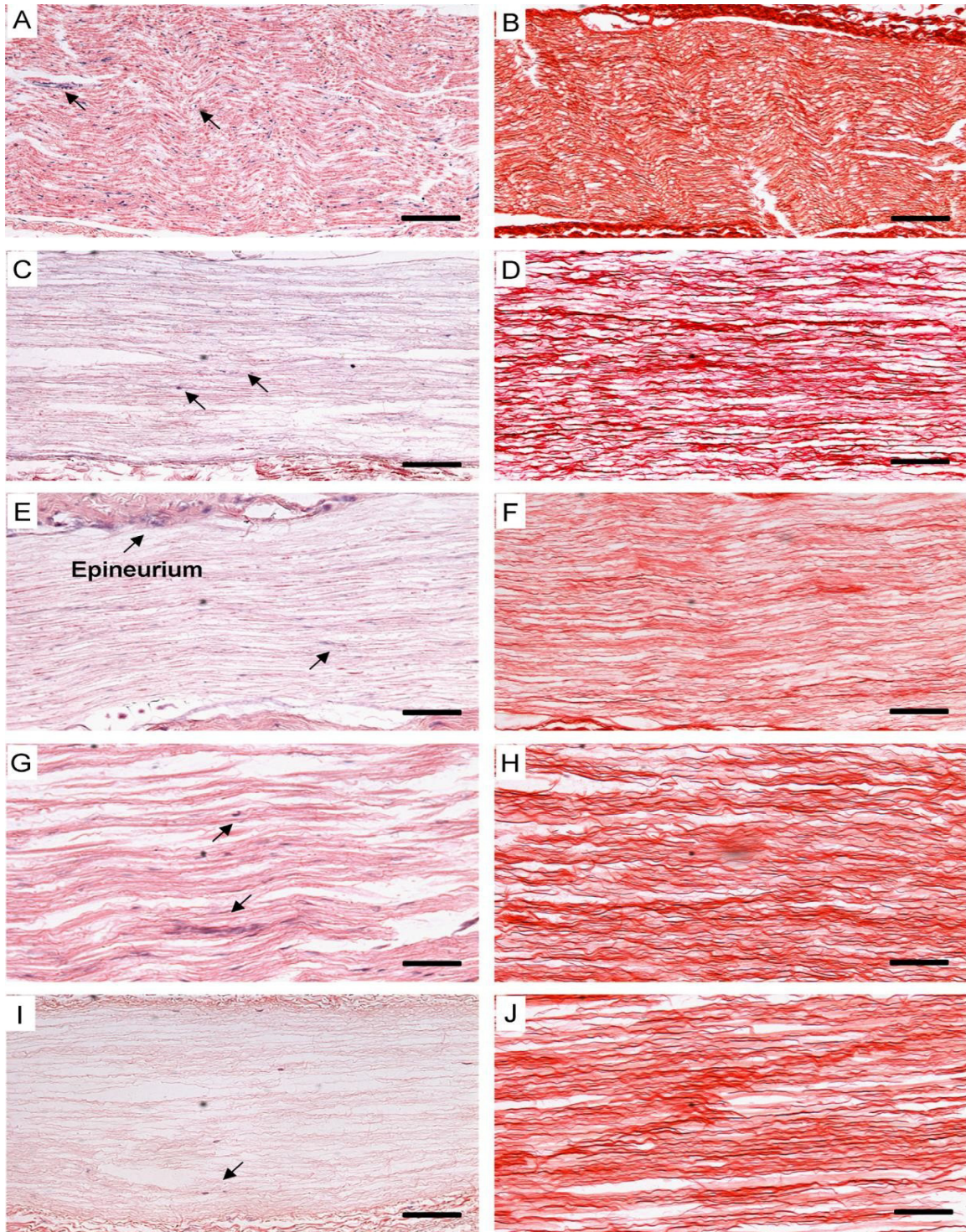
en la discriminación de dos puntos. Los resultados de estos dos estudios son comparables a los obtenidos con el uso de aloinjertos de nervios descelularizados. Whitlock et al. (2009) evaluaron los injertos acelulares sintéticos Avance® (AxoGen, Inc., Alachua, FL, USA) y el conducto nervioso a base de colágeno NeuraGen® (Integra, Plainsboro, NJ, USA) como alternativas clínicas al autoinjerto en un modelo animal de rata (Whitlock et al., 2009). El injerto Avance® es preparado a partir de tejido humano, basado en una versión modificada del injerto acelular optimizado desarrollado en el laboratorio de esos autores (Hudson et al., 2004). Ese estudio comparó la regeneración de defectos del nervio ciático en la rata de 14 y 28 mm, durante un período de 12 y 22 semanas respectivamente. A las 12 semanas, el injerto Avance® superó al conducto NeuraGen®, pero resultó inferior al isoinjerto para ambas longitudes estudiadas. El injerto NeuraGen® falló en promover la inervación del cabo distal del defecto de 28 mm incluso al final de la semana 22 del estudio, mientras que el injerto Avance® si logró promover la inervación del cabo distal del defecto de 28 mm, pero fallo en alcanzar el mismo nivel de regeneración comparado con el isoinjerto (Nagao et al., 2011). La conclusión de este estudio fue la recomendación del uso del injerto Avance® como tratamiento en los defectos menores de 14 mm, pero no en los de 28 mm. Ellos mencionaron que una posibilidad para la falta de regeneración a través del Injerto Avance® en los defectos largos, es que es el resultado de la disrupción de la lámina basal posterior al procesamiento, lo cual es posiblemente resultado del uso de nervio de rata en el proceso de descelularización del injerto Avance®, debido a que este procedimiento ha sido optimizado por la compañía fabricante explícitamente para el tejido humano (Nagao et al., 2011).



## 2.5 Descelularización

La matriz extracelular representa la totalidad de los productos secretados por las células residentes de cada tejido y órgano, se encuentra en un estado de reciprocidad dinámica con estas células nativas en respuesta a los cambios en el microambiente. Ha sido demostrado que la matriz extracelular provee señales que afectan la migración celular, la proliferación y la diferenciación. La preservación de la ultraestructura nativa de la composición de la matriz extracelular durante el proceso de descelularización tisular es altamente deseable. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de descelularización y se han descrito y reconocido más ampliamente los efectos deletéreos *in vivo* del material residual celular. La rápida diversificación de los métodos de descelularización y de las fuentes tisulares, así como la creciente lista de aplicaciones clínicas de los métodos de descelularización, sugiere que estas técnicas deben estudiarse ampliamente (Vorotnikova et al., 2010; Barkan et al., 2010; Nelson y Bissell, 2006; Taylor y Gallo, 2006; Nagase et al., 2006; Werner y Grose, 2003).

Los estudios morfológicos previos han arrojado resultados diversos, en cuanto a la comparación del éxito de la descelularización con los diversos tejidos disponibles (Figura 3).



**Figura 3.** Cortes histológicos de técnicas de descelularización previamente utilizadas para la descelularización de los nervios periféricos, las puntas de flecha corresponden a restos de componentes celulares.

## **2.6 Aoinjertos descelularizados**

La descelularización química de los nervios periféricos, no solo reduce la respuesta inmunológica celular y humoral, como lo es la inmunoreacción hacia células de Schwann y la mielina, sino que también mantiene la estructura interna y los componentes de la matriz extracelular del nervio, los cuales son necesarios para la regeneración nerviosa (Totey y Pal, 2009). Se conoce que los factores neurotróficos favorecen la supervivencia neuronal y la elongación del axón (Yin et al., 1998).

Estudios previos muestran que favoreciendo estos factores alrededor del injerto de nervio acelular, se mejoró la regeneración del nervio (Li et al., 2008). Sin embargo, los resultados de estos estudios permanecen inconstantes, lo que podría atribuirse a dosis inadecuadas, una descarga inicial no deseada de factor en el lugar óptimo, o el uso de un solo factor de crecimiento, en lugar de múltiples factores, como ocurre naturalmente.

El injerto de nervio acelular, provisto de estructura interna y componentes de la matriz extracelular del nervio, es una alternativa al autoinjerto de nervio para la reparación de lesiones nerviosas cortas y ha sido estudiado experimentalmente (Kim et al., 2004). Sin embargo, los resultados parecen inconsistentes (Walsh et al., 2009). Se han realizado diversos esfuerzos para mejorar los resultados de esta técnica.

Las células mesenquimales del estroma (Mesenchymal stromal cells MSCs) son células madre pluripotenciales localizadas en el estroma de la médula ósea y pueden ser fácilmente obtenidas y cultivadas (Phinney et al., 2007). Estudios experimentales han demostrado que las MSCs inyectadas en nervios dañados pueden mejorar el crecimiento y la mielinización de los axones que se están regenerando (Goel et al., 2009; Ribeiro-Resende et al., 2009).

Wang et al. (2008) combinó un injerto alogénico acelular y MSCs de hueso autólogo para la reparación de defectos de nervios periféricos en primates. Las MSCs se inyectaron en toda la longitud del injerto nervioso con un micro-inyector. Los injertos fueron cultivados por 48 horas antes de experimentos *in vivo*. Ellos encontraron que el injerto inyectado con MSCs produjo un ambiente favorable para el crecimiento y la mielinización de los axones en proceso de regeneración.

Los injertos descelularizados produjeron ventajas sobre los conductores nerviosos huecos. Primero, los injertos descelularizados son un producto que es fácil de usar, bien desarrollado, disponible en el mercado y puede ser almacenado y aplicado en operaciones de emergencia. Segundo, mantiene cimientos de tejidos nerviosos a través del procesamiento de tejido nervioso humano combinado con otros procesos.

Las estructuras tridimensionales de cimientos han demostrado una importante regeneración nerviosa puede producir una estructura biológica para la regeneración nerviosa y la migración de células nerviosas sin necesitar la

inmunosupresión. Estudios en los animales han demostrado que los injertos descelularizados de tejido nervioso produjeron más regeneración axonal comparado contra el injerto de nervio fresco con inmunosupresión (Hudson et al., 2004).

Los modelos químicos de aloinjertos de nervios descelularizados se han desarrollado experimentalmente; sin embargo, los datos clínicos de su utilización no han sido ampliamente difundidos (Hudson et al., 2004).

El procesar aloinjertos nerviosos para la remoción de los componentes celulares ofrece un medio atractivo para eludir estas limitaciones al reducir la inmunogenicidad del injerto. Sin embargo, la escasez de las células de Schwann, limita a los aloinjertos acelulares para unir defectos de menos de 3 centímetros. Existe poco consenso acerca de cuál es la técnica de procesamiento que preserva de manera más adecuada la capacidad natural de regeneración del tejido nervioso periférico y maximiza la capacidad funcional de recuperación *in vivo* (Moore et al., 2011).

## **2.7 Métodos de descelularización**

Los métodos de descelularización son: proteoglicanos de sulfato de condroitina (Chondroitin sulfate proteoglycans CSPGs), esterilización por irradiación gamma, la liofilización, la preservación en frío (método de conservación-congelación) y el procesamiento con detergentes (Sondell et al., 1998). A pesar de las diferencias inherentes entre ellos todos estos procesos disponibles tienen como objetivo:

1. Reducir la inmunogenicidad del injerto al eliminar los elementos celulares constituyentes.
2. Incrementar la capacidad regenerativa del injerto a través de la conservación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Hudson et al., 2004).

Hudson et al. (2004) demostraron que los macrófagos son capaces de migrar dentro del andamiaje descelularizado, donde ellos son capaces de producir factores de crecimiento que aceleraran la regeneración del nervio; del mismo modo ellos mostraron que la descelularización química del injerto de nervio, produce axones con una mayor densidad cuando son comparados con isoinjertos frescos en un corte histológico transversal. Otra ventaja de los aloinjertos descelularizados es que mantiene la laminina junto con la matriz de colágeno. La laminina y el colágeno son componentes de la lámina basal y juegan un papel importante en el crecimiento axonal (Hall, 1986). La adición de laminina a los conductos de colágeno ha mostrado mejorar los resultados de los conductos nerviosos huecos en estudios en animales (Matsumoto et al., 2000).

Los nervios descelularizados pueden ofrecer algunas ventajas sobre los conductos nerviosos huecos; una de ellas es que el material descelularizado preserva la configuración y el andamiaje tridimensional de colágeno presente en el tejido nervioso nativo (Hudson et al., 2000). La migración celular y la elongación de las fibras nerviosas requieren una estructura interna y los componentes de la matriz extracelular para permitir la regeneración (Ide et al., 1990; Martini, 1994). Esta estructura tridimensional está ausente en los conductos nerviosos huecos.

Los aloinjertos preparados con detergentes químicos ya están disponibles en el mercado para su uso clínico en humanos. La técnica de preparación de injertos acelulares nerviosos comenzó con Johnson et al. (1982) utilizando nervios humanos preparados y disueltos con detergentes como el Tritón X-100 y el desoxicolato de sodio, esta técnica fue refinada por el grupo de Sondell et al. (1998). Los estudios in vivo en injertos acelulares de 1 centímetro han demostrado que son bien integrados en el huésped, exhibiendo una buena tolerancia inmunológica y soportando la regeneración axonal.

Hudson et al. (2004) optimizaron un protocolo de descelularización química mediante detergentes; en su examinación sistemática morfológica del injerto de nervio ciático acelular, ellos utilizaron una escala histológica gradual de 5 puntos utilizando varios criterios morfológicos de preservación de la matriz extracelular. La integridad de la lámina basal fue superior en el injerto preparado con una nueva combinación de 3 detergentes (Tritón X-200, Sulfobetaina-16, y Sulfobetaina-10) que con los otros dos detergentes previamente utilizados por Sondell et al. (1998).

Estos injertos acelulares optimizados mostraron un potencial de regeneración más fuerte que los previos del protocolo de ese autor. La densidad de los axones fue significativamente más alta en el estudio de Hudson et al. (2004) que en el estudio de Sondell et al. (1998), además de con los injertos tratados con el método de congelación-descongelación.

El grupo Michigan adoptó el protocolo de Sondell et al. (1998) utilizando 5 soluciones incluyendo el detergente Tritón X-100 (Haase et al., 2003). Injertos de nervio peroneo de 2 a 4 cm fueron probadas en un modelo murino. El análisis de las huellas de la marcha durante 4 meses no mostró diferencias significativas entre los injertos acelulares de 2 cm en contra de los autoinjertos. El análisis histológico mostró regeneración a través de los injertos acelulares de 2 cm con un 60% de reducción en la fuerza tetánica isométrica del musculo extensor de los dedos 15 semanas después de la cirugía mientras que el injerto de 4 cm falló en dar soporte apreciable de reinervación del músculo. Los injertos mostraron estar inmunológicamente inactivos. La remoción de escombros celulares no indujo el mismo reclutamiento de macrófagos como la observada durante la degeneración walleriana, diferente a los protocolos que no removían el contenido celular como un tratamiento por el método de congelación-descongelación (Haase et al., 2003).

### *2.7.1 Métodos por congelación*

La preservación de los tejidos donantes mediante congelación prolongada sigue siendo uno de los métodos más estudiados y efectivos para cumplir estas dos metas. Surgida a partir de las técnicas de preservación utilizadas de rutina en los trasplantes de órganos, la preservación por congelamiento de aloinjertos de nervio en una solución desarrollada por la Universidad de Wisconsin a 4 grados centígrados, ha demostrado eliminar efectivamente la antigenicidad de los aloinjertos de nervio periférico y conduce a la completa supresión de la producción de interferón gamma en los linfocitos circulantes después del trasplante (Evans et al., 1999).



La preservación por congelamiento también resulta efectiva en la conservación de la lámina basal de las células de Schwann y en la matriz extracelular, permitiendo una regeneración axonal robusta a través de los aloinjertos acelulares trasplantados. Las aplicaciones clínicas de las técnicas de preservación por congelamiento se han mantenido limitadas debido a los tiempos extensos de procesamiento (alrededor de 7 semanas) y a las pobres propiedades mecánicas de estos injertos acelulares. Como resultado, las técnicas de preservación por congelación se han delimitado primariamente a usos en la investigación científica (Fox et al., 2005).

### *2.7.2 Descelularización química con detergentes*

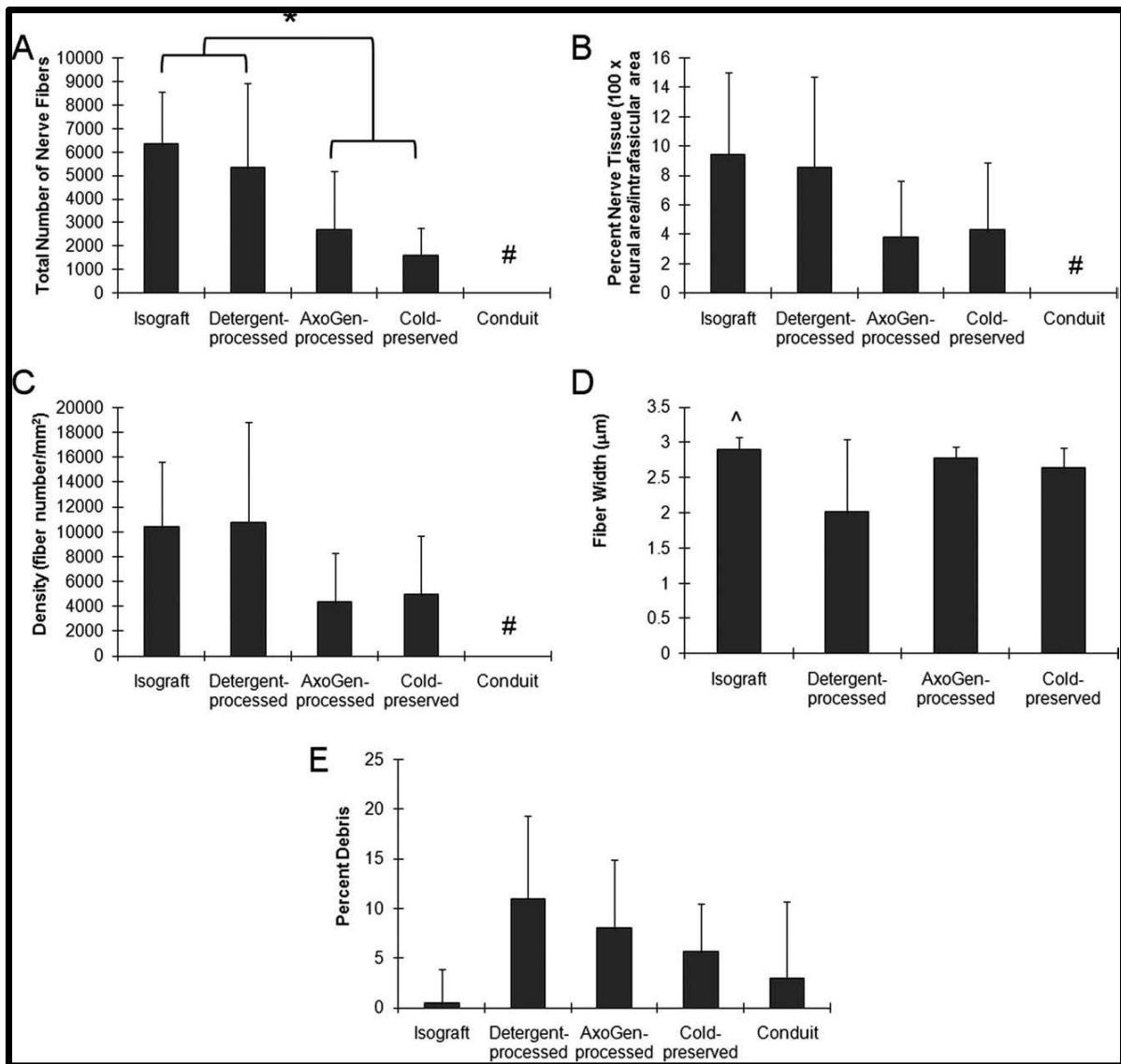
El procesamiento de injertos mediante detergentes es un método alternativo para obtener aloinjertos acelulares de nervio periférico. Las técnicas de procesamiento con detergentes fueron inicialmente desarrolladas en orden de remover de una manera más efectiva los remantes celulares de los nervios donados, evitando los efectos destructivos del proceso de congelación-descongelación sobre la ultraestructura nerviosa (Johnson et al., 1982).

Los primeros protocolos de descelularización mediante detergentes estaban basados en gran medida en el uso de desoxicolato de sodio, Tritón X-100 y agua ionizada para descelularizar injertos nerviosos, estudios más recientes han optimizado el procesamiento con detergentes utilizando tratamientos químicos menos agresivos (Hudson et al., 2004). Especialmente los injertos nerviosos expuestos repetidamente a soluciones de agua ionizada, sulfobetaina 10 (SB-10) y

Triton X-200/ sulfobetaina16 (SB-16) por un período de 4 días, han demostrado superioridad en la preservación de la matriz extracelular nativa y niveles equivalentes de descelularización comparado con técnicas químicas de procesamiento previas (Hudson et al., 2004). Sondell et al. (1998) mostraron que usando una combinación de tritón X-100 y desoxicolato de sodio es posible lograr una descelularización de un nervio ciático de rata de la cepa Sprague–Dawley.

Los aloinjertos procesados utilizando estas técnicas con detergentes han demostrado soportar densidades significativamente mayores de regeneración en comparación con los aloinjertos de nervio procesados mediante descelularización térmica, implantados en modelos animales de lesión del nervio ciático en ratas (Figura 4) (Hudson et al., 2004).

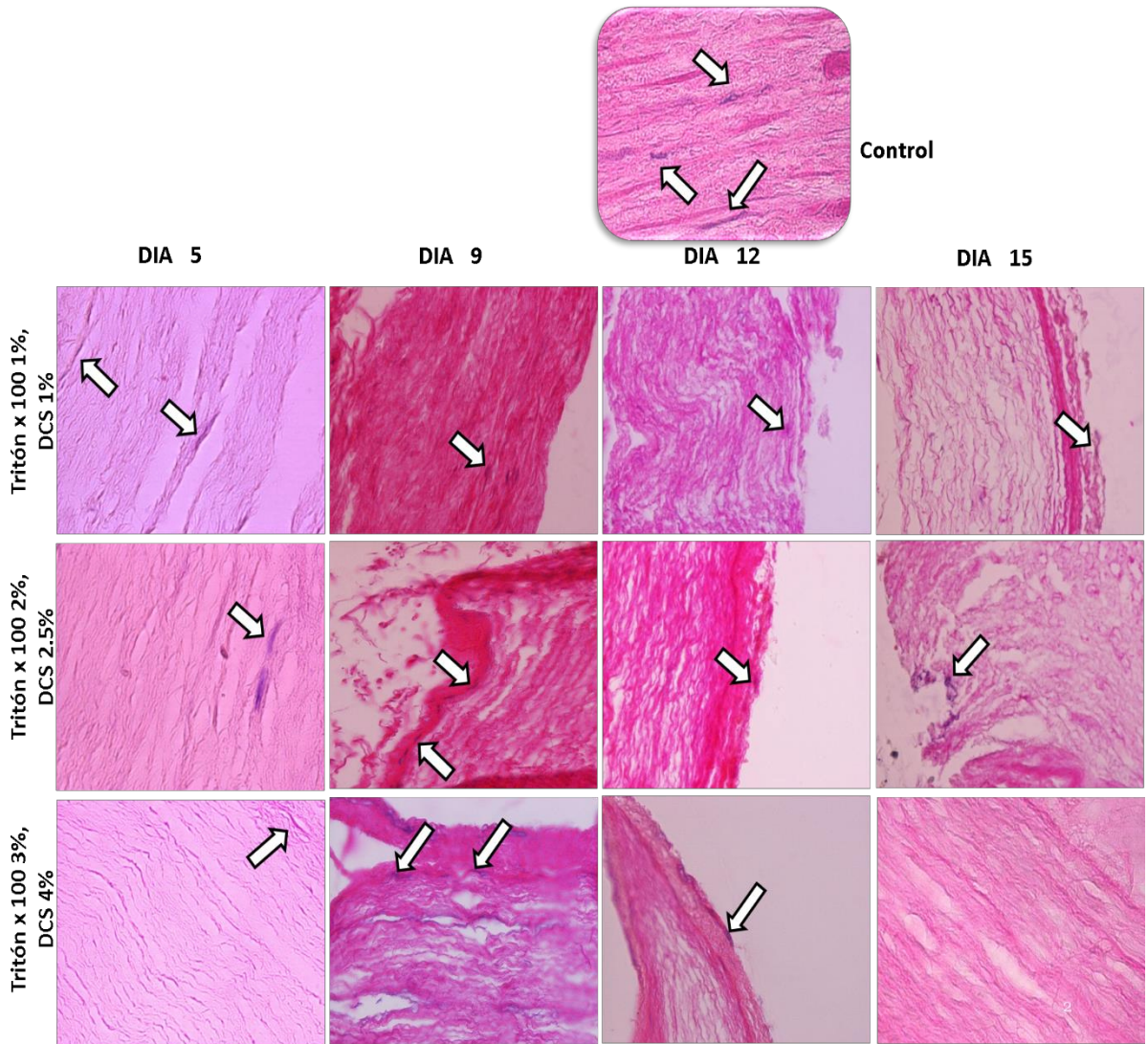
Apesar de los beneficios adicionales sobre las técnicas de preservación en frío estándar, los estudios *in vivo* aún tienen que dilucidar si este modesto aumento en la capacidad regenerativa, facilitado por el procesamiento con detergentes, se traduce en mejoras significativas en la regeneración funcional del nervio y la recuperación después del trasplante (Moore et al., 2011).



**Figura 4.** Comparación entre grupos de isoinjertos, aloinjertos procesados con detergentes, injertos sintéticos y aloinjertos procesados por técnicas de congelamiento, respecto al número de fibras nerviosas, densidad de las fibras nerviosas y espesor de las fibras.

## **2.8 Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% por 15 días**

Un antecedente de nuestro grupo de trabajo demostró que la combinación empleada de estos detergentes para descelularizar (Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% por 15 días), dio mejores resultados que otras combinaciones de estos mismos detergentes durante períodos variables de tiempo, para conseguir la remoción de los componentes celulares en un modelo animal en nervio ciático de rata Wistar. Mediante la tinción de H y E y la inmunohistoquímica para detectar la proteína básica de la mielina (MBP), fue posible comprobar la eliminación total de material celular. El tratamiento con detergentes Tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio 4% durante un período de 15 días, permitió descelularizar y conservar la MEC del nervio en buen estado, para su posterior uso como un aloinjerto eficiente en una LNP en un modelo murino (López-Guerra, 2014) (Figura 5).



**Figura 5.** Cortes representativos del método de descelularización previamente descrito por nuestro equipo de trabajo. Puede observarse en la imagen inferior izquierda la remoción completa de los elementos celulares en el nervio periférico con el uso de Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% durante 15 días. La cual representa la técnica utilizada en la presente tesis para la descelularización de los nervios ciáticos.

## 2.9 Células de Schwann

Las células de Schwann, son un tipo de células gliales presentes en el sistema nervioso periférico, las cuales juegan un papel importante en la regeneración nerviosa. A pesar de que las células de Schwann representan una opción atractiva para el tratamiento de la lesión nerviosa, su aplicación es limitada debido a la morbilidad generada en el sitio de la extracción. Recientemente, se ha identificado que las células madre derivadas de células del tejido adiposo tienen características similares a las células madres mesenquimales provenientes de la médula ósea, las cuales poseen propiedades de diferenciación multipotencial. Las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo también presentan otras ventajas como lo son: 1) su fácil accesibilidad, 2) su rápido crecimiento en los cultivos celulares y 3) su exitosa integración en las células del hospedero sin generar inmunogenicidad (Zhang et al., 2010). Recientes trabajos han encontrado que los conductos nerviosos suplementados con células de Schwann representan una estrategia eficaz para el tratamiento de las lesiones nerviosas. Sin embargo, es difícil obtener un suficiente número de células de Schwann autólogas que exhiban una gran pureza y viabilidad (Rodríguez et al., 2000).

Varias investigaciones han atribuido particular importancia a las células de Schwann de la lámina basal, para el soporte del crecimiento de la regeneración axonal. Los componentes de la lámina basal, tanto en la laminina y la fibronectina han demostrado que estimulan el crecimiento axonal modelos *in vivo* como *in vitro* (Madison et al., 1985).

Respecto al tejido adiposo, Reid et al. (2011) demostraron que las células de Schwann derivadas del tejido adiposo diferenciado, expresan un gran rango de factores neurotróficos intrínsecos. También demostraron que la incorporación de células de Schwann, derivadas tanto de adipocitos como de tejido nervioso hacia el sitio de la reparación aumenta significativamente la expresión de ARNm anti-apoptótico del gen BCL-2 y disminuye la expresión de ARNm proapoptótico para Bax y Caspasa-3 en el ganglio de la raíz posterior y por ende, promueven un efecto neuro-protector (Reid et al., 2011). En un estudio comparativo de reparación del nervio ciático utilizando un conductor de fibrina implantado con diferentes poblaciones celulares, las células de Schwann primarias mostraron mejores resultados comparados con los derivados de tejido adiposo y células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. Sin embargo, estos dos últimos mostraron mejor regeneración axonal que el grupo control no tratado (di Summa et al., 2010). Las células de Schwann derivadas de tejido adiposo también han sido utilizadas en modelos experimentales de parálisis del facial con resultados positivos. Sun et al. (2011) publicaron un estudio de ratas con lesiones del nervio facial que presentaron recuperación funcional y electrofisiológica de las lesiones nerviosas que median 0.8 centímetros.

## **2.10 Tejido adiposo y células madre mesenquimales**

Como estaba reportando anteriormente el músculo esquelético, tendones, venas o arterias, así como injertos descelularizados, han sido utilizados para unir brechas en nervios periféricos. Aunque las células de Schwann son las células de soporte más

importantes del sistema nervioso periférico, es muy difícil conseguir cantidades suficientes de células autólogas en poco tiempo, por lo que sus aplicaciones clínicas son muy limitadas. Las MSCs, son una subpoblación de células madre multipotenciales derivadas de tejido adiposo y la médula ósea; son consideradas una fuente alternativa de células en la regeneración de tejido. La capacidad de las MSCs para diferenciarse en células similares a las células de Schwann y sus efectos nutricios, mejoran las actividades promotoras de la regeneración nerviosa. Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSCs), comparadas con las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs), son un candidato celular superior para el trasplante de células autólogas para promover la regeneración del nervio periférico, ya que pueden ser obtenidas por medio de procesos menos invasivos y cultivados, con tasas más altas de proliferación (di Summa et al., 2010).

En países desarrollados y en vías de desarrollo, la fase de expansión global del tejido adiposo supera la fase de regresión, lo que resulta en una sociedad con una prevalencia de obesidad más elevada. Para el manejo del peso extra, un gran número de pacientes se ha sometido a cirugías para remover el tejido graso no deseado. Sin embargo, el tejido graso removido representa un tesoro terapéutico en potencia por dos razones: Uno es que el tejido adiposo representa una fuente rica en células mesenquimales multipotentes llamadas células madre derivadas del tejido adiposo y la otra es que la matriz extracelular del tejido adiposo pueden ser convertida en andamiajes acelulares para la ingeniería genética (Lin et al., 2010; Zuk et al., 2010).



En relación a las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, se ha observado que estas células pueden diferenciarse en células de Schwann, encargadas de formar la vaina de mielina de los axones y se han utilizado para servir como conductos nerviosos para la reparación de nervios periféricos. En adición, se ha demostrado que las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, secretan factores neurotróficos que promueven la regeneración nerviosa (Albersen et al., 2010).

### **2.11 Uso de aloinjertos descelularizados en modelos animales en nervio facial**

En el estudio realizado por Sun et al. (2011) ellos fabricaron un conducto arterial alogénico descelularizado y lo combinaron con células madre autólogas derivadas del tejido adiposo, para puentear una brecha de 8 milímetros en la rama bucal del nervio facial de rata. Después de un período de 8 semanas de recuperación, ellos demostraron que el conducto arterial descelularizado sirve con un andamiaje que no produce inmunogenicidad para soportar y guiar la regeneración axonal a través de la brecha nerviosa hacia la reinervación funcional de los músculos de los bigotes. Sus experimentos sugirieron que la adición de células madre al trasplante es beneficioso, al promover la regeneración del nervio facial a través del conducto arterial descelularizado.

## **2.12 Uso de aloinjertos descelularizados en cirugía de mano**

El estudio de Karabekmez et al. (2009) fue el primero en mostrar la eficacia clínica de los aloinjertos de nervio descelularizado, en el tratamiento de defectos sensoriales en la mano de hasta 3 centímetros. La conclusión del estudio fue que los aloinjertos de nervio descelularizado son capaces de restituir adecuadamente la función sensitiva en defectos nerviosos entre 0.5 a 3 centímetros, sin casos de infección o rechazo. La descelularización de aloinjertos de nervio periférico provee otra opción para el tratamiento de lesiones nerviosas segmentarias de hasta 3 centímetros. El artículo también menciona que son requeridos una mayor cantidad de estudios comparativos aleatorizados, para determinar la eficacia de estos aloinjertos, en comparación con los conductos nerviosos a base de colágeno y los autoinjertos de nervio periférico (Karabekmez et al., 2009).

En la serie clínica más larga de aloinjertos publicada hasta el momento, Brooks et al. (2012) publicó el primer reporte multicéntrico de 25 cirujanos. Se incluyeron 76 nervios en 59 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio. Aunque faltara grupo control, el grupo de estudio estaba compuesto por nervios sensitivos (49), mixtos (18) y motores (9). Aproximadamente el 87% de los injertos que median entre 5 y 50 mm, tuvieron una recuperación significativa utilizando la prueba de discriminación entre dos puntos, monofilamentos y pruebas motoras. Los injertos fueron bien tolerados sin evidencia de rechazo, aunque 5% de los injertos requirieron revisión. Fue interesante que la longitud del injerto, el tiempo de reparación, la edad del sujeto, el tipo de fibra nerviosa y el mecanismo de la lesión

no modificaron la recuperación significativamente entre los grupo cohorte (Broks et al., 2012).

### **2.13 Direcciones futuras**

Todavía no existe un estudio de comparación comprensiva entre todos los protocolos de descelularización utilizando el mismo modelo animal, nervio, longitud del injerto, tiempo de seguimiento y los datos más relevantes de desarrollo y medidas de los resultados funcionales. La evaluación de la longitud del injerto fue examinada extensamente a través de estudios de congelación-descongelación, utilizando animales pequeños y grandes, incluyendo ratones, ratas, conejos, perros y simios. Los esfuerzos de investigación más concentrados establecieron que el potencial regenerativo de injertos acelulares en nervios ciáticos de ratas era de 2 cm. Los investigadores escogieron su tiempo de seguimiento basado en el modelo animal, la longitud del injerto, y la medición del progreso de la regeneración. Esto varió ampliamente entre los estudios (Gulati et al., 1990).

La precisa evaluación de la capacidad de los aloinjertos, para apoyar la regeneración y recuperación funcional, es necesaria para la translación en pacientes humanos. Actualmente hay pocos estudios al respecto. En relación a investigación de nervio periférico, la evaluación funcional ha proporcionado vasto conocimiento acerca la de las intervenciones y su efectividad (Osawa et al., 1986).

La elección del modelo de lesión nerviosa tiene que ser considerada cuando se aprecia el valor del estudio animal y cuando sacamos inferencias de ellos, como guías para manejo clínico en pacientes humanos. Una vez más, los estudios mencionados anteriormente de injertos descelularizados utilizados en el nervio ciático, demostraron recuperación histomorfométrica favorable del número de axones, mientras que la recuperación de cómo se comportó fue pobre (Osawa et al., 1986).

Los injertos descelularizados tienen gran potencial para mejorar el desenlace después de una lesión severa de nervio periférico. Hasta la fecha más de 5000 injertos Avance® han sido implantados en pacientes alrededor del mundo, y más investigaciones mejorarán los resultados clínicos. Sin embargo, no se ha establecido aún un método por el cual la descelularización es más efectiva cuando se compara bajo condiciones estandarizadas en injertos largos. Proponemos entonces, que se establezcan medidas estandarizadas de resultados para comparar datos entre diferentes estudios más efectivamente. Tal estandarización se seguirá haciendo más relevante mientras los investigadores aplican estrategias basadas en células y otras medicinas regenerativas, a fin de que mejore el potencial del injerto nervioso descelularizado. En el futuro, un ensayo clínico de casos y controles será necesario, donde injertos descelularizados sean comparados con autoinjertos. Este estudio, aunque sea difícil de administrar, va a dar respuesta a los pacientes, científicos y cirujanos a la pregunta de si los aloinjertos se desempeñan de manera comparable a los injertos autólogos en humanos.

# CAPÍTULO 3

## Planteamiento del Problema

## **CAPÍTULO 3**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El uso de autoinjertos es el tratamiento estándar de las lesiones nerviosas periféricas con resultados clínicos satisfactorios. Sin embargo, existen desventajas importantes como son la escasez de estos injertos para su uso; su utilización trae consigo una elevada morbilidad en el sitio de donación, un incremento en el riesgo de infecciones del sitio quirúrgico y tiempos intraoperativos más elevados, dolor, cicatrización, formación de un neuroma y pérdida sensorial en el área de donde el injerto es obtenido.

Como resultado, se ha generado gran interés en el desarrollo de alternativas efectivas a los autoinjertos nerviosos para el manejo de las lesiones de nervio periférico. Ejemplo de ello, es el uso de aloinjertos de origen cadavérico previamente descelularizados con detergentes químicos, para su posterior utilización como conductos nervios en la cirugía de reparación de nervio periférico. La utilización de modelos animales de experimentación representa la tendencia actual para el estudio de este tipo de conductos nerviosos descelularizados.

# CAPÍTULO 4

## Justificación

## **CAPÍTULO 4**

### **JUSTIFICACIÓN**

La incidencia de las lesiones de nervio periférico en los países desarrollados, es estimada entre 13 y 23 por cada 100,000 habitantes al año. A pesar de los avances tecnológicos recientes, las lesiones de nervio periférico siguen siendo de interés clínico, debido a la pérdida funcional existente en el 2.8% de los pacientes con lesiones traumáticas. Al año se realizaran alrededor de 50,000 procedimientos para reparar lesiones de nervio periférico, siendo estas asociadas a un costo anual de 7 billones de dólares solamente en los Estados Unidos.

Los autoinjertos de nervio son considerados el “gold estándar” para la reparación de defectos nerviosos periféricos, sin embargo, a veces existen ciertas limitaciones para su uso, como lo son la disponibilidad del tejido, incompatibilidades de longitud y diámetro, así como deformidades. Menos frecuentemente pueden ser utilizados aloinjertos, con la desventaja de que requieren la administración de fármacos inmunosupresores con resultados menos satisfactorios que los autoinjertos.

La recuperación tras una lesión nerviosa periférica atiende a la necesidad urgente de desarrollar nuevos tratamientos médicos, mejorar la calidad de vida de las personas quienes padecen estas lesiones y ampliar el conocimiento de este evento.



# CAPÍTULO 5

## Originalidad y Contribución

## **CAPÍTULO 5**

### **ORIGINALIDAD Y CONTRIBUCIÓN**

El presente estudio muestra conceptos originales que lo diferencian:

1. Este estudio utilizará una nueva técnica de descelularización y recelularización del nervio ciático, establecida previamente por nuestro grupo de trabajo, la cual consiste en la extracción de los nervios y exposición a Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de Sodio al 4% por 15 días, con la cual se asegura una correcta remoción de los componentes celulares y mantenimiento de los componentes de la matriz extracelular.
2. El seguimiento de los animales involucrados se realizará con injertos y tiempos mayores a los estudiados en trabajos previos; en este estudio realizamos un seguimiento de los sujetos de experimentación durante 16 semanas, los estudios convencionales lo realizan durante 12 semanas.
3. El presente estudio evaluó injertos nerviosos de 15 milímetros, estudios previos han reportado la eficacia de los injertos descelularizados en modelos animales utilizando injertos de 10 mm, la adición de la longitud extra podría tener aplicaciones al trasladarla a un contexto clínico más concreto.

4. El presente estudio evaluó de manera integral a los animales de experimentación mediante pruebas histológicas, inmunohistoquímicas y funcionales.
  
5. En el presente estudio, además de comparar los resultados del grupo en el que se realizó el tratamiento convencional (autoinjerto), se incluyó un grupo de nervios descelularizados y otro de nervios descelularizados, que posteriormente fueron recelularizados con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, lo cual sirvió para comparar entre sí la eficacia de estos tres grupos.

# CAPÍTULO 6

## Hipótesis

## **CAPÍTULO 6**

### **HIPÓTESIS**

Hipótesis de trabajo:

La recuperación funcional y la regeneración nerviosa es significativamente mayor en ratas Wistar trasplantadas con aloinjerto de nervio descelularizado-recelularizado con células de Schwann, comparadas con aquellas tratadas con autoinjerto.

Hipótesis nula:

La recuperación funcional y la regeneración nerviosa no es mayor en ratas Wistar trasplantadas con aloinjerto de nervio descelularizado-recelularizado con células de Schwann, comparadas con aquellas tratadas con autoinjerto.

# CAPÍTULO 7

## Variables del estudio

## **CAPÍTULO 7**

### **VARIABLES DEL ESTUDIO**

1. Nueva técnica de descelularización previamente descrita por nuestro grupo de trabajo.
2. Segmentos nerviosos de una longitud superior a los estudios previos (15 mm).
3. Seguimiento de los sujetos de estudio por un tiempo superior (16 semanas), en comparación a los estudios previos (12 semanas).
4. Existencia de 4 grupos de experimentación para comparar entre sí.
5. Realización de múltiples pruebas morfológicas y funcionales para la evaluación del uso de aloinjertos de nervios descelularizado y recelularizado con células de Schwann.

# CAPÍTULO 8

## Objetivos



## CAPÍTULO 8

### OBJETIVOS

#### **Objetivo General:**

Evaluar y comparar mediante métodos morfológicos y funcionales, aloinjertos de nervio descelularizado-recelularizado con células de Schwann y autoinjertos de nervio periférico en un modelo animal de rata Wistar.

#### **Objetivos Específicos:**

1. Aplicar el método de descelularización de nervios de rata Wistar mediante el detergente Tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por 15 días.
2. Recelularizar nervios *in vitro* con células de Schwann, diferenciadas de células madre mesenquimales, derivadas del tejido adiposo de rata.
3. Realizar los autoinjertos y trasplantar los nervios descelularizados y reelularizados en un modelo quirúrgico animal de rata Wistar.
4. Evaluar la funcionalidad de los grupos experimentales mediante el índice de función ciática.
5. Evaluar los grupos de estudio mediante un análisis morfológico.

# CAPÍTULO 9

## Materiales y Métodos

- 9.1 Tipo de estudio
- 9.2 Diseño del estudio
- 9.3 Consideraciones éticas
- 9.4 Fases del Estudio
- 9.5 Características y criterios de la población
  - 9.5.1 Criterios de Inclusión
  - 9.5.2 Criterios de Exclusión
  - 9.5.3 Criterios de Eliminación
- 9.6 Tamaño de la población y fundamento del cálculo
- 9.7 Condiciones de los animales de laboratorio
- 9.8 Método de sacrificio de los animales y manejo de los cadáveres
- 9.9 Lugar de referencia
- 9.10 Estrategia general del estudio
- 9.11 Descripción del diseño del estudio
  - 9.11.1 Descelularización de los nervios ciáticos
  - 9.11.2 Pruebas histológicas post-descelularización
    - a) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E)
    - b) Tinción Tricrómico de Masson (TCM)
    - c) Tinción de Klüver-Barrera (K-B)
    - d) Tinción de Marsland, Glees y Erickson (M-G-E)
    - e) Inmunohistoquímica
  - 9.11.3 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
  - 9.11.4 Diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.
  - 9.11.5 Recelularización del nervio
  - 9.11.6 Técnica quirúrgica y generación de los grupos experimentales
  - 9.11.7 Índice de función ciática
  - 9.11.8 Evaluación funcional: Medición del índice de función ciática
  - 9.11.9 Análisis Morfológico y Microdensitométrico
- 9.12 Análisis estadístico

# **CAPÍTULO 9**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1 Tipo de estudio**

Ensayo clínico controlado con animales de experimentación de laboratorio.

### **9.2 Diseño del estudio**

Experimental, longitudinal, analítico, comparativo y no ciego.

### **9.3 Consideraciones éticas**

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el comité de Ética en Investigación, Comité de Investigación, Comité de Bioseguridad y CICUAL de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro OR-015. Las ratas fueron manejadas de acuerdo a las regulaciones internacionales vigentes y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el manejo de animales de experimentación. No existe ningún tipo de conflicto de intereses por la realización del presente estudio.

#### **9.4 Fases del Estudio**

Fase 1. Obtención de nervios ciáticos descelularizados mediante la aplicación del protocolo de descelularización química con Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de sodio al 4% durante 15 días.

Fase 2. Recelularización de nervios ciáticos *in vitro* con células de Schwann diferenciadas de células madre mesenquimales, derivadas del tejido adiposo de rata.

Fase 3. Realización de los autoinjertos y trasplante de los nervios descelularizados y recelularizados en un modelo de rata Wistar.

Fase 4. Evaluación de la funcionalidad de los grupos experimentales mediante la aplicación del índice de función ciática.

Fase 5. Evaluación de los grupos de estudio mediante un análisis morfológico, inmunohistoquímico y microdensitométrico.

#### **9.5 Características y criterios de la población**

Se incluyeron 24 ratas machos de la cepa Wistar, adultos jóvenes (edad al inicio del protocolo entre 3-6 meses, peso entre 200 y 500 gramos), esqueléticamente maduros y clínicamente sanos.

### **9.5.1 Criterios de Inclusión**

- Ratas de la cepa Wistar
- Género masculino
- Edad entre 3 y 6 meses
- Peso entre 200 y 500 gramos

### **9.5.2 Criterios de Exclusión**

- Edad fuera del rango establecido
- Peso fuera del rango establecido
- Presencia de alteraciones de la marcha apreciables clínicamente de cualquier índole (previo a la cirugía).

### **9.5.3 Criterios de Eliminación**

- Infección del sitio quirúrgico
- Enfermedad sistémica en cualquier momento a lo largo del tiempo del estudio
- Presencia del fenómeno de autotomía.

## **9.6 Tamaño de la población y fundamento del cálculo**

Un total de fueron 24 ratas distribuidas para todo el estudio, divididas en 4 grupos:

1. 6 ratas para el grupo Sham
2. 6 ratas para el grupo Autoinjerto
3. 6 ratas para el grupo Descelularización
4. 6 ratas para el grupo Descelularización-Recelularización

El tamaño de la muestra se determinó, acorde a la literatura, mediante una prueba de hipótesis y diferencia de dos medias o con la media de un valor de referencia, con un valor  $\alpha$  de 1.96 con nivel de significancia del 95% para dos colas, y un valor  $\beta$  de 0.84 con una potencia del 80%, se obtuvo una muestra de 6 unidades por grupo. El número de muestra se decidió también en función del número de pruebas experimentales a realizar.

### **9.7 Condiciones de los animales de laboratorio**

Los animales fueron conservados en jaulas estándares, con un ciclo constante de luz y oscuridad de 12 horas. La comida y el acceso al agua fue *ad libitum*. La temperatura y la humedad fueron mantenidos en un nivel constante (22 grados y 60% respectivamente).

### **9.8 Método de sacrificio de los animales y manejo de los cadáveres**

Las ratas de los grupos de experimentación fueron sacrificadas posterior a un período de 16 semanas, mediante inhalación de CO<sub>2</sub> emitido por un cilindro de gas comprimido en una cámara cerrada, el cual es el recomendado para estas especies según la regulación nacional e internacional. Posterior a esto, se realizó una doble verificación mediante una dislocación cráneo cervical manual. La comprobación de muerte se realizó de manera triple, al confirmar mediante observación de cinco minutos la ausencia de respiración, pulso y movimiento.

Los cadáveres de los animales fueron recolectados y colocados en bolsas amarillas para su desecho, siguiendo lo establecido en la NOM-087-ECOL-1995.

## 9.9 Lugar de referencia

El presente trabajo se realizó en el Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, así como en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, el Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana y el Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL (Figura 6).



**Figura 6.** Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la UANL, donde se llevaron a cabo las cirugías de nervio periférico del presente estudio.

### 9.10 Estrategia general del estudio

La figura 7 muestra la estrategia general del presente estudio:



**Figura 7.** Estrategia general utilizada en el presente estudio.



## **9.11 Descripción del diseño del estudio**

### *9.11.1 Descelularización de los nervios ciáticos*

Los nervios ciáticos extraídos fueron de aproximadamente 15 mm de longitud, estos se sumergieron en agua destilada, la cual fue sustituida cada dos horas durante un período de 10 horas. Enseguida los nervios se expusieron a Tritón X-100 al 3%, durante toda la noche (SIGMA-ALDRICH®, San Luis, MO, Estados Unidos). Esto fue seguido de un período de 24 horas de agitación (500 rpm) en una solución de desoxicolato de sodio al 4% (SIGMA-ALDRICH®). Este proceso se repitió durante un período de 15 días. El proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente. Por último, se realizó un lavado en agua destilada y los nervios se almacenaron en buffer PBS 1X, pH 7,2 a 4 ° C hasta su uso para incluirse en parafina y realizar los cortes histológicos correspondientes.

### *9.11.2 Pruebas histológicas post-descelularización*

Los nervios se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 24 horas, enseguida se procesaron mediante la técnica histológica descrita en el anexo 1.1, luego se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes correspondientes para las siguientes tinciones, esto con la finalidad de verificar morfológicamente la correcta descelularización de los nervios periféricos.

*a) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E).*

Se realizaron cortes de 5 µm, se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Se sumergieron en hematoxilina (ANALYTYKA INC., D.F., México) por 2 minutos, se lavaron dos veces con agua corriente, se realizó una inmersión rápida en alcohol ácido, se lavaron de nuevo con agua corriente, se hicieron dos inmersiones rápidas en agua amoniacal 1%, se enjuagó con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Enseguida, se realizaron 9 inmersiones de los cortes en eosina (ANALYTYKA INC.). Por último, se deshidrató, aclaró y montó en resina (ver anexo 2.2).

*b) Tinción Tricrómico de Masson (TCM).*

Se hicieron cortes igualmente de 5µm, se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Después se usó como mordiente el fijador de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se enjuagaron los cortes en agua corriente hasta que el color amarillo desapareció y luego se enjuagaron en agua destilada. Se pasaron los cortes a hematoxilina férrica de Weigert (Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos) por 10 minutos, se lavó con agua corriente y enseguida con agua destilada. Se tiñó con la solución de fuosina ácida (Fisher Scientific®) y escarlata de Biebrich (CTR SCIENTIFIC, NL, México) por 5 segundos, se lavó con agua destilada varias veces hasta que dejó de teñirla. Se pasaron los cortes a la solución de ácido fosfomolibdico- fosfotúngstico (CTR SCIENTIFIC) por 10 minutos y se enjuagó brevemente con agua destilada. Se tiñó con la solución de azul de anilina (EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, NY) por 15 segundos y se lavó con agua destilada, hasta que se eliminó el exceso

de colorante. Luego, los cortes se pasaron por ácido acético durante 2 minutos. Por último se deshidrató, aclaró y montó (ver anexo 2.2).

*c) Tinción de Klüver-Barrera (K-B).*

Se hicieron cortes de 7  $\mu\text{m}$ , se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Los cortes se dejaron toda la noche en azul de luxol (SIGMA-ALDRICH®) a 50°C. Posteriormente, se enjuagó con etanol a 96° para eliminar el exceso del colorante y luego con agua destilada. Enseguida, se hizo una inmersión en carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) 0.05% (p/v) (Merck®KGaA, Darmstadt, Alemania) para producir la diferenciación. Para continuar con la diferenciación, se colocó el corte en etanol al 70% hasta obtener un matiz gris y blanco y se enjuagó con agua destilada. Para terminar con la diferenciación, se enjuagó en  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y enseguida se pasó por varios cambios de etanol al 70% hasta que tomó un color azul verdoso la parte más teñida y gris la menos teñida, se enjuagó con agua destilada. Después se colocó en violeta de cresilo (Merck®) por 10 minutos y luego se colocó en varios cambios de etanol 96°. Por último, se deshidrató, aclaró y montó (ver anexo 2.2).

*d) Tinción de Marsland, Glees y Erickson (M-G-E).*

Se realizaron cortes de 10 $\mu\text{m}$ , se montaron en laminillas y se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Luego los cortes se lavaron en agua desionizada. Enseguida, se colocaron las laminillas en nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Merck®) por 45 min a 37°C. Luego, se lavaron los cortes en formalina 10% (ANALYTYKA INC.) aproximadamente 15 segundos, se colocaron en  $\text{AgNO}_3$  amoniacal por 90 segundos, se lavaron de nuevo en formalina 10% por 1 minuto y después con agua

desionizada. Posteriormente, se fijó la reacción con tiosulfato de sodio al 5% (Merck®) durante 5 minutos y se lavó con agua desionizada. Por último, se deshidrató, aclaró y montó en resina (ver anexo 2.2).

*e) Inmunohistoquímica.*

Se realizaron cortes de 4µm, se montaron en laminillas silanizadas (Fisher Scientific®) y se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Primero, se realizó la exposición de antígenos en solución recuperadora de antígenos (por sus siglas en inglés TRS, Target Retrieval Solution) (Abcam®, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) por 20 minutos, enseguida, tanto los controles de técnica como las muestras fueron colocadas en TBST (Abcam®) durante 5 minutos, después se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (Abcam®) durante 10 min a 37°C, se hizo un lavado con TBST durante 5 minutos y después se colocó el Anticuerpo primario, los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche. Se emplearon anticuerpos primarios para detectar Proteína Básica de la Mielina (por sus siglas en inglés MBP, Myelin Basic Protein) (Dako®, Carpinteria, CA, USA) y Neurofilamentos (NF) (Dako®). Luego se lavaron con TBST, se agregó el anticuerpo secundario del Kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC de Abcam®, se incubaron a 37 °C por 30 min y se volvieron a lavar con TBST, después se agregó la solución de estreptavidina-HRP (Abcam®), de la misma manera se incubaron a 37 °C por 30 minutos y se volvieron a lavar con TBST. Enseguida se les añadió el 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Abcam®) durante 10 minutos. Por último, se retiró el DAB y se lavaron las muestras y los controles con agua destilada para después contrateñir con Hematoxilina de Gill, y después deshidratar gradualmente con

soluciones crecientes de etanol (70-100%) hasta llegar a xilol, para enseguida montar las laminillas con Entellan.

Las mismas tinciones histológicas utilizadas para verificar la correcta descelularización de los nervios periféricos, fueron realizadas sobre nervios sanos sin alteraciones, para ser utilizadas como grupo control.

### *9.11.3 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo*

Las células madre mesenquimales se obtuvieron a partir de tejido adiposo de rata Wistar. El tejido se colocó en PBS estéril con el antibiótico gentamicina, 50 µg/mL (LABORATORIOS QUIMICA SON'S, S.A. DE C.V., Puebla, México), y anfotericina B, 0.25 µg/mL (GIBCO®/INVITROGENTM, Grand Island, NY, USA), como antimicótico. Después, dentro de la campana de cultivo, la muestra se colocó en una caja de petri y se fragmentó el tejido con un bisturí hasta obtener fragmentos pequeños. Luego, se realizaron lavados con PBS estéril adicionado con antibiótico y antimicótico, mezclando por inversión y dejando reposar para que se llevara a cabo la separación de las fases, se eliminó la fase superior y se repitió el proceso hasta que la fase inferior se observara clara.

Después se llevó a cabo la digestión agregando una solución de PBS estéril, con Colagenasa tipo I, 200U/mL (GIBCO®/INVITROGENTM), con la misma mezcla de antibiótico/antimicótico mencionada anteriormente. La muestra se incubó a 37 °C con agitación suave durante 1 hora, hasta observar una mezcla más homogénea y

espesa. Al terminar el proceso de digestión se añadió PBS adicionado con antibiótico/antimicótico, se mezcló suavemente y después se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. En el precipitado se mantuvo una pequeña cantidad de adipocitos y células mesenquimales. Luego se descartó el sobrenadante, y la pastilla de células se resuspendió con PBS adicionado con antibiótico/antimicótico y se volvió a centrifugar, este proceso se repitió 2 veces más.

Por último, las células se resuspendieron en medio MEM-Alpha+ Glutamax™-I (GIBCO®/INVITROGENTM) adicionado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (GIBCO®/INVITROGENTM) y antibiótico/antimicótico. Las células se sembraron en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> incubándolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A los 3 días se les realizó el cambio de medio y se dejó expandir el cultivo. Cuando el cultivo llegó al 80-90% de confluencia, las células se cosecharon utilizando tripsina al 0.25% (GIBCO®/INVITROGENTM) y se dividieron en partes iguales en dos botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> para seguir expandiéndolas. La comprobación de la obtención de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata, se realizó mediante el marcador CD-105, que es específico para ellas.

#### *9.11.4 Diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.*

Se realizó la diferenciación a partir de las células del tercer pase. Las células fueron lavadas con PBS y se les cambió el medio MEM-Alpha + Glutamax™-I, al cual se le adicionó con β-Mercaptoetanol 1mM (SIGMA-ALDRICH®). A las 24 horas, se

cambió el medio y se agregó medio MEM-Alpha+ Glutamax™-I con SBF al 10% adicionado con ácido transretinoico (ATRA) 0.1mM (Calbiochem®, ©MerkKGaA, Darmstadt, Alemania), este medio se dejó por 72 horas.

Finalmente, a las células se les agregó medio MEM-Alpha + Glutamax™-I adicionado con SBF al 10%, forskolina 5mM (Calbiochem®), factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-b (bFGF) 10ng/mL (PEPROTECH, INC., Rocky Hill. NJ, USA), factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10 ng/mL (PEPROTECH, INC.) y 1β-herregulina humana recombinante 200 ng/mL(PEPROTECH, INC.). Este último medio se conservó de 2 a 8 días, renovándose de acuerdo al crecimiento de las células. La comprobación de la diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata a células de Schwann, se realizó al observar la positividad de color marrón en las células diferenciadas para los marcadores GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y la proteína S100 respectivamente, que son específicos para estas células.

#### *9.11.5 Recelularización del nervio.*

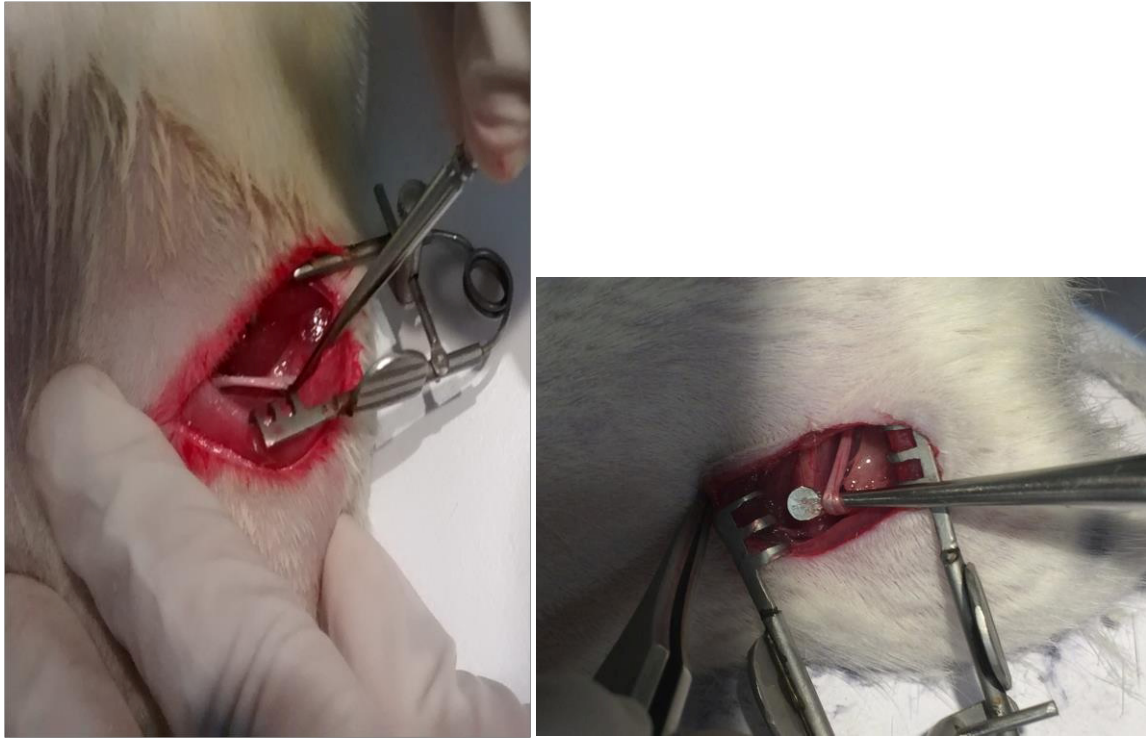
Siguiendo el método descrito por Badylak et al. (2011), el nervio descelularizado se puso en contacto con una suspensión de células de Schwann de rata diferenciadas (drSC), enseguida se centrifugó a 3000 rpm por 1 minuto, se incubó por 48 horas a 37°C, se realizó una tinción de H y E para comprobar la recelularización y posteriormente se trasplantó a las ratas receptoras.

#### *9.11.6 Técnica quirúrgica y generación de los grupos experimentales*

Todas las cirugías fueron llevadas a cabo por el mismo cirujano. Los animales de experimentación fueron colocados en una mesa quirúrgica y se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (90mg/Kg) y xilacina (10mg/Kg), se procedió a la tricotomía de la región inguinal derecha y la región posterior del muslo; las ratas fueron colocadas en una malla térmica para mantenerlas a 38 °C. Posterior a esto, se realizó asepsia y antisepsia con isodine durante 10 minutos en estas mismas regiones y se procedió con técnica quirúrgica estéril.

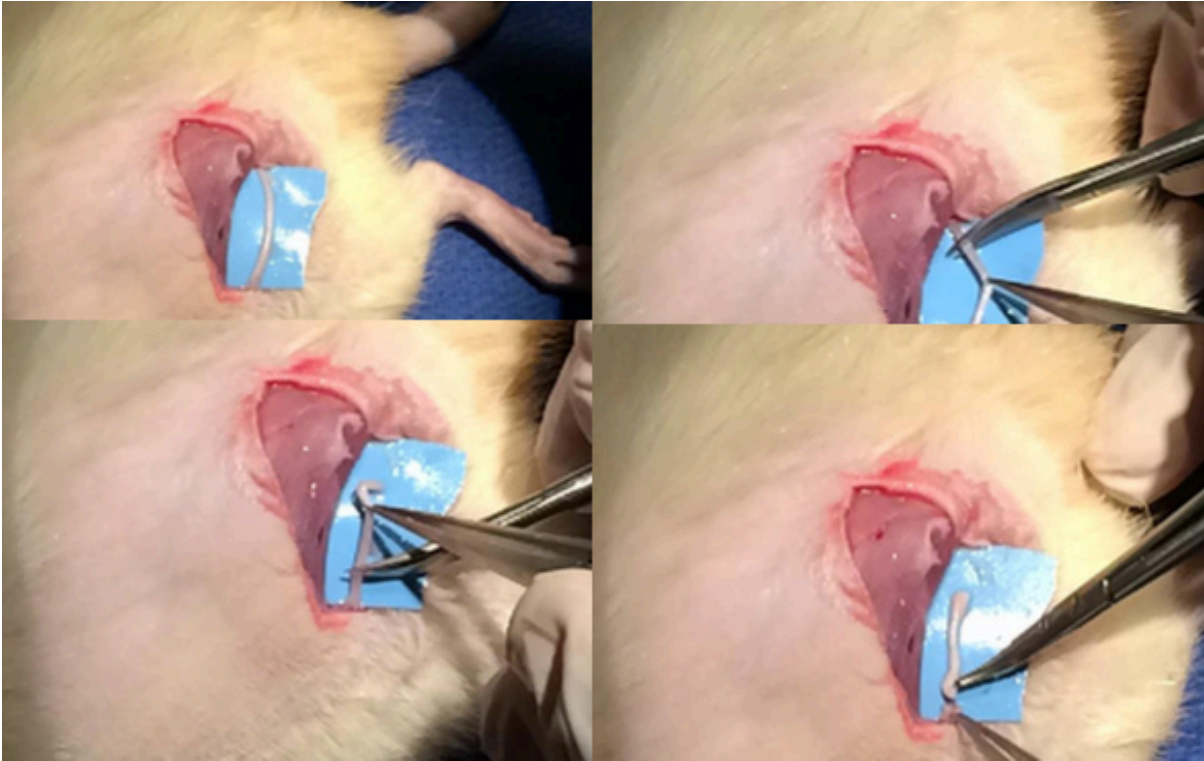
Se realizó una incisión de 2 centímetros en sentido cráneo-caudal en la región posterior del muslo, a la mitad de la distancia entre la cabeza femoral y el isquion de la extremidad posterior derecha de la rata, siguiendo el eje longitudinal del fémur. Después de disecar el tejido celular subcutáneo, se procedió a la identificación de los músculos glúteos e isquiotibiales, para proceder a su disección roma y exponer el nervio ciático en el trayecto correspondiente al tamaño de la incisión (Figura 8).





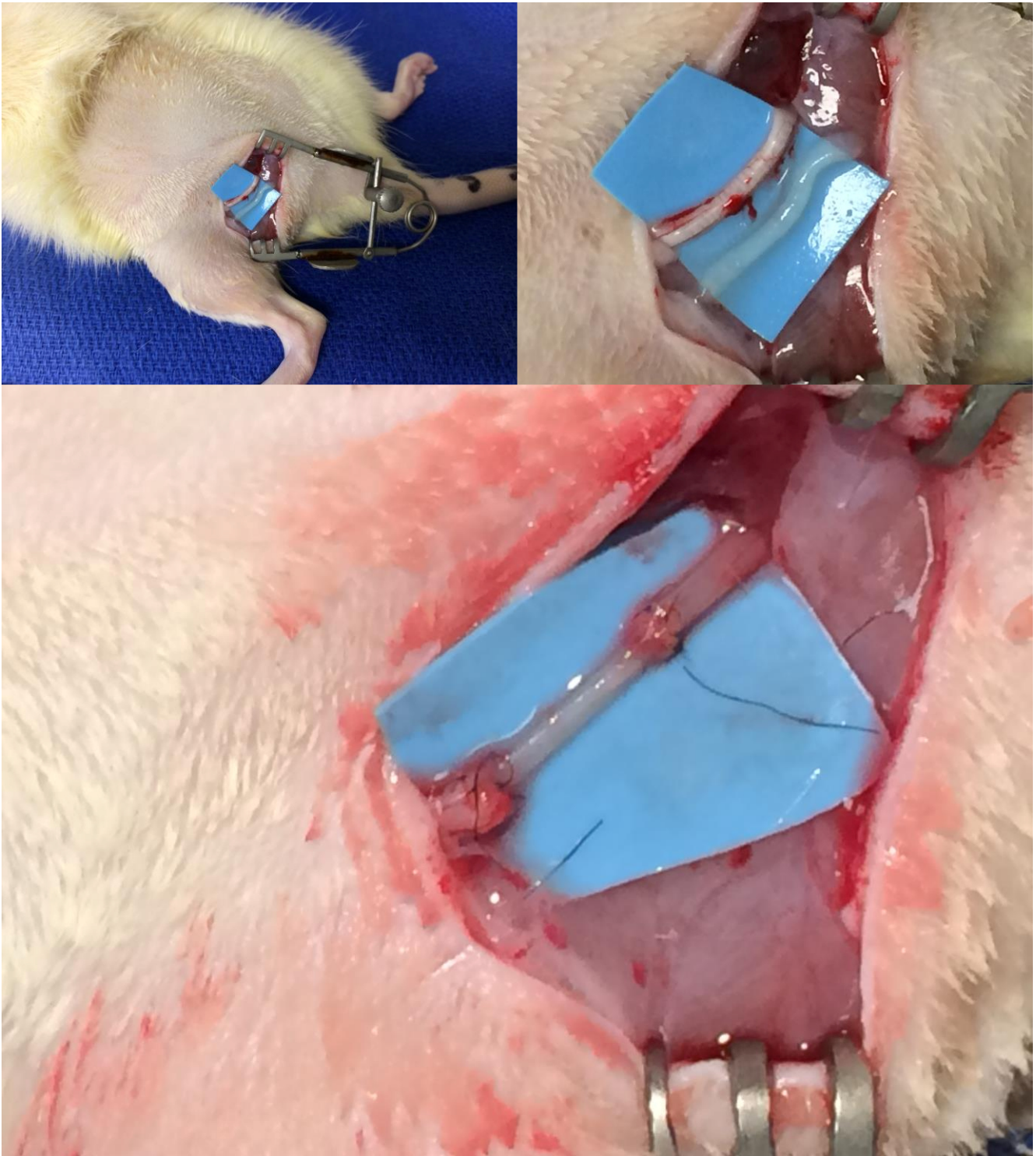
**Figura 8.** Fotografías de una disección de nervio ciático en rata, donde puede observarse el segmento nervioso de interés expuesto en su totalidad.

Usando un castroviejo, se seccionó el nervio en un segmento de aproximadamente 15 mm de longitud, dicho segmento se invirtió y se suturó microquirúrgicamente al cabo proximal y al distal usando una sutura de calibre 10.0 (Grupo I: Autoinjerto, n=6) (Figura 9).



**Figura 9.** Fotografías en las que puede apreciarse el procedimiento para la realización del autoinjerto. Arriba a la izquierda se observa la exposición del nervio ciático; arriba a la derecha se muestra la realización del corte del segmento proximal del nervio ciático; abajo a la izquierda se observa la realización del corte del extremo distal del nervio ciático; y abajo a la derecha se aprecia la inversión del nervio y sutura con material microquirúrgico para la realización del autoinjerto.

Del mismo modo, a otro grupo de ratas les fue removido el segmento del nervio y se trasplanto un aloinjerto nervioso previamente descelularizado (Grupo II: Descelularizado, n=6) o un aloinjerto nervioso recelularizado con células de Schwann (Grupo III: Recelularizado, n=6) (Figura 10). Por último, se usó un grupo Sham (Grupo IV: Sham, n=6), al cual solo se le realizó la incisión y la manipulación del nervio, pero este no fue seccionado.

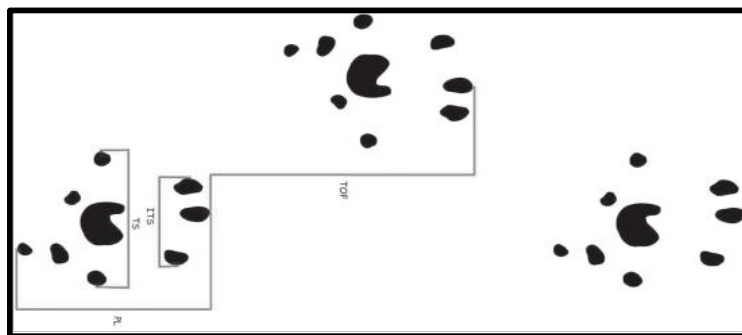


**Figura 10.** Fotografías donde puede observarse el procedimiento de implantación del nervio descelularizado y recelularizado como injerto de nervio ciático.

Una vez terminada la intervención, las ratas fueron mantenidas en vigilancia durante su período de recuperación anestésica bajo lámparas de calor y con ingesta de agua y alimento *ad libitum*.

### 9.11.7 Índice de función ciática

El modelo de evaluación del nervio ciático en rata es un modelo animal extensamente utilizado para la evaluación de la función nerviosa sensitiva y motora. El análisis de las huellas de la marcha ha demostrado claramente una relación directa entre la función muscular de las extremidades posteriores de la rata y las medidas de la impresión de las huellas entintadas (Figura 2). El análisis de las huellas de la marcha mediante el índice de función ciática (IFC) ha probado ser un método confiable, respetable, económico y cuantitativo para la evaluación de la función nerviosa posterior al daño y reparación del nervio ciático (Dinh et al., 2009).



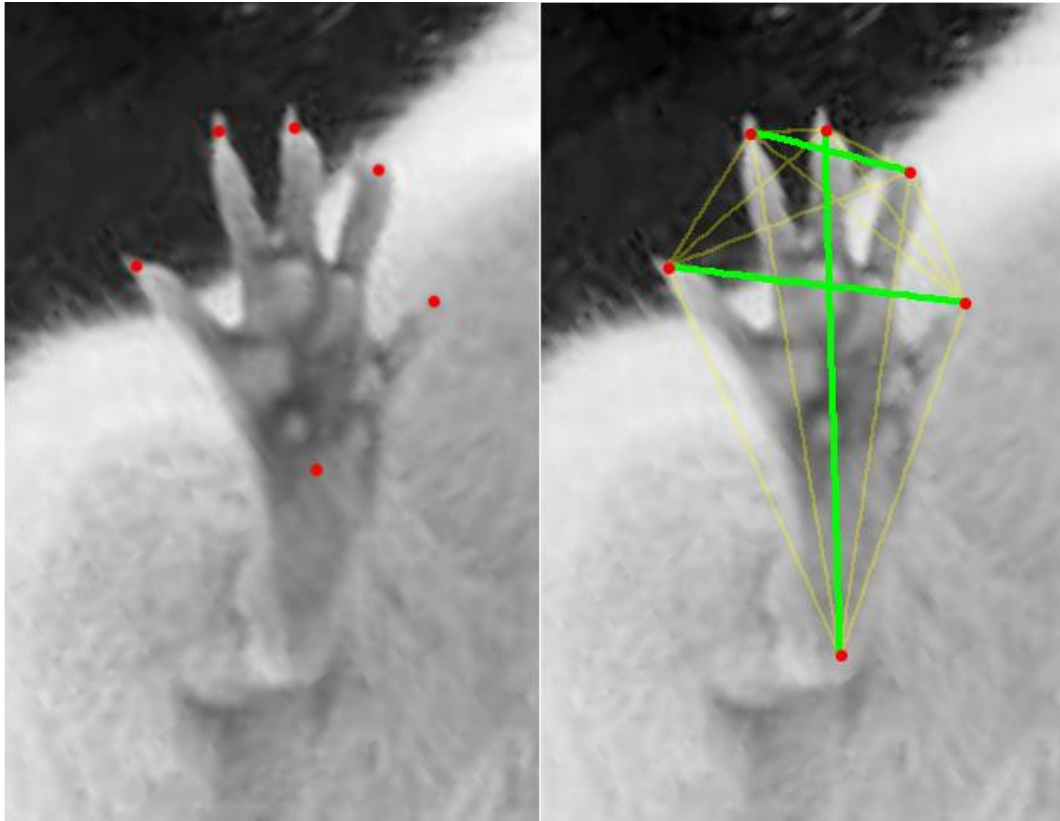
**Figura 2.** Ejemplo esquemático de la medición del análisis de la marcha realizado sobre el papel de las huellas entintadas de los animales de experimentación.

El IFC es considerado una evaluación general de la función nerviosa en las ratas puesto que caminar requiere una reinervación compleja de la unidad motora coordinada por retroalimentación sensitiva integrada en la corteza cerebral (Dinh et al., 2009). El IFC es obtenido a partir de una fórmula matemática previamente establecido.

#### **9.11.8 Evaluación funcional: Medición del índice de función ciática**

Las ratas fueron evaluadas funcionalmente durante un período de 4 meses (3 veces por semana) el promedio de las 3 mediciones de esa semana será considerado el valor total del IFC correspondiente a esa semana de estudio, para ello se les pintarán las patas a la rata con tinta y se hará pasar por un túnel oscuro de un extremo a otro sobre una hoja de papel blanca. Una vez obtenidas las huellas se les harán las siguientes mediciones sobre la hoja de papel (Figura 11):

- x Longitud de la huella (PL): distancia del talón al dedo del medio.
  - x Longitud externa (TS): corresponde a la distancia de la separación total de los dedos, es decir la distancia entre primer y el quinto dedo.
  - x Longitud interna (ITS): corresponde a la distancia intermedia de los dedos, es decir a la distancia entre el segundo y el cuarto dedo.
- xDistancia total al pie opuesto: distancia entre el punto más anterior de una huella con el punto más anterior de la siguiente.



**Figura 11.** Parámetros morfométricos a evaluar en la huella dejada por la extremidad de la rata sobre el papel de pruebas para el cálculo del índice de función ciático.



Después de obtener los parámetros descritos en ambos miembros (lesionado y normal), estos se incorporan en la fórmula descrita por Bain et al. para obtener el índice de función del ciático en una escala de 0 a -100, donde 0 corresponde a un estado normal y -100 a un daño completo (Figura 12).

**C. Bain, Machinnon, and Hunter, 1989**

$$SFI = -38.3 \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

**Figura 12.** Fórmula matemática elaborada por Bain, Machinnon and Hunter en 1989 para la obtención del índice de función ciática a partir de las morfometrías realizadas a las huellas de los sujetos de experimentación. E= Extremidad experimental y N= Extremidad control.

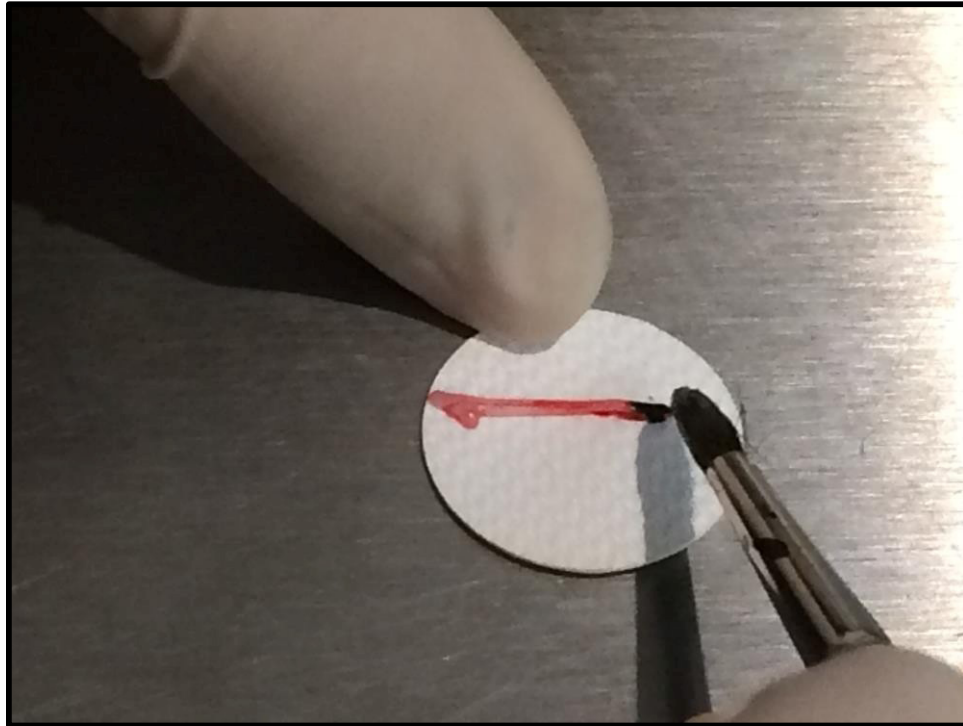
Los datos obtenidos fueron recabados en una hoja de recolección de datos elaborada con propósitos de este estudio (Figura 13).

	Departamento de Anatomía Humana Regeneración de nervio periférico en Rata Wistar	
Individuo: C8 Semana: 2- Nervio Regularizado Fecha: 17 / octubre / 2014 Registro:	<b>Parámetros control</b> NPL: NIT: NET:	<b>Parámetros experimentales</b> EPL: EIT: ETS:
<b>SFI</b> _____		
<b>Observaciones:</b>   		

**Figura 13.** Formato de recolección de datos elaborado para el registro de las huellas del animal de experimentación, así como el registro de las mediciones y el índice de función ciática obtenido.

### **9.11.8 Análisis Morfológico y Microdensitométrico**

A las 16 semanas del estudio, las muestras de nervio periférico e injertos descelularizados, fueron extraídos los animales de experimentación y marcados con tinta china para diferenciar el segmento proximal del distal (Figura 14).



**Figura 14.** Método de marcaje del segmento proximal de las muestras extraídas de los animales de experimentación al finalizar las 16 semanas del estudio.

Posterior a esto, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 2.5% por 24 horas. Posteriormente, se aplicó la técnica histológica convencional y las piezas fueron incluidas en bloques de parafina y mediante el uso de un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos longitudinales y transversales de 5  $\mu\text{m}$  de grosor cada 25  $\mu\text{m}$ . Los cortes se analizaron mediante un microscopio de campo claro Nikon Eclipse 50i a aumentos de 10x y 40x, y un sistema de análisis de imagen con el software NIS-



elements advanced research Digital Sight dDS-2Mu y el programa Image J, versión 1.49 (National Institutes of Health). El análisis morfológico fue realizado por doctores especialistas en morfología.

Para comprobar la recelularización de los nervios experimentales recuperados después de los 4 meses de recuperación. Se realizaron tres tinciones histológicas generales (Hematoxilina-Eosina, Tricromico de Von Gieson y Tinción de PAS) y dos pruebas inmunohistoquímicas (para la detección de la proteína básica de la mielina y neurofilamentos).

Además, se realizó un análisis densitométrico para cuantificar la proporción de señal de la proteína básica de la mielina en las muestras de interés después de las 16 semanas de evaluación en el cabo proximal y distal, esto se realizó de la siguiente manera: de las laminillas teñidas con la inmunotinción para la detección de la proteína básica de la mielina se obtuvieron imágenes digitales de alta resolución de 8 campos consecutivos con el objetivo seco fuerte (40X). Los parámetros de color, distribución de la tonalidad, saturación e iluminación se establecieron en el software de captura y fueron los mismos para todas las imágenes obtenidas. Posteriormente las imágenes se analizaron con el programa Image J 1.49V (NIH) para cuantificar mediante microdensitometría la cantidad de proteína básica de la mielina en las muestras de los 4 grupos. De las imágenes obtenidas se seleccionó manualmente la tonalidad roja oscura de la MBP, y con el programa (previamente calibrado con el umbral de detección de una muestra control) se convirtió el intervalo de color a escala de grises y el resto de los componentes tisulares a color blanco. En seguida

las imágenes procesadas se analizaron automáticamente para determinar el porcentaje del área e intensidad de la densidad (Int Dent) de las fibras elásticas en cada muestra. Esto se realizó por duplicado.

### **9.12 Análisis estadístico**

Fue realizado utilizando el programa computacional SPSS (Versión 19.00) para Windows XP (SPSS, Chicago, IL). Se realizó un análisis descriptivo de las variables cualitativas (frecuencia, porcentaje, gráficos de barra y de pastel), así como de las variables cuantitativas (medidas de tendencia central y dispersión e histogramas). Las comparaciones entre los grupos, de los resultados del índice de función ciática y los resultados del análisis densitométrico, sobre los cortes histológicos fueron realizadas utilizando pruebas para datos paramétricos (ANOVA y t student de dos colas para variables independientes), para determinar la significancia de las diferencias, considerando significativo un valor de  $p$  inferior a 0.05.

# CAPÍTULO 10

## Resultados

10.1 Resultados de la fase 1

10.2 Resultados de la fase 2

10.3 Resultados de la fase 3

10.4 Resultados de la fase 4

10.5 Resultados de la fase 5

10.5.1 Análisis morfológico e inmunohistoquímico

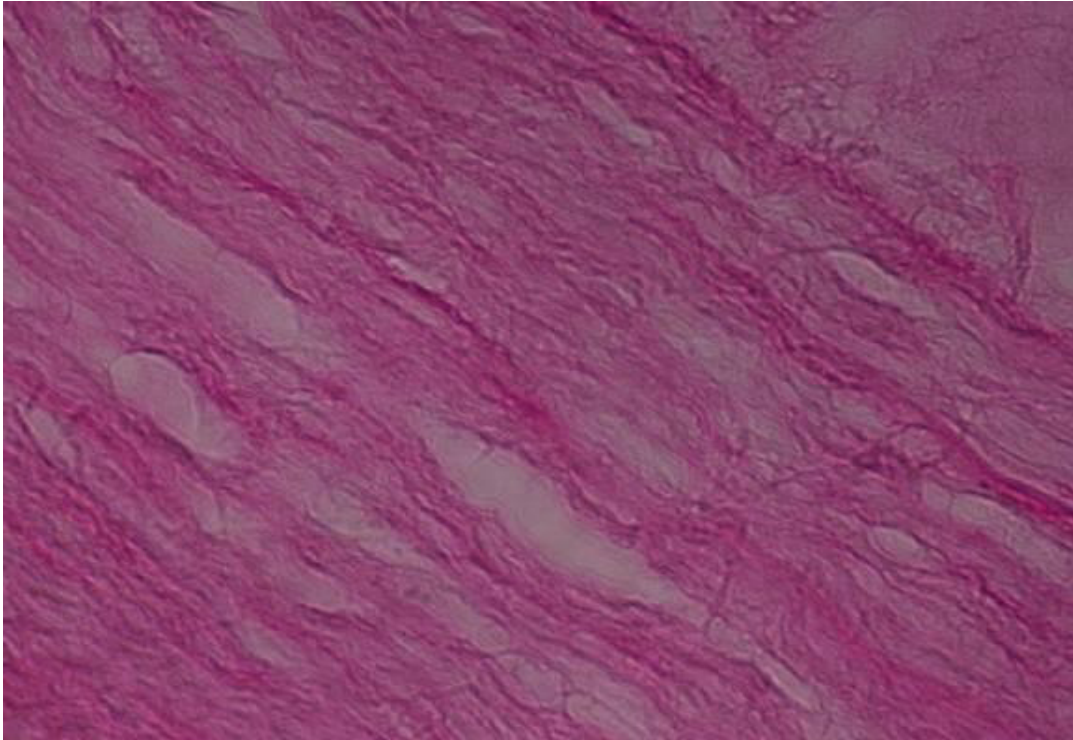
10.5.2 Análisis microdensitométrico

## **CAPÍTULO 10**

### **RESULTADOS**

#### **10.1 Resultados de la fase 1. “Obtención de nervios ciáticos descelularizados mediante la aplicación del protocolo de descelularización química con Tritón X-100 al 3% y Desoxicolato de sodio al 4% durante 15 días”**

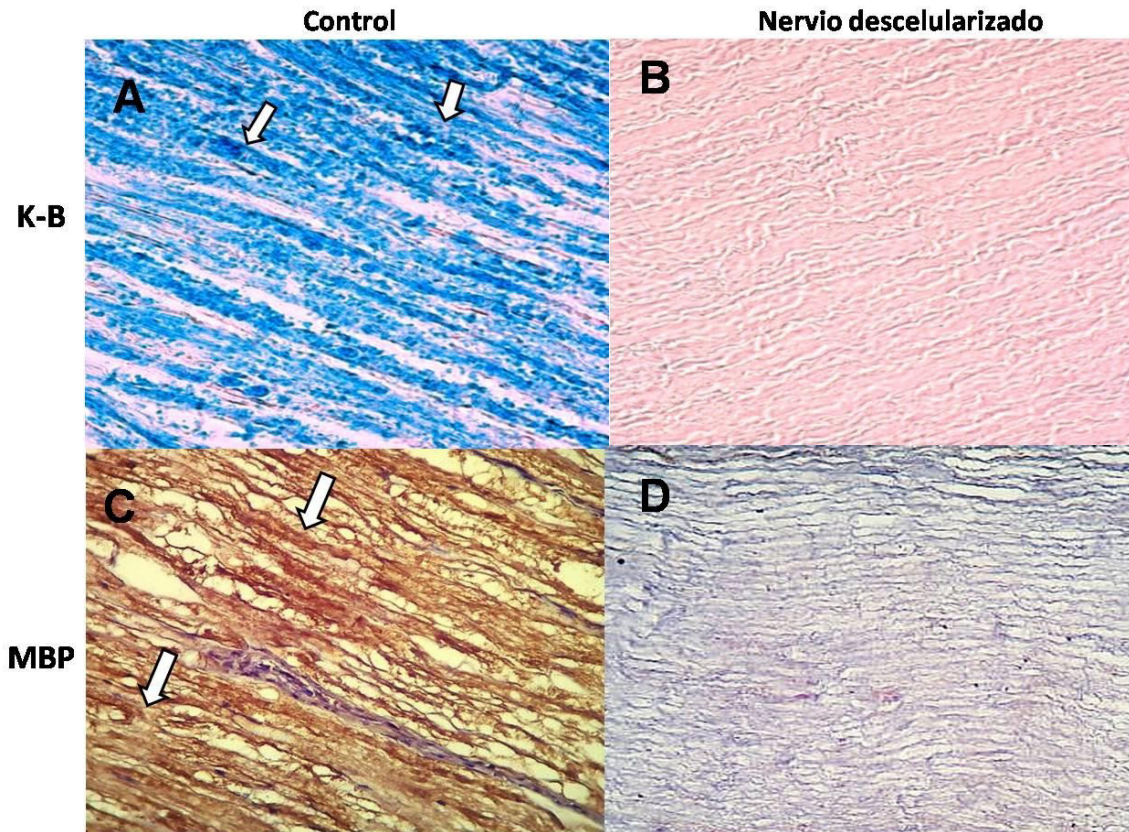
La primera prueba histológica que se hizo una vez terminado el proceso de descelularización fue la de H y E, la cual se basa en dos etapas; la primera, una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xanténico ácido (eosina). La hematoxilina oxidada y transformada en hemateína, nos permite observar los núcleos teñidos de color azul/negro; mientras que la eosina, aporta una gradación entre el rosa y el rojo al citoplasma y material extracelular. En la figura 15, podemos observar cómo el método de descelularización aplicado eliminó de manera efectiva los remanentes celulares para obtener un nervio completamente descelularizado.



**Figura 15.** Microfotografía representativa en la que puede evidenciarse la remoción completa del material celular utilizando la técnica de descelularización propuesta por nuestro grupo de trabajo.

Enseguida se realizó la tinción de K-B y se usó un anticuerpo para detectar MBP y así comprobar que no existiesen restos de mielina en el nervio tratado. En la tinción de K-B, el azul de luxol presenta afinidad por los lípidos de la vaina de mielina, tiñéndola de color azul, como se señala con flechas en el recuadro A de la figura 16, por otro lado, en el recuadro B se muestra que en el nervio tratado, no hay presencia de mielina. En el recuadro C se aprecia el control positivo para la inmunotinción contra MBP donde la presencia de mielina se observa de un color

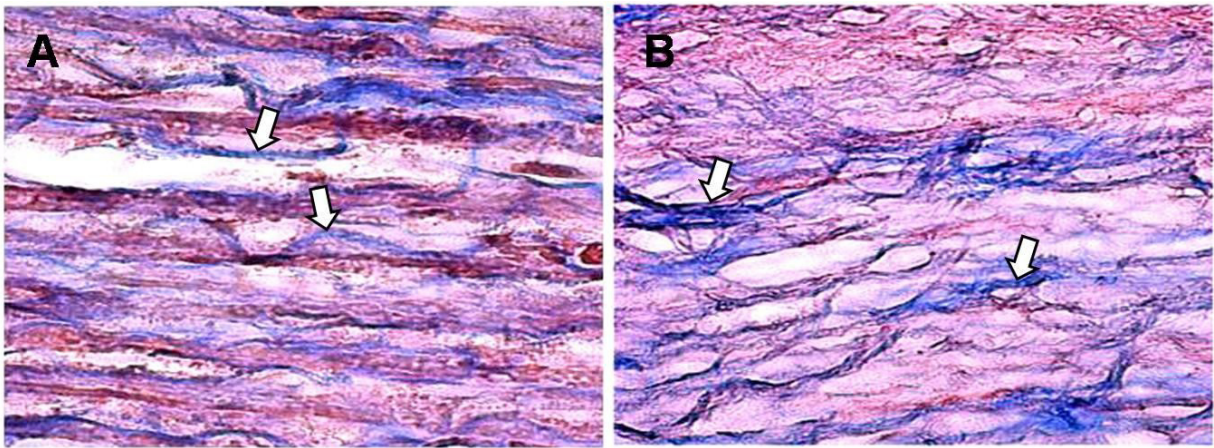
marrón; mientras que en el recuadro D, el cual corresponde al nervio tratado, no hay ninguna señal positiva para mielina (Figura 16).



**Figura 16.** Detección de mielina en el nervio descelularizado. Se utilizó la tinción de K-B y MBP en el nervio descelularizado con Tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por un período de 15 días. A y C son el nervio control, como testigo positivo; B y D son el nervio tratado donde ya puede observarse la presencia de mielina.

Para comprobar que la MEC se conservaba en buen estado, se realizó la tinción de TCM, la cual es una técnica de coloración que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I. Se emplearon tres colorantes para diferenciar el núcleo

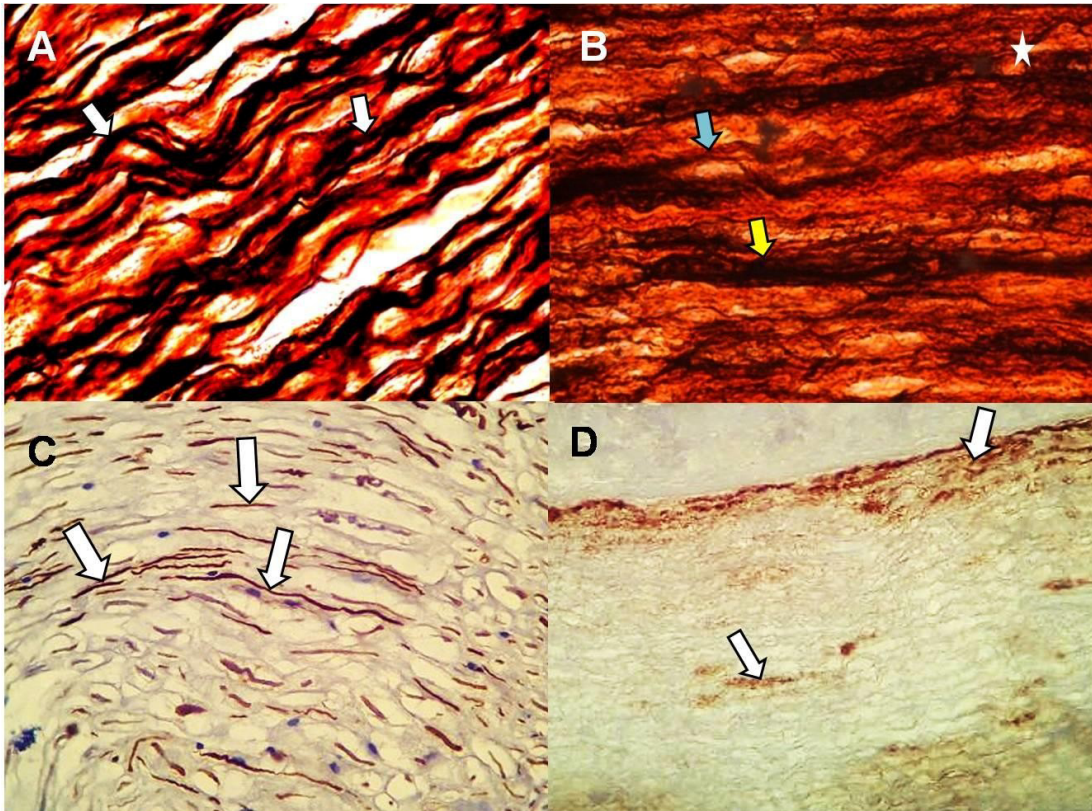
celular (de color café), el citoplasma (de color rojizo) y las fibras de colágeno (de color azul). En el recuadro B de la figura 17, se muestra el nervio tratado, en donde es posible observar que las fibras de colágeno no presentan una diferencia notable en comparación con el control (Figura 17, recuadro A), por lo que se puede decir que el tratamiento con el detergente no afectó la MEC.



**Figura 17.** Detección de colágeno tipo I en el nervio descelularizado. Los nervios descelularizados fueron teñidos con TCM para comprobar si se conservaba la estructura de las fibras de colágeno después de los 15 días de tratamiento con detergentes. A) Nervio sin tratar, como control positivo y B) Nervio tratado.

De igual manera, se realizó la tinción de M-G-E con la cual se puede lograr una impregnación específica de la plata en los axones. En el control (figura 18, recuadro A) se observa la presencia de axones bien conservados y uniformes; mientras, que en el nervio tratado (figura 18, recuadro B) se pueden observar alteraciones. Se notan algunos axones engrosados y otros más delgados, así como también la presencia de vacuolas que hacen que se pierda la trayectoria de estos. En el

recuadro C de la figura 18, se observa el nervio control para la detección de NF donde la positividad de color marrón muestra igualmente axones bien definidos, pero en el nervio tratado (figura 18, recuadro D) se pierde la positividad de estos.



**Figura 18.** Tinción de M-G-E (A y B) e inmunohistoquímica para NF en el nervio descelularizado (C y D). Los cortes de nervios tratados con Tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por un período de 15 días, fueron teñidos con la técnica M-G-E. Las acotaciones en el recuadro B señalan alteraciones en la estructura del axón como: vacuolas (estrella), adelgazamiento (flecha azul), y engrosamiento (flecha amarilla); en el recuadro A las flechas blancas señalan la estructura normal de los axones. En el recuadro D está señalado, por flechas blancas, como disminuye



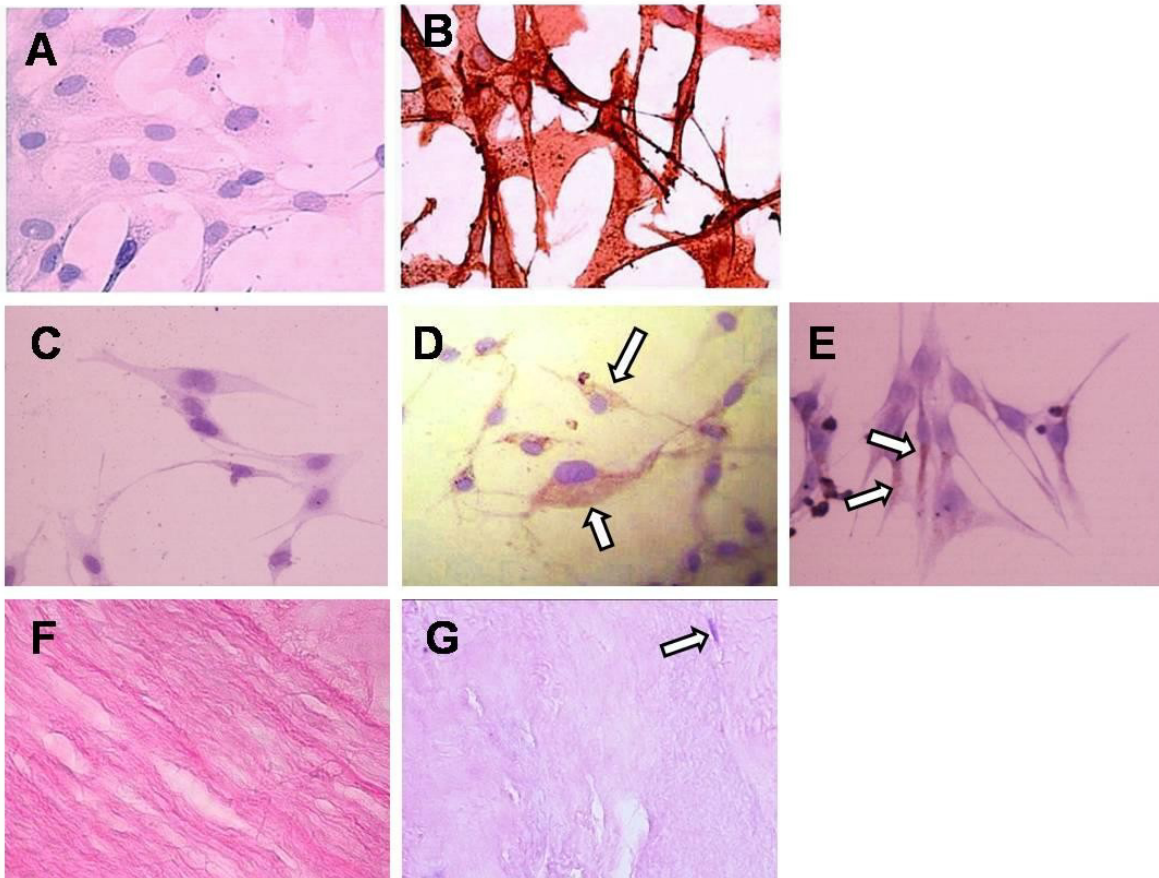
la señal para NF en el nervio después del tratamiento en comparación con el control positivo (recuadro C), donde las flechas señalan la positividad para este marcador.

Los cortes de nervios tratados con tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por un período de 15 días, fueron teñidos con la técnica M-G-E. Las acotaciones en el recuadro B señalan alteraciones en la estructura del axón como: vacuolas (estrella), adelgazamiento (flecha azul), y engrosamiento (flecha amarilla); en el recuadro A las flechas blancas señalan la estructura normal de los axones. En el recuadro D está señalado, por flechas blancas, como disminuye la señal para NF en el nervio después del tratamiento en comparación con el control positivo (recuadro C), donde las flechas señalan la positividad para este marcador.

## **10.2 Resultados de la fase 2. “Recelularización nervios ciáticos *in vitro* con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata diferenciadas a células de Schwann”**

Lo primero que se realizó fue la extracción de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (CMM-TA) de rata, una vez extraídas, estas se caracterizaron mediante el marcador CD-105 que es específico para CMM, en la figura 19 (recuadro B) se puede ver la positividad para este marcador de color marrón. Enseguida, estas células se diferenciaron utilizando factores de diferenciación, en los recuadro D y E (figura 19) se puede observar la positividad de color marrón en nuestras células diferenciadas para los marcadores GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y S100 respectivamente, que son específicos para las células de

Schwann. Una vez obtenidas las drSC se procedió a recelularizar el nervio, en el recuadro F) se puede observar un nervio descelularizado, mientras que en recuadro G), mediante una H y E, podemos observar la presencia de núcleos teñidos de un color morado, comprobándose así la recelularización en todas las muestras.



**Figura 19.** Caracterización de CMM-TA y drSC y recelularización de un nervio descelularizado con drSC. A) Control negativo para CD-105, B) CMM-TA muestran positividad para el marcador CD-105, C) Control negativo donde se omitió el anticuerpo primario, D) drSC muestran positividad para el marcador GFAP, E) drSC muestran positividad para el marcador S-100, F) Nervio descelularizado, donde no

se observa ningún núcleo celular, G) Nervio recelularizado, se puede observar la presencia de un núcleo celular de color morado.

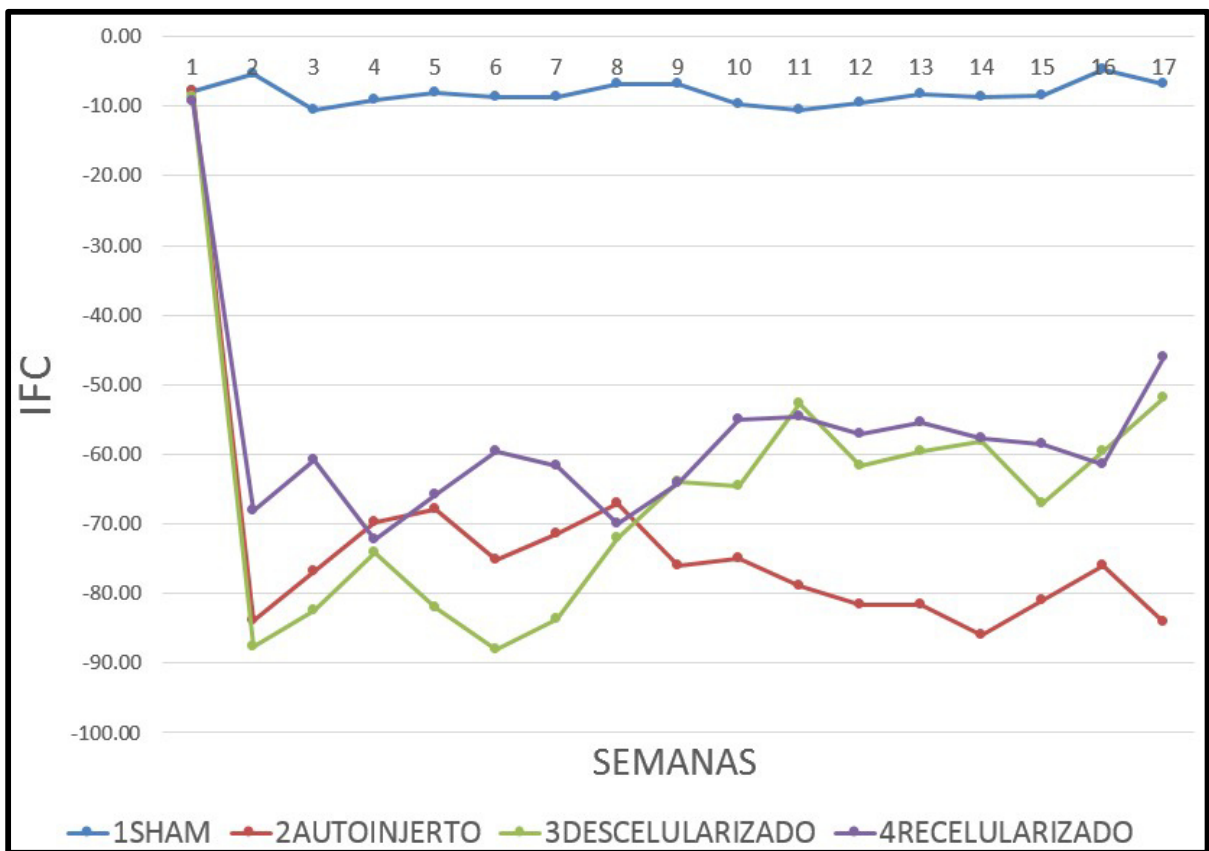
### **10.3 Resultados de la fase 3. “Realización de los autoinjertos y trasplante de los nervios descelularizados y recelularizados en un modelo de rata Wistar”**

La totalidad de los procedimientos quirúrgicos pudo llevarse a cabo sin ningún contratiempo en los 4 grupos experimentales, los autoinjertos así como los aloinjertos descelularizados pudieron implantarse como puentes quirúrgicos para la reparación de los defectos nerviosos. No se reportaron efectos adversos o complicaciones en ninguno de los procedimientos quirúrgicos o en el período postoperatorio.

### **10.4 Resultados de la fase 4. “Evaluación de la funcionalidad de los grupos experimentales mediante la aplicación del índice de función ciática”**

Para evaluar la funcionalidad del nervio ciático, se calculó el índice de función ciática para cada rata a lo largo de las 16 semanas de duración del estudio. El índice de función ciática tiene valores entre 0 y -100, siendo 0 el resultado más favorable (equivalente a un resultado normal) y -100 es el menos favorable (equivalente a una lesión nerviosa total y completa).

En la figura 20 se puede observar que el comportamiento del grupo Sham tiene IFC cercanos a 0 a lo largo de las 16 semanas de duración del estudio, lo cual corresponde a un comportamiento normal. Se puede observar también que los grupos de autoinjerto, descelularizado y recelularizado a lo largo de las 16 semanas de observación, presentan valores por debajo de los -50 con una tendencia a la mejoría en los grupos descelularización y recelularización. Los resultados obtenidos por el grupo recelularizado a las 16 semanas del estudio es el único que logra mantenerse por encima del valor de -50. En el grupo autoinjerto se observó una tendencia a la baja en los resultados del IFC.



**Figura 20.** Patrones de comportamiento del IFC a lo largo de las 16 semanas de observación del estudio.

El resultado promedio del IFC fue de  $-8.18 \pm 1.65$  para el grupo Sham,  $-77.03 \pm 5.84$  para el grupo Autoinjerto,  $-69.32 \pm 12.30$  para el grupo Descelularizado y  $-57.54 \pm 6.61$  para el grupo Recelularizado. Los resultados promedio de cada semana se muestran en la tabla 3.

Semana	Sham	Autoinjerto	Descelularizado	Recelularizado
0	-7.81	-7.94	-8.72	-9.24
1	-5.29	-83.82	-87.64	-68.19
2	-10.54	-76.85	-82.40	-60.82
3	-9.17	-69.69	-74.06	-72.34
4	-8.06	-68.01	-82.12	-65.91
5	-8.80	-75.16	-88.10	-59.50
6	-8.80	-71.48	-83.71	-61.69
7	-6.74	-67.09	-71.98	-70.00
8	-6.77	-75.99	-63.90	-64.14
9	-9.73	-75.06	-64.66	-55.01
10	-10.62	-78.95	-62.68	-54.62
11	-9.46	-81.63	-61.64	-57.08
12	-8.31	-74.00	-59.60	-55.36
13	-8.80	-86.02	-58.12	-57.82
14	-8.47	-80.94	-67.02	-58.63
15	-4.75	-76.05	-59.52	-51.48
16	-6.88	-84.01	-51.93	-46.09

**Tabla 3.** Resultados promedio del IFC en los 4 grupos de experimentación durante las 16 semanas del estudio.

Respecto a los resultados del análisis estadístico se evidenciaron diferencias significativas entre los resultados promedio de los 4 grupos de experimentación al finalizar las 16 semanas del estudio mediante la prueba de ANOVA ( $p < 0.001$ ). Al realizar el análisis entre grupos de manera individual mediante pruebas de t student de dos colas para variables independientes fue posible evidenciar diferencias significativas al comparar los resultados promedio de los grupos entre sí como puede observarse en la tabla 4.

<b>Grupos comparados</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
Autoinjerto vs Descelularizado	0.03*
Autoinjerto vs Recelularizado	0.00001*
Descelularizado vs Recelularizado	0.02*

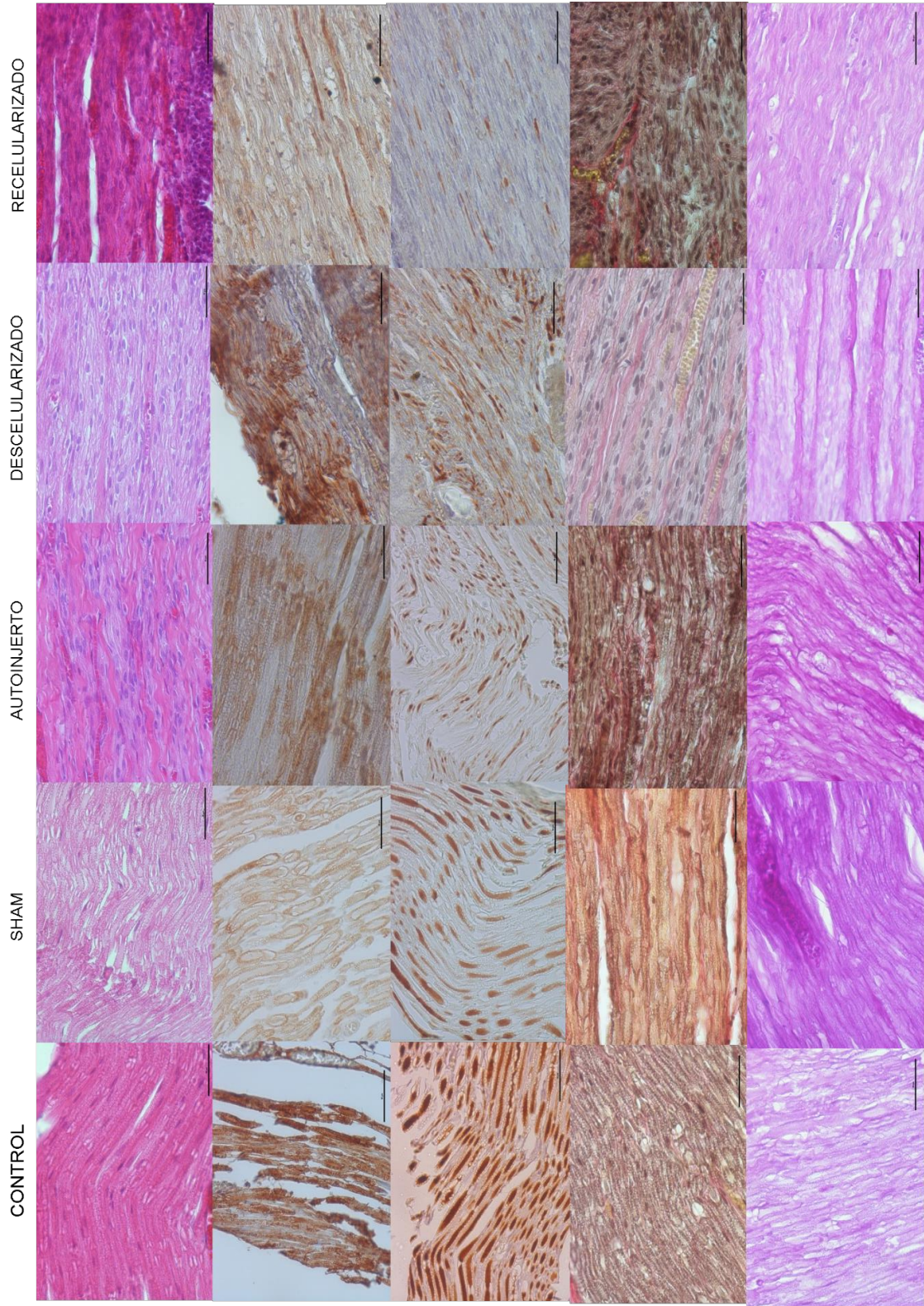
**Tabla 4.** Comparación estadística entre los resultados promedio obtenidos por los diferentes grupos experimentales entre sí a lo largo de las 16 semanas de duración del estudio. *\*Diferencias significativas.*

## **10.5 Resultados de la fase 5. “Evaluación de los grupos de estudio mediante un análisis morfológico, inmunohistoquímico y microdensitométrico”**

### *10.5.1 Análisis morfológico e inmunohistoquímico*

El análisis morfológico general realizado se muestra en la Figura 21.

En los cortes teñidos con H y E se pudo observar que en los nervios del grupo descelularizado, hay una recelularización uniforme, muy similar a la observada en los nervios del grupo sham (en el que solo se observó una desorganización de las fibras de colágeno, sin pérdida de la arquitectura tisular y/o disrupción de las fibras) y el grupo autoinjerto (en el que se observó un aumento de la celularidad y una disminución del componente extracelular). Sin embargo, en los cortes correspondientes al grupo recelularizado con células de Schwann, se observó claramente una celularidad mayor, así como una alteración en la estructura morfológica general en comparación con los otros tres grupos (Figura 21).



H&E

MBP

NF

VG

PAS



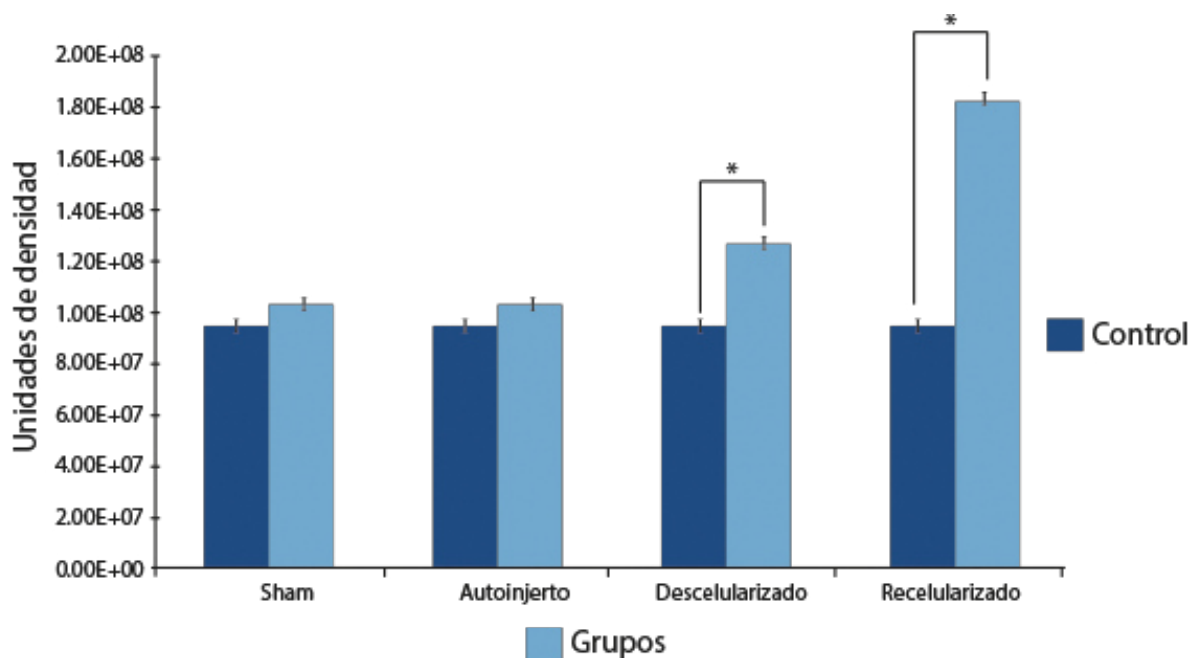
**Figura 21.** Microfotografías representativas de todos los grupos de experimentación en la totalidad de las tinciones utilizadas en el presente estudio. La primera fila corresponde a la tinción de H y E, la segunda a la inmunotinción contra MBP, la tercera a la inmunotinción contra NF, la cuarta a las laminillas teñidas con Tricrómico de Von Gieson y la última fila a la tinción de PAS.

En el nervio descelularizado se pudo observar que, después del proceso de descelularización, los axones perdían su integridad y presentaban alteraciones morfológicas; sin embargo, en los cortes correspondientes a la Inmunohistoquímica dirigida contra neurofilamentos, pudo evidenciarse que los nervios pertenecientes al grupo descelularizado y recelularizado presentaban, después de las 16 semanas de recuperación, una restauración en la integridad de los axones (Figura 21).

Respecto a la inmunotinción para la MBP, pudo evidenciarse en los cortes correspondientes a la sección proximal del nervio periférico de los grupos descelularizado y recelularizado. que en todos los casos se presentaba una remielinización completa del nervio, y en los cortes correspondientes a la sección distal de los mismos grupos, en su mayoría también se evidenció una remielinización significativa. En los cortes teñidos con Tricromico de Von Gieson y PAS pudo evidenciarse que no existen cambios significativos en la cantidad, organización e integridad de las fibras de colágeno entre los distintos grupos (Figura 21).

### 10.5.2 Análisis microdensitométrico

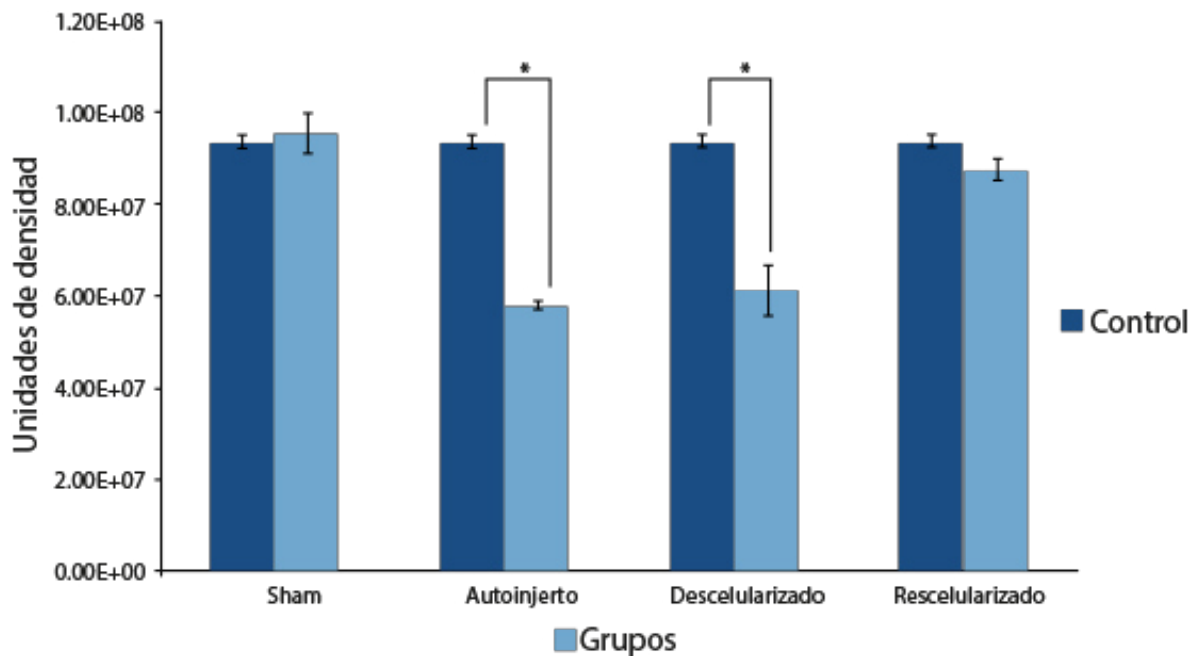
Mediante el programa Image J se realizó una cuantificación de la señal de MBP, en el análisis de la intensidad de la densidad se observaron valores de  $1.07E+08 \pm 0.17E+08$ ,  $1.08E+08 \pm 0.28E+08$ ,  $1.27E+08 \pm 0.19E+8$  y  $1.87E+08 \pm 0.23E+8$  para el grupo sham, autoinjerto, descelularizado y recelularizado respectivamente en el segmento proximal del nervio y de  $9.37E+07 \pm 1.44E+07$ ,  $5.78E+07 \pm 0.96E+07$ ,  $5.89E+07 \pm 1.03E+7$  y  $9.02 E+07 \pm 1.23E+7$  para el grupo sham, autoinjerto, descelularizado y recelularizado respectivamente en el segmento distal del nervio (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Cuantificación de la señal de mielina en el cabo proximal. Se utilizó el programa Image J para medir las unidades de densidad correspondientes a la cantidad de mielina expresada en el cabo proximal después de las 16 semanas de

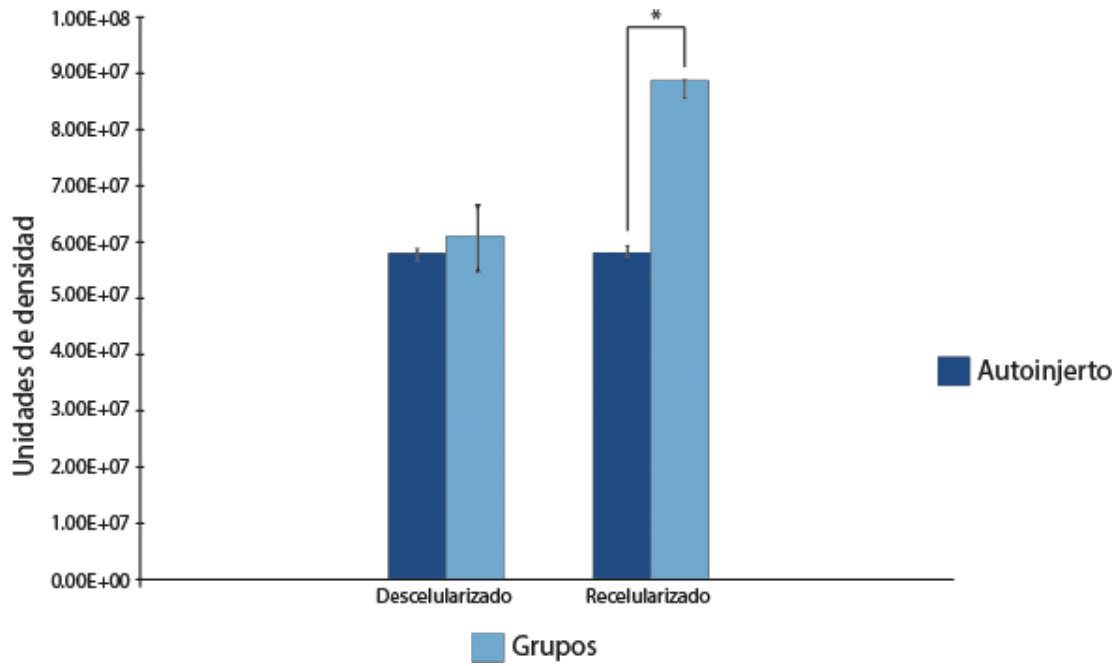
recuperación para cada uno de los grupos. Los grupos descelularizado y recelularizado presentan mayor remielinización con respecto al grupo Sham y Autoinjerto.

Al comparar los resultados promedio obtenidos en la señal de mielina por el grupo descelularizado y recelularizado, contra su extremidad control contralateral en el segmento de nervio proximal, se evidenciaron diferencias significativas ( $p=0.01$  para el grupo descelularizado y  $0.003$  para el grupo recelularizado), así como en los grupos autoinjerto y descelularizado ( $p= 0.001$  y  $p=0.002$ ) para el segmento distal del nervio, mientras que en el grupo recelularizado esta diferencia no es estadísticamente significativa, lo que indica que se ha alcanzado una remielinización completa.



**Figura 23.** Cuantificación de la señal de mielina en el cabo distal. Mediante el programa Image J, se midieron las unidades de densidad, correspondientes a la cantidad de mielina expresada en el cabo distal después de las 16 semanas de recuperación para cada uno de los grupos. Los grupos Autoinjerto y Descelularizado, presentan una menor remielinización con respecto al Control, mientras que en el grupo Recelularizado esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Se puede observar que en los nervios descelularizado y recelularizado hay una mayor cantidad de mielina, en comparación con el sham en el segmento proximal del nervio (Figura 22). Del mismo modo, se puede observar de forma cuantitativa que hay una menor cantidad de mielina en los grupos de autoinjerto, descelularizado y recelularizado, con respecto al sham en el segmento distal (Figura 23). Sin embargo, si comparamos los grupos descelularizado y recelularizado con el autoinjerto, que es el estándar de oro en la LNP, hay una mayor remielinización en los dos primeros grupos, siendo este incremento, en el caso del grupo de nervio recelularizado, significativamente estadístico (Figura 24).



**Figura 24.** Comparación de la señal de mielina en el cabo distal con el estándar de oro. El grupo recelularizado presenta una mayor remielinización en el cabo distal en comparación con el autoinjerto.

# CAPÍTULO 11

## Discusión

# CAPÍTULO 11

## DISCUSIÓN

Las lesiones de nervio periférico pueden ser debilitantes para los pacientes y pueden involucrar nervios sensitivos, motores o mixtos. La regeneración después de una lesión de nervio periférico depende de varios factores, incluyendo el ambiente local de las neuronas para alcanzar sus blancos sinápticos. Por lo tanto, el objetivo de los tratamientos disponibles es ayudar a facilitar la rápida y fácil migración de estas células, para dar regeneración axonal más allá del sitio de la lesión y lograr una adecuada reinervación. Las opciones hoy en día, para conectar los nervios lesionados incluyen autoinjertos, aloinjertos no procesados con inmunosupresión, aloinjerto de nervio acelular (ANA), conductos autógenos (por ejemplo venas) y conductos bioabsorbibles (por ejemplo colágena, ácido poliglicólico, coprolactona, etc.) (Tang y Chauha, 2015).

El primer aloinjerto nervioso descrito fue realizado en 1885 por Albert. Él reconstruyó defectos nerviosos de 3 cm de nervio mediano y de 10 centímetros de nervio cubital, utilizando aloinjertos nerviosos de extremidades inferiores amputadas (Albert, 1885).

Históricamente, los aloinjertos nerviosos han fallado por la falta de conocimiento acerca de las interacciones injerto contra huésped y la necesidad de la inmunosupresión; por lo tanto, el objetivo del procesamiento de los aloinjertos es la no producción de inmunogenicidad, para permitir la incorporación al huésped sin la necesidad de la inmunosupresión. Las alternativas para el procesamiento incluyen: por detergentes, irradiación, preservación en frío y ciclos repetitivos de congelación descongelación (Tang y Chauha, 2015).

Actualmente solo hay un implante de aloinjerto nervioso descelularizado disponible en el mercado. El proceso de fabricación de este incluye un procesamiento con detergentes para quitar remanentes celulares, mielina y neurofilamentos; la degradación enzimática de inhibidores del crecimiento; y la adición de esterilización terminal con irradiación gamma controlada. Todos estos procesos tienen el objetivo de mantener la estructura necesaria para la regeneración axonal (específicamente los microtúbulos), incluyendo componentes asociados de la matriz extracelular involucrados en la regeneración nerviosa (por ejemplo laminina) (Tang y Chauha, 2015).

Los aloinjertos de nervios acelulares están indicados en cualquier situación en donde un conducto bioabsorbible o un injerto autólogo de vena estén indicados (Tabla 5). Está generalmente aceptado que un defecto menor o igual a 3 centímetros en un nervio sensitivo puede ser puenteado con éxito con un conductor nervioso hueco (Deal et al., 2012). Sin embargo, la evaluación crítica de la literatura revela que este principio generalmente aceptado está sujeto a cuestionamiento.



Chiu y Strauch (1990) aportaron la mejor evidencia disponible con respecto a defectos nerviosos de este tamaño; ellos evaluaron prospectivamente autoinjertos venosos y encontraron que eran efectivos para la corrección de defectos menores o iguales a 3 centímetros. Cabe mencionar que 5 de las 10 reparaciones utilizando un conducto venoso, fueron para defectos de 3 centímetros (Chiu y Strauch, 1990). Este límite de longitud fue luego apoyado y sustentado por los resultados de Strauch et al. (1996) en un estudio utilizando conejos, en donde los autores observaron menor regeneración para los injertos mayores de 3 centímetros de longitud. Sin embargo, es importante recalcar que los dos estudios evaluaron conductos venosos.

Para conductos bioabsorbibles, Mackinnon y Dellon (1990) encontraron una excelente regeneración usando conductos sintéticos a base de colágeno, utilizados para puentear un defecto de 2 centímetros, pero resultados pobres en defectos de 5 centímetros en un modelo utilizando primates. Los autores también reportaron resultados clínicos para el uso de conductos sintéticos de ácido poliglicólico utilizados en nervios digitales humanos, mostrando una buena recuperación de la discriminación entre dos puntos para brechas menores o iguales a 3 centímetros. Sin embargo, el tamaño promedio de los defectos reparados fue de 1.7 centímetros. Weber et al. (2000) demostró que los conductos nerviosos de ácido poliglicólico fueron superiores a los autoinjertos para la reparación de defectos menores o iguales a 3 centímetros, a pesar del hecho de que el conducto más largo implantando fue de solo 2.5 cm.

<b>USO DE ALOINJERTO DESCELULARIZADO EN REPARACIONES DE NERVIOS PERIFÉRICOS</b>	
<b>INDICACIONES</b>	<b>CONTRAINDICACIONES</b>
Autoinjerto donante inadecuado	Laceraciones limpias o brechas menores a 0.5 cm reparables sin tensión
Brechas de nervio sensitivo menor o igual a 3 centímetros	Creencias personales del paciente acerca del uso de injertos cadavéricos
Presencia de múltiples lesiones con diámetros variables	Contaminación de la herida
Como complemento de otras técnicas de injertos.	
<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Proporciona una estructura adecuada para la regeneración axonal	Costo elevado
Disminuye el riesgo de cicatrización y aparición de neuromas	No existen estudios de seguimiento a largo plazo
No hay morbilidad en el sitio donador	No hay regeneración de células nativas (Células de Schwann)
Menor tiempo quirúrgico	
Rápida disponibilidad	

**Tabla 5.** Indicaciones, contraindicaciones, ventajas y desventajas del uso de aloinjertos de nervios descelularizados.

Teóricamente, los ANA's podrían aportar resultados similares a los de un conducto bioabsorbible y venoso ya que proporciona arquitectura que es esencial para la regeneración nerviosa (Isaacs y McMurtry, 2014). Los ANA's ya han pasado por la degeneración Walleriana, con una infraestructura remanente que permite la migración de células de Schwann para llevar a cabo la regeneración axonal (Ide et al., 1983). En contraste, cuando se utilizan conductos que no tienen cimiento tisular; el cuerpo necesita formar un coágulo de fibrina estable, para darle soporte a la regeneración nerviosa. Una revisión de todos los estudios clínicos muestran que las reparaciones con ANA's pueden resultar en recuperación significativa (mayor a S3+ como está definido por la clasificación del consejo de investigación médica), con las brechas de nervio sensitivo, teniendo un rango de defectos de 1.1 a 3.4 centímetros (Tabla 6) (Cho et al., 2012).

No hay una técnica quirúrgica que haya demostrado superioridad al utilizar aloinjertos de nervio descelularizado. Los cirujanos utilizan los aloinjertos de nervio descelularizado de la misma manera que en una reparación primaria de nervio. Para los nervios digitales, muchos cirujanos usan nylon de 9-0 bajo lupa o microscopio, para realizar reparaciones del epineuro con suturas simples interrumpidas, con colocación de 4 a 5 suturas en cada sitio de neurorafia. Para nervios más grandes, nylon de 8-0 puede ser utilizada (Tang y Chauha, 2015).

Adicionalmente, envolturas bioabsorbibles o tubos, pueden ser utilizados para complementar la reparaciones por varias razones: para prevenir el escape axonal, fortalecer el sitio de reparación del nervio, prevenir aperturas, aliviar la tensión

del sitio de reparación, minimizar el material de sutura en el sitio de reparación y permitir que los axones encuentren su dirección “besando” las terminaciones nerviosas (Tang y Chauha, 2015).

Después de colocar la envoltura, los bordes que están excedentes pueden ser cortados si se necesita. Una sutura (8-0 o 9-0 de nylon) es colocada en los extremos proximal y distal, así como en la porción media de la envoltura. Estas suturas se pasan a través de epineuro para prevenir su migración. Un tubo o conducto puede ser utilizado, pero este método requiere mucha más exposición del nervio lesionado para permitir que el tubo resbale lejos del sitio de neurorrafia. Después del encajamiento, el tubo es pasado sobre el sitio de reparación y es asegurado proximal y distalmente con suturas. Si una envoltura o tubo es utilizado para mejorar la fuerza de la reparación, menos suturas pueden ser utilizadas en la reparación primaria, para ayudar a minimizar las reacciones por un cuerpo extraño (Tang y Chauha, 2015).

Estudio	Numero de reparaciones nerviosas con datos	Longitud del Injerto (mm)	Tiempo promedio a la cirugía	Tiempo de seguimiento (meses)	Resultados
Karabekmez et al. 2009	10 sensitivos (8 nervios digitales, 2 ramas dorsales sensitivas del nervio ulnar)	21.5	---	9	Discriminación estática entre dos puntos= 5.5mm
Cho et al. 2012	51 en extremidad superior	---	≤3 meses =65% ≥3 meses =35%	9.7	Discriminación dinámica entre dos puntos = 4.4mm Recuperación significativa (S3-S4, M3-M5)
	44 sensitivos (9 mixtos)	22 +/- 11	---	---	Función sensitiva 86% (70% ≤S3 +/- S4)
	15 motores (12 mixtos)	32 +/- 13	---	---	Función Motora = 80% (40% ≤ M4/M5)
Guo et al. 2013	5 sensitivos (5 digitales)	22.8	Agudo (menor o igual a 8 horas)	13.2	Discriminación entre dos puntos =6mm Semmes weinstein examinación de monofilamentos =4.4
Taras et al. 1965	18 sensitivos	11	29 días	15	Discriminación estática entre dos puntos= 7.1 mm Discriminación dinámica entre dos puntos = 5.4 mm QuickDASH final=26 VAS final = 2 Escala de taras =83% Excelente/bueno Escala de Weber = 78% excelente/bueno
Safa et al. 2014	32 sensitivos (12 mixtos)	34 +/- 9	---	10	Recuperación significativa (s3-s4, m3-m5)
	17 Motores (14 mixtos)	41 +/- 10	---	---	Función sensitiva 88% Función motora=71%

**Tabla 6.** Resultados clínicos de diversos estudios del uso de aloinjertos de nervios descelularizados.

Múltiples estudios han evaluado la eficacia clínica de los ANA's en humanos. Karabekmez et al. (2009) reportaron resultados clínicos después de la trasplatación de aloinjertos en 8 pacientes con lesiones de nervios digitales y dos pacientes con lesiones de la rama dorsal sensitiva del nervio cubital. La longitud promedio del aloinjerto fue de 2.15 cm. La discriminación estática entre dos puntos fue de 5.5 mm y la discriminación dinámica entre dos puntos fue de 4.4 mm. No hubo rechazos y todos los pacientes tuvieron resultado excelente o bueno, basado en la escala de Mackinnon.

Cho et al. (2012) evaluó los resultados del uso de ANA's utilizados en 44 lesiones de nervios sensitivos (incluyendo 9 mixtos) exclusivamente en extremidad superior. El intervalo promedio de tiempo, entre la lesión y la cirugía, fue de 6.8 meses con un tamaño promedio del defecto de 22 mm. La técnica más común de reparación fue una reparación epineural (65%). Recuperación significativa (mayor a S3) para la reconstrucción de nervios digitales (n=35) con ANA's para un defecto promedio de 23 mm fue de 86%. Si se evalúa contra un estándar más alto (mayor a S3+) la recuperación significativa en los nervios sensitivos fue de 76%. Los autores dividieron los pacientes según la longitud de su defecto nervioso y mostraron recuperación significativa (mayor a S3 y M3) del 100%, 74% y 90% para brechas de 5-14mm (10 sensitivos, 1 mixto, 1 motor), 15 a 29 mm (16 sensitivos, 2 mixtos y un motor) y 30-50mm (9 sensitivos, 10 mixtos 1 motor) respectivamente.

Guo et al. (2013) reportaron los resultados de 5 pacientes con lesiones de los nervios digitales con un tamaño promedio de 23 mm de nervios digitales tratados con ANA's. Los autores no reportaron rechazos, un promedio de discriminación entre dos puntos de 6 mm en un seguimiento promedio de 13 meses, y un promedio en la prueba de Semmes-Weinstein de 4.3.

Taras et al. (2013) reportaron resultados de 18 reparaciones de nervios con defectos mayores a 30 mm utilizando ANA's. El intervalo promedio desde la lesión a la cirugía fue de casi un mes; sin embargo, el rango fue de 2 hasta 262 días. El tamaño promedio del defecto fue de 11 mm y con un seguimiento promedio de 15 meses. La discriminación entre dos puntos, tanto estática como en movimiento, fue de 7 mm y 5 mm respectivamente. Aproximadamente el 83% de los pacientes tuvieron excelente o buenos resultados por la escala de Taras. Los resultados de QuickDASH (discapacidad de brazo, hombro y mano) también se obtuvieron y mostraron un promedio de mejoría de 18.4 puntos (promedio inicial 44.8 y promedio final de 26.3). Ninguno de estos pacientes tuvo rechazo del injerto. En general, la reparación de nervios sensitivos utilizando ANA's ha mostrado resultados prometedores. Estudios han demostrado que la recuperación significativa (mayor a S3) puede ser obtenida con reparaciones con ANA's con defectos de los nervios sensitivos con rango entre 1.1 a 2.3 cm (Tabla 6).

# CAPÍTULO 12

## Conclusiones



## CAPÍTULO 12

### CONCLUSIONES

1. El tratamiento con detergentes por 15 días descelularizó y conservó efectivamente la matriz extracelular del nervio en buen estado, para su posterior uso como un aloinjerto en un modelo de lesión nerviosa periférica de nervio ciático en rata.
2. Se observó una mayor remielinización en el nervio recelularizado con células de Schwann de rata diferencias *in vitro* con factores de diferenciación.
3. El análisis morfológico demostró una mayor intensidad de señal de mielina en el grupo recelularizado al compararlo con el grupo autoinjerto y descelularizado. A las 16 semanas no existió diferencia en este parámetro entre la extremidad control y la extremidad experimental del grupo recelularizado.
4. Las pruebas funcionales arrojaron diferencias significativas a las 16 semanas en el IFC, entre el grupo recelularizado y los grupos autoinjerto y descelularizado.
5. El presente estudio sienta las bases morfológicas y funcionales para la posterior realización de estudios similares en defectos nerviosos humanos.
6. Es el primero en utilizar células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, diferenciadas mediante factores de crecimiento a células de Schwann, para su uso en nervios previamente descelularizados.

# CAPÍTULO 13

## Referencias

## CAPÍTULO 13

### REFERENCIAS

1. Albersen M, Fandel TM, Lin G, et al. Injections of adipose tissue-derived stem cells and stem cell lysate improve recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *J Sex Med* 2010; 7(10):3331-3340.
2. Albert E. Einige Operationen an Nerven. *Wien Med Presse* 1885; 26:1285-128.
3. Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, VonHolst H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology* 2009; 32(3) 217–228.
4. Badylak S, et al. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13: 27–53.
5. Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010; 46(7):1181-1188.

6. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(5):608-616.
7. Brooks DN, Weber RV, Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, et al. Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery* 2012; 32(1): 123-123.
8. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical focus* 2004; 16(5): 1-7.
9. Bushnell BD, McWilliams AD, Whitener GB, Messer TM. Early clinical experience with collagen nerve tubes in digital nerve repair. *J Hand Surg [Am]*. 2008; 33(7):1081-7.
10. Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, de la Garza-Castro Ó, Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S. Estudio de la lesión nerviosa periférica en pacientes atendidos por traumatismos. *Gaceta Médica de México* 2014; 150: 527-532.
11. Chiu DT, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86(5):928-934.

12. Cho MS, Rinker BD, Weber RV, et al. Functional outcome following nerve repair in the upper extremity using processed nerve allograft. *J Hand Surg Am* 2012; 37 (11):2340-2349.
13. Deal DN, Griffin JW, Hogan MV. Nerve conduits for nerve repair or reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg* 2012; 20(2):63-68.
14. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2010; 63(9): 1544– 1552.
15. Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery* 2009; 29(8): 644-649.
16. Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec* 2001; 4: 396–404.
17. Evans PJ, Mackinnon SE, Midha R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, et al. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery* 1999; 19:115–127.
18. Fox IK, Jaramillo A, Hunter DA, Rickman SR, Mohanakumar T, Mackinnon SE. Prolonged cold-preservation of nerve allografts. *Muscle Nerve* 2005; 31:59–69.

19. Goel RK, Suri V, Suri A, Sarkar C, Mohanty S, Sharma MC, Yadav PK, Srivastava A. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci* 2009; 16:1211–1217.
20. Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *BioMed research international* 2014; DOI: 10.1155/2014/698256.
21. Gulati AK, Cole GP. Nerve graft immunogenicity as a factor determining axonal regeneration in the rat. *J Neurosurg* 1990; 72:114-120.
22. Guo Y, Chen G, Tian G, Tapia C. Sensory recovery following decellularized nerve allograft transplantation for digital nerve repair. *J Plast Surg Hand Surg* 2013; 47(6): 451-453.
23. Haase SC, et al. Recovery of muscle contractile function following nerve gap repair with chemically acellularized peripheral nerve grafts. *J Reconstr Microsurg* 2003; 19:241-244.
24. Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1986; 12:27–46.

25. Heath CA, Rutkowski GE. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral nerve regeneration. *Trends Biotechnol.* 1998; 16:163–168.
26. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthop Clin North Am.* 2000; 31(3):485– 98.
27. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* 2004; 10: 1346–1358.
28. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004; 10(11–12):1641–51.
29. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004; 10(11):1641–1651.
30. Ide C, Osawa T, Tohyama K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Prog Neurobiol.* 1990; 34(1):1–38.
31. Ide C, Tohyama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 1983; 288:61-75.

32. Isaacs J, McMurtry J. Different nerve grafting and wrapping options in upper extremity surgery. *Curr Orthop Pract* 2014; 25:456-461.
33. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 1982; 5: 335-337.
34. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cellfree extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 1982; 5:335-344.
35. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand* 2009; 4: 245-249.
36. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 2000; 18: 2-9.
37. Kim BS, Yoo JJ, Atala A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res A* 2004; 68:201-209.
38. Lin CS, Xin ZC, Deng CH, et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol* 2010; 25:807-815.



39. López-Guerra GG. Descelularización de nervio ciático de rata y su posterior recelularización *in vitro* con células de Schwann. [Tesis de Maestría]. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2014, Monterrey, Nuevo León, México.
40. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000; 25(3):391–414.
41. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107(6):1419–29.
42. Mackinnon SE. Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.* 1989; 16(3):587–603.
43. Mackinnon SE, Dellon AL. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. *J Reconstr Microsurg* 1990; 6(2):117-121.
44. Madison R, DaSilva CF, Dikkes P, et al: Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 1985; 88:767-772.

45. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol.* 1994; 23 (1):1–28.
46. Matsumoto K, Ohnishi K, Sekine T, Ueda H, Yamamoto Y, Kiyotani T, et al. Use of a newly developed artificial nerve conduit to assist peripheral nerve regeneration across a long gaps in dogs. *ASAIO.* 2000; 46:415–20.
47. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2002; 18:97–109.
48. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin* 2013; 29(3): 317-330.
49. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Acellular nerves allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study. *Muscle Nerve* 2011; 44: 221-234.
50. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol* 2008; 212:370–376.

51. Nagao RJ, Lundy S, Khaing ZZ, Schmidt CE. Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. *Neurological Research* 2011; 33(6): 600-608.
52. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinase and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3):562-573.
53. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:287-309.
54. Noble J, Munro CA, Prasad VS, et al. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998; 45: 116–122.
55. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998; 45:116–122.
56. Osawa T, Ide C, Tohyama K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts in mice. *Arch Histol* 1986; 49: 69-72.

57. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007; 25:2896–2902.
58. Rappaport WD, Valente J, Hunter GC, Rance NE, Lick S, Lewis T, et al. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg.* 1993; 166(3):252–256.
59. Reid AJ, Sun M, Wiberg M, Downes S, Terenghi G, Kingham PJ. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience* 2011; 199: 515–522.
60. Ribeiro-Resende VT, Pimentel-Coelho PM, Mesentier-Louro LA, Mendez RM, Mello-Silva JP, Cabral-da-Silva MC, de Mello FG, de Melo Reis RA, Mendez-Otero R. Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increases peripheral nerve regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. *Neuroscience* 2009; 159:540–549.
61. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 2000; 161: 571-84.
62. Safa B, Greenberg JA, Thayer WP, Ko JH, Cho M, Buncke GM: Functional recovery from the utilization of processed nerve allografts for large gap nerve

discontinuities: Outcomes from a national registry study. Presented at 69th American Society for Surgery of the Hand Annual Meeting, September 18, 2014.

63. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 1943; 66:237–288.
64. Sondell M, et al. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Research* 1998; 795: 44-54.
65. Sondell M, Lundborg G, Kanj M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* 1998; 44: 795-798.
66. 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.
67. Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llena J. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996; 12(8):521-527.
68. Sun F, Zhou K, et al. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neuroscience Letters* 2011; 499(2):104–108.

69. Sunderland S. Nerves and nerve injuries, 2 ed. London: Churchill Livingstone, 1978.
70. Tang P, Chauhan A. Decellular nerve allografts. *J Am Acad Orthop Surg* 2015; 23: 641-647.
71. Taras JS, Amin N, Patel N, McCabe LA. Allograft reconstruction for digital nerve loss. *J Hand Surg Am* 2013; 38(10): 1965-1971.
72. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006; 20(1): 9-22.
73. Totey S, Pal R. Adult stem cells: a clinical update. *J Stem Cells* 2009; 4:105–121.
74. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol* 2010; 29(8):690-700.
75. Walsh S, Biernaskie J, Kemp SW, Midha R. Supplementation of acellular nerve grafts with skin derived precursor cells promotes peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 2009; 164:1097–1107.

76. Wang D, Liu XL, Zhu JK, Jiang L, Hu J, Zhang Y, Yang LM, Wang HG, Yi JH. Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res* 2008; 1188:44–53.
77. Wavreille G, Baroncini M, Fontaine C. Anatomía, histología y fisiología del nervio periférico. *EMC-Aparato Locomotor* 2011; 44(1): 1-9.
78. Weber RA, Breidenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(5):1036–45.
79. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83(3):835-870.
80. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve* 2009; 39:787–99.
81. Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg Br* 1998; 23:433–437.

82. Zhang Y, Luo H, Zhang Z, et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal cells. *Biomaterials* 2010; 31: 5312-5324.

83. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 2010; 21:1783-1787.



# CAPÍTULO 14

## Resumen Autobiográfico

# CAPÍTULO 14

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Dr. Mauricio Manuel García Pérez**

Candidato para el grado de Doctor en Medicina

**Tesis:** Valoración funcional de ratas con aloinjerto de nervio descelularizado

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud (Cirugía Plástica y Reconstructiva)

Número de Páginas: 163

### Biografía

**Datos Personales.** Originario de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

**Educación.** Licenciatura en Médico Cirujano y Partero, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (1996), Especialista en Cirugía General en el Centro Médico Nacional del Noreste, Hospital de Especialidades No. 25 Instituto Mexicano del Seguro Social (2002), Subespecialidad en Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la

Universidad Autónoma de Nuevo León (2005), Fellowship y Diplomado Avanzado en Cirugía de la Mano y Microcirugía en el Servicio de Ortopedia del Instituto Nacional de Rehabilitación de la Secretaría de Salud UNAM (2006), Fellowship y Diplomado Avanzado en Microcirugía Plástica y Reconstructiva en el Hospital Gea González y Hospital Ángeles del Pedregal y de Interlomas de la Secretaría de Salud UNAM (2007).

**Experiencia Profesional.** Profesor del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la UANL (1996 y 2001), Jefe y Profesor de tiempo completo de Pregrado y Posgrado del Servicio de Cirugía Plástica de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL Cirujano Plástico en la Clínica de Mano y Microcirugía desde Marzo del 2007 hasta la fecha. Profesor del Curso de Cirugía II en la Unidad de Cirugía Plástica de la Facultad de Medicina de Universidad de Morelos desde Marzo del 2007 hasta la fecha. Cirujano Plástico adjunto de la Fundación DEBRA México para niños con Epidermolisis Bullosa desde Marzo de 2007. Cirujano Plástico del Staff de Médicos del Instituto Nuevo Amanecer en la Clínica de Mano y Extremidad Superior en pacientes con afecciones neurológicas desde Marzo de 2007 hasta la fecha. Coordinador Nacional de las Campañas Extramuros de la Asociación Mexicana de Quemaduras durante el periodo de Mayo 2010 hasta Abril 2012. Miembro de la Mesa Directiva 2012-2014 de la Asociación Mexicana de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva, A.C. en el Comité Científico en la División Reconstructiva. 2012 - 2014.

**Asociaciones o Sociedades a las que pertenece:**

- x Colegio Noreste de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva (CONCOPER)
- x Asociación Mexicana de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva A.C. (AMCOPER)
- x Federación Ibero Latinoamericana de Cirugía Plástica y Reconstructiva (FILACP)
- x Asociación Mexicana de Quemaduras A.C. (AMQ)
- x Federación Latinoamericana de Quemaduras (FELAQ)
- x Sociedad Mexicana de Cirugía de Mano y Microcirugía (SMCMM)
- x Sociedad de Ex-Residentes del Hospital Universitario de la UANL

# CAPÍTULO 15

## Anexos

- 15.1 Deshidratación de muestras fijadas
  - 15.1.1 Deshidratación de muestras fijadas.
- 15.2 Desparafinización y montaje
  - 15.2.1 Desparafinización de cortes incluidos en parafina
  - 15.2.2 Deshidratación y montaje de los cortes ya teñidos
- 15.3 Preparación de soluciones para la tinción de hematoxilina y eosina
  - 15.3.1 Hematoxilina de Gil
  - 15.3.2 Eosina
  - 15.3.3 Solución de Alcohol-Ácido (decolorador o decolorante)
  - 15.3.4 Solución de Agua Amoniacal (Virador)
- 15.4 Preparación de soluciones para la tinción de Marsland, Glee y Erickson
  - 15.4.1 Solución de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 20%
  - 15.4.2 Solución de  $\text{AgNO}_3$  amoniacal
- 15.5 Preparación de soluciones para la tinción de tricrómico de masson
  - 15.5.1 Solución de Fucsina ácida y escarlata de Biebrich.
  - 15.5.2 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.
  - 15.5.3 Solución de azul de anilina
  - 15.5.4 Solución acuosa de ácido acético al 1%
- 15.6 Preparación de soluciones para la tinción klüver-barrera
  - 15.6.1 Azul de luxol 0.1%
  - 15.6.2 Violeta de cresilo 0.1%
  - 15.6.3 Carbonato de litio 0.05% (p/v)

# CAPÍTULO 15

## ANEXOS

### 15.1 Deshidratación de muestras fijadas

#### 15.1.1 Deshidratación de muestras fijadas

1. Sumergir las muestras en alcohol etílico al 60% por 1h
2. Transferir a alcohol etílico al 70%, 80% y 96%, dejar por 1h en cada uno de los alcoholes
3. Enseguida, transferir a alcohol etílico absoluto por 1h (dos cambios)
4. Trasferir a una solución de etanol absoluto: xilol (1:1) por 1 hr
5. Luego, a xilol por 1h (dos cambios)
6. Por último, en parafina líquida por 1h (dos cambio)

### 15.2 Desparafinización y montaje

#### 15.2.1 Desparafinización de cortes incluidos en parafina

1. Colocar los cortes en la estufa a 60°C por 10 min
2. Colocar los cortes en xilol por 5 min
3. Pasar los cortes a una mezcla de xilol-etanol por 5 min
4. Transferir a etanol absoluto por 2 min
5. Transferir a etanol 96° por 2 min
6. Enjuagar en agua destilada

### 15.2.2 Deshidratación y montaje de los cortes ya teñidos

1. Colocar los cortes ya teñidos en etanol 96° de 10 a 20 seg y luego por 1 min
2. Transferir los cortes a etanol absoluto por 2 min (dos cambios)
3. Colocar los cortes en mezcla de xilol-etanol por 3 min
4. Transferir los cortes a xilol por 2 min (dos cambios)
5. Colocar una gota de entellan sobre el portaobjetos y sobre esta se coloca el cubreobjetos, procurando no dejar burbujas entre ellos

## **15.3 Preparación de soluciones para la tinción de hematoxilina y eosina**

### 15.3.1 Hematoxilina de Gil

Mezclar 730 ml de agua destilada + 250 ml de etilenglicol + 2.0 g de Hematoxilina anhídrida en polvo (si son cristales pesar 2,36 g) + 0.2 g de yodato de sodio + 17.6 g de sulfato de aluminio + 2 ml de ácido acético glacial. La solución se prepara en el orden en que están listados los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1hr. Filtrar la primera vez antes de usar.

### 15.3.2 Eosina

Pesar 1 g de eosina amarillenta y disolver en 20 ml de agua destilada + 80 ml de alcohol 96°. De esta solución concentrada, tomar una parte y agregarla en tres partes del alcohol 80°. Antes de usar agregar 0.5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante preparado y agitar.

### 15.3.3 Solución de Alcohol-Ácido (decolorador o decolorante)

Mezclar 1 ml de HCl concentrado + 99 ml de alcohol 70°.

### 15.3.4 Solución de Agua Amoniacal (Virador)

Mezclar 1ml de  $\text{NaH}_4\text{OH}$  + 99 ml de agua destilada.

## **15.4 Preparación de soluciones para la tinción de Marsland, Glee y Erickson**

### 15.4.1 Solución de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 20%

Pesar 6 g de  $\text{AgNO}_3$  y disolver en 30 ml de agua desionizada para evitar la formación de precipitados de plata. Proteger la solución de la luz.

### 15.4.2 Solución de $\text{AgNO}_3$ amoniacal

Preparar 30 ml de  $\text{AgNO}_3$  20% + 20 ml de etanol absoluto. A la solución anterior se le adiciona hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado gota a gota hasta que se forme un precipitado café, se sigue agregando  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta que se disuelva el precipitado y finalmente se agregan 5 gotas más de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado.

## **15.5 Preparación de soluciones para la tinción de tricrómico de Masson**

### 15.5.1 Solución de Fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

Preparar 90 ml de escarlata de Biebrich acuosa 1% + 10 ml de fucsina ácida acuosa 1% + 1 ml de ácido acético glacial.



15.5.2 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Pesar 5 g de ácidofosfomolibdico, 5 g de ácido fosfotúngstico y disolverlos en 200 ml de agua destilada.

15.5.3 Solución de azul de anilina

Pesar 2.5 g de azul de anilina, disolverlos en 100 ml de agua destilada y agregar al final 2 ml de ácido acético glacial.

15.5.4 Solución acuosa de ácido acético al 1%

Mezclar 1 ml de ácido acético glacial en 99 ml de agua destilada

## **15.6 Preparación de soluciones para la tinción klüver-barrera**

15.6.1 Azul de luxol 0.1%

Pesar 0.1 g de azul de luxol, disolverlo en 100 ml de etanol 96° y agregar al final 0.5 ml de ácido acético glacial.

15.6.2 Violeta de cresilo 0.1%

Pesar 0.1 g de violeta de cresilo, disolverlo en 100 ml de agua destilada y filtrar (papel filtro). Agregar al final 15 gotas de ácido acético glacial al 10%.

15.6.3 Carbonato de litio 0.05% (p/v)

Pesar 0.05 g de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y disolverlo en 100 ml de agua destilada.