

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“DESCELULARIZACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS HUMANOS

IN VITRO: FASE 1”.

Por

DR. EDGAR ARTURO PEÑARRIETA DAHER

**Como requisito para obtener el grado de
Especialista en**


CIRUGÍA PLÁSTICA ESTÉTICA Y RECONSTRUCTIVA

Diciembre 2023

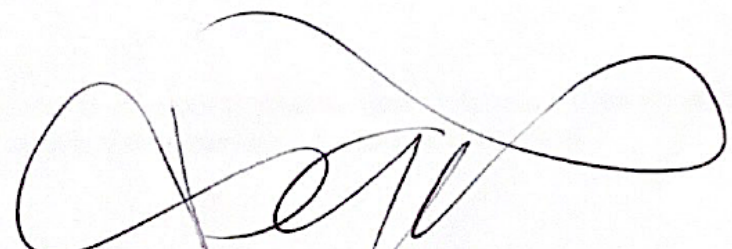
“DESCELULARIZACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS HUMANOS *IN*

VITRO: FASE 1”.

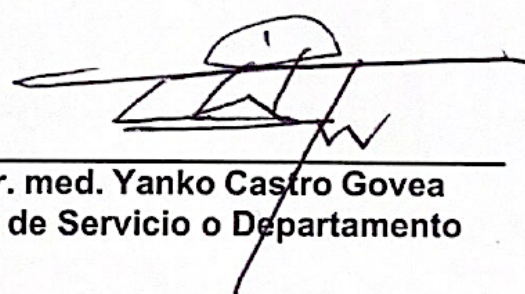
Aprobación de la tesis:



**Dr. med. Mauricio Manuel García Pérez
Director de la Tesis**



**Dr. Iram González Zeyn
Co – Director de Tesis**



**Dr. med. Yanko Castro Govea
Jefe de Servicio o Departamento**



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de titulación va dedicado principalmente a mis padres y hermanos, dado que me han acompañado en este largo proceso de entrenamiento brindandome su apoyo sin dudar jamás que este día llegaría.

Agradezco a los diferentes maestros oficiales que me guiaron durante las diferentes etapas de mi formación; incluyo también al equipo de investigación de Banco de Hueso y Tejidos en conjunto con el de Cirugía Plástica y Reconstructiva en especial al Dr. Félix Vilchez, Dra. Yadirá Tamez, Dra. Yosira López y Dr. Mauricio M. García Pérez por invitarme a formar parte de este proyecto..

Finalmente a mis compañeros con quienes compartí altas y bajas, logros, retos y sana competencia a lo largo del camino.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Pagina
1. RESÚMEN	2
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	5
Capítulo III	
3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	10
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	11
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
Capítulo VI	
6. RESULTADOS	40
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	60
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN	62
Capítulo IX	
9. DECLARACIONES	63
Capítulo X	
10. BIBLIOGRAFÍA	64
Capítulo XI	
10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	71

LISTA DE ABREVIATURAS

mm: milímetros.

Cols.: colaboradores

vs: versus

Dr: Doctor

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León.

E.: Eleuterio

USA: United States of America. Estados Unidos de América

c/u: cada uno.

LNP: Lesión de nervio periférico

NPH: Nervio periférico humano

HYE: Hematoxilina y eosina

TCM: Tricrómico de Mason

PAS: Ácido Periódico de Schiff

MEC: Matriz extracelular

CMM: Células madre mesenquimales

CtS: Células tipo Schwann

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

RPBI: Residuo Peligroso Biológico Infeccioso

PBS: Buffer Fosfato Salino

RESÚMEN.**INTRODUCCIÓN.**

La lesión de nervio periférico (LNP) humano resulta en una interrupción parcial o total de la fisiología normal del nervio y es una de las causas más frecuentes de pérdidas sensitiva y motor que impactan negativamente en la productividad de los adultos jóvenes. El “gold standard” de tratamiento quirúrgico son los autoinjertos de nervio, no obstante éstos se caracterizan por contar con una disponibilidad y longitud limitadas, morbilidades del sitio donante, neuromas e incluso tener pérdidas axonales y/o necrosis parcial.

OBJETIVO.

Este estudio tuvo el objeto de desarrollar un aloinjerto de nervio descelularizado humano.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Ensayo *in vitro*: experimental, analítico, longitudinal, prospectivo y comparativo. Para este estudio, se obtuvieron siete tejidos de NPH (nervio periférico humano), remanentes de procedimientos quirúrgicos de pacientes adultos, de al menos 20 mm de longitud, aparentemente sanos, sin distinción de género que voluntariamente aceptaron donar su nervio. A cinco nervios se les realizó el protocolo de descelularización y dos se procesaron como controles. Para el análisis histológico, se trataron mediante la técnica histológica convencional, obteniendo cortes longitudinales y axiales de las zonas distal y proximal. Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina (HYE), Tricrómico de Masson (TCM) y ácido periódico de Schiff (PAS).

Los cortes histológicos fueron analizados mediante microscopía óptica, se tomaron fotografías y fueron procesadas a través del programa Image J, para evaluar el proceso de descelularización y analizar el grado de conservación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Para el análisis estadístico se utilizaron los softwares SPSS, Graph Pad Prism; y ANOVA para determinar la diferencia entre las medidas de los diferentes grupos.

RESULTADOS.

Al finalizar el estudio se encontraron diferencias entre las tres diferentes regiones de las muestras, en las que se observan conservación de polisacáridos, conservación de la estructura y disminución de conteo celular.

CONCLUSIONES

Las técnicas de descelularización a base de detergentes promueven la remoción celular, preservación de polisacáridos y colágeno, necesaria para la recelularización del andamio con células tipo Schwann, aunque los resultados son favorecedores, se determinó que se es necesaria una mayor remoción celular. Para esto, se requieren modificaciones en la técnica de la preparación del andamio.

INTRODUCCIÓN.

La lesión de nervio periférico (LNP) resulta en una interrupción parcial o total de la fisiología normal del nervio y es una de las causas más frecuentes de pérdida sensitiva y motor que impactan negativamente en la productividad de los adultos jóvenes¹.

Su prevalencia ha sido descrita del 1.3 al 2.8% en lesiones traumáticas, dentro de las que se incluyen las heridas por arma blanca, accidentes viales, trauma directo y/o heridas por proyectil de arma de fuego. Principalmente se localizan en extremidad superior (61%), extremidad inferior (15%) y cara (14%). Las secuelas de estas lesiones representan un problema de salud pública, que impacta negativamente a nivel socioeconómico y genera una discapacidad funcional en los pacientes².

El tratamiento del nervio periférico se clasifica según el tiempo de la intervención en relación con el momento de la lesión en agudo (<7 días) o crónico (>7 días); además del tipo de reparación³. La neurorrafia primaria consiste en coaptar por medio de sutura los cabos nerviosos y se prefiere cuando la lesión ocurre por un corte nítido y/o cuando la brecha entre los cabos pequeña. La recuperación funcional es de buen pronóstico (80%) cuando la reparación quirúrgica ocurre dentro de los 14 días posteriores a la lesión nerviosa; siendo relación tiempo-intervención inversamente proporcional a la recuperación de función esperada⁴. Sin embargo, pese al avance microquirúrgico en los años

recientes los resultados del grado funcional continúan siendo subóptimos, con reportes de pacientes que indican una satisfacción menor al 50% en relación con la función motora posquirúrgica⁵.

Cuando la distancia entre los cabos de la lesión nerviosa es mayor a 3-5 cm, o cuando la coaptación de éstos genera tensión; es preferible la reconstrucción con “cables” de injertos de nervio. El número de cables nerviosos es directamente proporcional al diámetro del nervio lesionado, pudiendo llegar a requerirse hasta 3 para los nervios cubital, mediano y radial⁶.

El injerto de nervio puede provenir del mismo sujeto (autoinjerto), otro individuo de la misma especie (aloinjerto) o incluso de otra especie (xenoinjerto), siendo los autoinjertos considerados como estándar de oro. Sin embargo, éstos tienen una limitada disponibilidad (nervio safeno cutáneo, cutáneo antebraquial medial, cutáneo antebraquial lateral y sural) y longitud, dejando una zona donante hipo- o anestésica y pudiendo desarrollar cierto grado de necrosis⁷.

Es por ello, hay líneas de investigación dedicadas a alternativas quirúrgicas para su reconstrucción⁸. Los aloinjertos de nervio periférico presentan una aplicación terapéutica prometedora, ofreciendo un andamiaje tisular, más disponibilidad, e inclusive brindar el mismo calibre y tipo de nervio lesionado en caso de obtenerse de donante cadavérico.

La principal desventaja del aloinjerto radica en el rechazo inmunológico debido a la persistencia del complejo de histocompatibilidad⁹. Por lo que se necesitan de medicamentos inmunosupresores cuyos efectos secundarios pueden ser contraproducentes disminuyendo la velocidad regenerativa de las células de Schwann, además de generar una morbilidad clínica en el paciente¹⁰.

Ante esta situación, los protocolos de descelularización de nervio base de detergentes¹¹ tienen como objetivo eliminar los componentes celulares inmunogénicos, conservando la matriz extracelular (MEC) suficiente para la regeneración axonal del injerto¹²⁻¹³.

Existe evidencia que recelularizar los aloinjertos descelularizados con células derivadas de células madre mesenquimales (CMM) autólogas incrementa los factores de crecimiento en el sitio en proceso de regeneración nerviosa y genera su velocidad de conducción por efecto sinérgico impactando positivamente los resultados funcionales¹⁴. Inclusive, se ha reportado estudios sobre la funcionalidad y capacidad regenerativa equiparable con la del autoinjerto de nervio¹⁵.

Las MSC provenientes de la fracción vascular estromal del tejido adiposo presentan ciertas ventajas como son: su obtención por incisiones mínimas, proliferación veloz, diferenciación a células tipo Schwann e incluso efectos inmunomoduladores, situándolas como una innovadora área de oportunidad clínica y de investigación¹⁶.

Una pérdida de continuidad en el nervio periférico induce la activación de las células de Schwann en el cabo distal al igual que un aumento en la expresión de receptores para factores de crecimiento que funcionan como una guía quimotáctica durante la regeneración del axón¹⁷.

Actualmente se ha comprobado la relevancia de la utilización de las células de Schwann en la regeneración neural en dos circunstancias clínicas:

- 1) La extracción, cultivo y aplicación de células de Schwann autólogas en

reparaciones de nervio brindando resultados favorables a largo plazo mejorando sensibilidad, función y disminución de dolor neuropático¹⁸.

2) Estudios recientes describen el empleo de aloinjertos descelularizados comerciales (Avance®) recelularizados con CMM derivadas de tejido adiposo humano *in vitro*, generando resultados positivos respecto al crecimiento y distribución celular¹⁹.

El equipo de investigación del Banco de Órganos y Tejidos del Hospital Universitario se ha interesado en el estudio de la reparación de LNP por medio de la aplicación de la terapia celular en conjunto con injertos de MEC. En primera instancia lograron diferenciar CMM derivadas de tejido adiposo a células tipo Schwann (CtS), inducidos con factores de crecimiento²⁰.

Subsecuentemente, realizaron un estudio en el que se sometió a un grupo de ratas Wistar para reparación de una lesión de nervio ciático de 15 mm con interposición de aloinjertos descelularizados con un protocolo modificado²¹. Reportando una mayor mejoría en los grupos de aloinjerto descelularizado en relación con el grupo de autoinjerto.

Dentro de los hallazgos morfológicos, se apreció una re-mielinización en los cabos proximales al igual que una superioridad en la re-mielinización de los cabos distales del grupo de aloinjerto recelularizado con células tipo Schwann en comparación con el grupo de aloinjerto descelularizado²²⁻²³.

Finalmente, se utilizó modelo animal ovino, en el que se evaluó la capacidad regenerativa y funcional de un xenoinjerto de origen humano, celularizado *in vitro* con Células tipo Schwann alogénicas lesiones de nervio periférico siendo comparadas contra autoinjertos, con evaluación a seis meses.

Mostrando una regeneración y función equiparables en ambos grupos²⁴.

III

JUSTIFICACIÓN.

En este estudio, se planteó encontrar un método eficaz de descelularización de un aloinjerto humano. Esto con la finalidad de hacer más eficiente la terapia con ingeniería de tejidos y que pueda ser aplicada en la clínica y pueda ser considerada como una opción terapéutica en las LNP.

Los pacientes con LNP presentan un compromiso importante en la funcionalidad del miembro afectado. Ante esta situación, se pretende proporcionar una solución a la incapacidad motora y funcional de la extremidad afectada mediante la aplicación de las ciencias básicas y clínicas.

De tal forma que el paciente recupere su bienestar y pueda reincorporarse a sus actividades diarias y laborales, por lo que el desarrollo inicial del estudio tiene el alcance *in vitro*.

HIPÓTESIS

- A. **Hipótesis alterna:** Las técnicas de descelularización a base de detergentes y condroitinasa promueven una adecuada remoción celular y una adecuada preservación de la matriz extracelular, necesaria para la recelularización exitosa del andamio con células tipo Schwann.

- B. **Hipótesis nula:** Las técnicas de descelularización a base de detergentes y condroitinasa no promueven una adecuada remoción celular y una adecuada preservación de la matriz extracelular, necesaria para la recelularización exitosa del andamio con células tipo Schwann.

OBJETIVOS.

A. Objetivo general:

Evaluar el protocolo de descelularización de nervio periférico ya existente en modelos animales (murino y bovino) previamente estudiados por el equipo de investigación de Banco de Hueso y Tejidos para lograr una descelularización *in vitro* de nervios periféricos humanos de pacientes del *Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.*

B. Objetivos particulares:

Determinar el tiempo exposición, la concentración requerida de solventes y condroitinasa para lograr una adecuada descelularización *in vitro* de nervio periférico humano.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se trata de un ensayo *in vitro*: experimental, analítico, longitudinal, prospectivo y comparativo; enfocado en la fase 1 que corresponde a la descelularización de nervio periférico humano (NPH). Se efectuó bajo la colaboración de los servicios de Ortopedia y Traumatología por medio de su división de Banco de Hueso y Tejidos; al igual que con el servicio de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva, ambos correspondientes al Hospital Universitario “Dr. José E. González”. La evaluación histológica del tejido nervioso fue realizada con la colaboración del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL.

Diseño metodológico del estudio.

Ensayo in vitro

- Estudio experimental
 - Prospectivo
 - Longitudinal
 - Analítico
 - Comparativo
 - No ciego

Población de estudio.

- Pacientes que requirieron manejo quirúrgico como tratamiento de LNP con una brecha mayor a 3 cm.
- Tamaño de muestra fue calculado con base a lo descrito previamente²⁶ y según los insumos disponibles en el laboratorio, se determinó que para este estudio se emplearán 7 segmentos de nervio periférico de 20 mm de longitud (14 segmentos de 10 mm).

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de lesión traumática de nervio periférico no candidatos a neurografía primaria.
- Ambos géneros.
- Nervios periféricos humanos remanentes de cirugías de reconstrucción nerviosa con interposición de injertos de nervio sural, antebraquial cutáneo medial y/o lateral.

Criterios de exclusión

- Antecedente o diagnóstico de neuropatía periférica crónicodegenerativa.
- Antecedente o diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Criterios de eliminación

- Remanente de nervio periférico insuficiente (<20 mm) para el estudio
- Estado de conservación /preservación de la muestra del nervio periférico subóptimo para el estudio.

El presente protocolo de investigación científica fue aprobado el Comité de Ética en Investigación y por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José E. González”, UANL con el número de registro OR21-00001.

Metodología.

Fase 1: Descelularización *in vitro*

1) **Procuración del nervio periférico:** Se incluyeron a los pacientes que acudieron al Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, con diagnóstico de lesión de nervio periférico en quienes se necesitaba una toma de injerto autólogo de nervio sural e interposición de este, para lograr una coaptación de los cabos proximal y distal durante el periodo comprendido de febrero del 2022 a febrero del 2023.

Considerando que por lo general en este tipo de cirugías suelen desecharse remanentes de nervio periférico de mayores o iguales a 20 mm post-neurorrafia; se optó por conservarlos para utilizarse en este estudio *in vitro*. El tejido se manipuló como Residuo Peligroso Biológico Infeccioso (RPBI), bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL- SSA1-2002, 2003)²⁷.

Las muestras de nervio periférico fueron únicamente procuradas de pacientes quienes aceptaron participar en el estudio; las cuales sunsecuentemente fueron preparadas en cuarto limpio clase 5 y conservadas en Buffer Fosfato Salino (PBS) 1x pH 7.4 para su traslado y procesamiento final.

2) **Consentimiento informado:** Cuando el paciente aceptaba participar se le explicaba verbalmente y a detalle en qué consistía el estudio, en conjunto con las potenciales ventajas al avance de la comunidad científica que podrían lograrse al donar el remanente nervioso de su reparación quirúrgica.

A los pacientes se les permitió libremente la lectura del consentimiento informado sin la presencia de los investigadores y una vez que

concluida su lectura; se les preguntó y aclaró cualquier duda antes de proceder a la firma voluntaria del consentimiento informado.

La participación o retiro del sujeto de investigación del estudio fue completamente voluntaria. Cuando el sujeto de investigación no puede otorgar su consentimiento personalmente en forma de rubrica, se le solicitó a un familiar inmediato firmar por el paciente después de haberle explicado en qué consiste la investigación, siempre y cuando el paciente estuviera de acuerdo. En todo tiempo se procuró la presencia de testigos, fueran familiares, personal de la salud y/o personal administrativo. (Anexo 3)

3) **Confidencialidad:** La información recabada durante este estudio fue recopilada en nuestras bases de datos, evitando el nombre completo y la dirección de los sujetos de investigación; manteniendo así su anonimato. Sin embargo, si se recopilaban datos como las iniciales del hombre, género, edad y padecimientos del sujeto. El recabar esta información tuvo como finalidad garantizar la integridad científica del estudio, misma que se resguardó en el sitio de investigación y sólo era accesible para los miembros del equipo de investigación.

4) **Descelularización:** La descelularización del nervio fue a base de sulfobetainas²⁸⁻²⁹, y se le adicionó condroitinasa³⁰. La secuencia consistió en disecar el nervio donado y almacenarlo a -20°C hasta su procesamiento. Para el cual se descongelaron a temperatura ambiente y se lavaron secuencialmente

en agitación, con el siguiente método: agua a 4°C por 6 horas, sulfobetaina-10 125 mM en buffer de extracción (10 mM buffer de fosfatos, pH 7.2 + 150 mM NaCl o cualquier solución salina fisiológica) a 25°C por 15 h, sulfobetaina-10 125 mM fresca en buffer de extracción a 25°C por 6 h, buffer de extracción a 25°C por 60 min, buffer de enjuague (buffer de fosfatos 10 mM, pH 7.2) a 25°C por 60 min, sulfobetaina-16 0.6 mM en buffer de extracción a 25°C por 15 h, sulfobetaina-16 0.6 mM fresca en buffer de extracción a 25°C por 6 h, buffer de extracción a 25°C por 60 min, buffer de lavado (buffer de fosfatos 10 mM, pH 7.2) a 25°C por 60 min, condroitinasa ABC 2 U/mL en PBS 1X a 37°C por 16 h, buffer de extracción a 25°C por 30 min, buffer de extracción fresco a 4°C por 15 h, buffer de enjuague a 4°C por 30 min y buffer de enjuague fresco a 4°C por 3h. Por último, llevar a PBS 1X y almacenar a -20°C (Figura 1).



Figura 1. Preparación diferentes concentraciones de buffer para preservación y descelularización

Los nervios descelularizados fueron comparados con los 2 segmentos de nervio no tratados (grupo control), con la finalidad de evaluar el grado de descelularización.

5) **Análisis morfológico y morfométrico:** Los nervios procesados y no procesados (grupo control) se trataron siguiendo la técnica histológica convencional: fijación (Anexo 1.1) y procesamiento (Anexo 1.2). Para evaluar la eliminación de los componentes celulares y la preservación de los componentes de la MEC [fibras de colágeno y lámina externa] en el nervio descelularizado, se utilizaron tinciones histológicas (anexos 2.1-2.5) con HYE y TCM para su evaluación general al igual que identificación de MEC y colágeno, respectivamente. Además, se efectuó un análisis con la tinción de PAS, que tiene mayor afinidad por los polisacáridos de la membrana basal permitiendo evaluar la preservación o integridad de su membrana extracelular.

Las laminillas fueron analizadas por microscopía óptica, con un microscopio Nikon Eclipse 50i. El análisis morfológico fue visual, estableciendo mediante escala y porcentaje el grado de descelularización en la tinción con HYE (Figura 2).



Figura 2. Análisis de los diferentes cortes histológicos para evaluación asistida por microscopía

En el análisis morfométrico realizó la cuantificación de núcleos neuronales en las laminillas teñidas con H&E, cuantificando 8 campos al azar con un aumento de 40X a usando el software Image J, comparando 3 nervios control contra los procesados, para evaluar proceso de descelularización. El grado de conservación de la MEC se determinó en las tinciones de PAS y TCM en las que se capturaron 8 campos a 40x de cada corte (longitudinal, axial distal y proximal) convertidos a archivos de 8bits para y comparar la intensidad densitométrica de los grupos controles contra los descelularizados con detergentes y condroitinasa.

Anexo 1. Técnica histológica convencional

1.1 Fijación del tejido nervioso

Sumergir las muestras en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos por 24h a 4°C, al cabo de este período cambiar el fijador por PBS 1X pH 7.4. Enseguida, el tejido se colocó en un cassette de inclusión, se rotuló y se dejó en agua destilada.

Glutaraldehído 2.5%

Glutaraldehído 25%..... 10 mL

Buffer de cacodilatos..... 90 mL

Buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.4

Solución A Cacodilato de Na..... 4.28 g

Agua destilada 100 mL

Solución B

Ácido clorhídrico..... 0.5 mL

Agua destilada 25 mL

Solución de trabajo

Solución A..... 100 mL

Solución B 5.4 mL

1.2 Procesamiento de muestras histológicas

Las muestras se lavaron y mediante un histoquinete se deshidrataron, aclararon y se preincluyeron en parafina:

- a) Deshidratar en alcoholes graduales, 1h en cada uno (70, 80, 96, 96, 100 y 100%)
- b) Transferir a una solución de alcohol-xilol (1:1) por 1h.
- c) Pasar a xilol al 100% por 1h (dos cambios).
- d) Por último, llevar a parafina líquida por 1h (tres cambios).

1.1 Inclusión, microtomía y montaje

Enseguida, los cassettes con las muestras de tejido se llevarán a la estación de inclusión y se someterán al baño de calor; el tejido se colocará de manera conveniente en un molde de inclusión, se pondrá encima la base del cassette y mediante el dispensador de parafina se rellenará el molde para hacer los bloques de tejido. Los bloques se llevarán a la cámara fría para alcanzar la consistencia necesaria para su posterior corte en secciones muy finas mediante microtomo. Por último, los cortes histológicos se llevarán a un baño de flotación, se levantarán en

laminillas previamente rotuladas y se dejarán secar en la estufa a 60°C por al menos 30min.

1.2 Desparafinado e hidratación

1. Sumergir las laminillas en xilol al 100% por 5min.
2. Transferirlas a alcohol-xilol (1:1) por 5min.
3. Llevar a alcoholes graduales, 2 min en cada uno (100, 100, 96, 96 y 80%).
4. Por último, colocar las laminillas en agua destilada por 2 min.
5. Realizar la técnica de tinción pertinente.

1.3 Deshidratación, aclaración y montaje Realizar diez inmersiones en:

- a) 2 cambios de alcohol al 96%
- b) 2 cambios de alcohol al 100%
- c) alcohol-xilol (1:1)
- d) xilol al 100%

Las laminillas se dejarán secar dentro de la campana de extracción de gases. Enseguida, se tomarán las laminillas por un extremo, se sumergirán en xilol y se eliminará el exceso para poner una gota de resina Entellan y colocar cuidadosamente un cubreobjetos.

Anexo 2. Tinciones histológicas

2.1 Tinción con hematoxilina y

eosina Cortes: 4 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Pasar las laminillas a hematoxilina por 2 min.
3. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
4. Realizar una inmersión rápida en alcohol ácido (5 s).
5. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
6. Realizar 2 inmersiones rápidas en agua amoniacal 1% (5 s).
7. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
8. Enjuagar con agua destilada.
9. Realizar 6 inmersiones en Eosina.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Hematoxilina de Gil

Agua destilada730 mL

Etilenglicol 250 mL

Hematoxilina anhídrida 2 g

Yodato de potasio 0.2 g

Sulfato de aluminio 17.6 g

Ácido acético glacial 2 mL

La solución se prepara en el orden en que están listado los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a TA durante 1 h. Filtrar (papel filtro Whatman® 20-30 µM) la primera vez antes de usar.

Eosina

Eosina amarillenta..... 1 g

Agua destilada 20 mL

Alcohol 96°..... 80 mL

De esta solución concentrada, tomar una parte y agregarla en tres partes de alcohol 80°. Antes de usar, agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado, agitar.

Solución de Alcohol-Ácido

Ácido clorhídrico concentrado..... 1 mL

Alcohol 70°99 mL

Solución de Agua Amoniacal

NaH₄OH. 1

mL

Agua destilada 99 mL

RESULTADOS

Núcleos: azul violeta

Citoplasma y fibras de colágeno: rojo-rosado

2.2 Tinción con Tricromico de Masson modificado (M-TCM).

Cortes: 4 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Usar como mordente el fijador de Bouin por 60 min a 60°C. Al cabo de este tiempo, dejar enfriar por un par de minutos, lavar con H₂O corriente hasta que el color amarillo desaparezca y dar un enjuague final con H₂O destilada.
3. Pasar a la solución de Hematoxilina férrica de Weigert durante 15 min, enseguida lavar con H₂O corriente hasta que ésta deje de teñirse y dar un enjuague final con H₂O destilada.
4. Pasar los cortes a la solución de Ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min y enjuagar brevemente con H₂O destilada.
5. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 s y lavar con H₂O corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
6. Pasar al Ácido Acético- acuoso por 2 min.

7. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

2.3 Tinción con Acido Periódico-Schiff (PAS) Cortes: 4 µm

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).

2. Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico por 5 min.

Enjuagar en H₂O corriente.

3. Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 25 min a 60°C y lavar con H₂O corriente. Revisar que tomen el color rosa pálido.

4. Diferenciar los cortes en baño sulfuroso (inmersión rápida). Enjuagar en H₂O corriente.

5. Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 2min. Enjuagar en H₂O corriente.

6. Decolorar en alcohol ácido (inmersión rápida) y lavar con H₂O corriente.

7. Virar con H₂O amoniacal y lavar con H₂O corriente.

8. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución del ácido peryódico al 0.5%.

Agua destilada 100 mL

Ácido periódico..... 0.5g

Solución de baño sulfuroso

Agua destilada 100 mL

Ácido clorhídrico (HCl) 1N 5 mL

Metabisulfito sódico al 10%..... 6 mL

Solución de metabisulfito al 10%

Disolver 10 g del reactivo en 100 mL de agua destilada

Solución de ácido clorhídrico 1N

Disolver 8.35 mL del ácido en 91.65 mL de agua destilada.

Solución del reactivo de Schiff

Reactivo comercial (Sigma-Aldrich®, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA).

RESULTADOS

Núcleos: Violeta, negro

Polisacáridos simples (glucógeno), mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, LE, glucolípidos: rosa a violeta-púrpura

2.4 Tinción con Klüver-Barrera

(KB) Cortes: 7 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar las preparaciones , llevándolas sólo hasta alcohol al 80%
2. Pasar las laminillas a solución de luxol fast blue 0.1% y dejar toda la noche a TA o en estufa a 60°C durante 90 minutos.
3. Enjuagar en alcohol 96° para remover el exceso de colorante.
4. Lavar en agua destilada hasta que deje de teñirla.
5. *Revisar al microscopio y revisar el grado de sobrecoloración.
6. Diferenciar enseguida por medio de una inmersión rápida en solución de carbonato de litio 0.05% (5-10s).
7. Lavar con agua destilada.
8. Sumergir las laminillas en solución de Violeta de Cresilo 0.1%, 5 - 10 min.
9. Enjuagar y diferenciar con una inmersión rápida en 2 cambios de alcohol 96°.
10. Deshidratar, aclarar y montar , a partir de alcohol absoluto (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución de Luxol Fast Blue al 0.1%

Luxol F.B. (Merck o Sigma).....0.1 g

Alcohol 96°... 100 mL

Disolver el colorante en el alcohol adicionar 0.5 mL de ácido acético al 10%

previamente preparado, por cada 100 mL de solución estable.

Solución de Violeta de Cresilo al 0.1%

Violeta de Cresilo q.p..... 0.1 g

Agua destilada 100 mL

Después de preparada se adicionan 10 gotas de ácido acético glacial o concentrado y la solución se filtra.

Solución de Carbonato de Litio al 0.05%

Carbonato de Litio. 0.05 g

Agua destilada 100 mL

RESULTADOS

Mielina: azul intenso

Células nerviosas y gliales: rosa a violeta

2.5 Tinción con Marsland-Glees-Eriksson

(MGE) Cortes: 10 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Lavar en agua destilada 3 min, 2 cambios.
3. Realizar una inmersión en nitrato de plata por 45 min a 37°C.

4. Lavar en formalina al 10% por 15 s.
5. Colocar en AgNO_3 amoniacal por 90 s.
6. Lavar en formalina al 10% por 1 min.
7. Enjuagar con agua destilada 3 min, 2 cambios.
8. Fijar la reacción con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 min.
9. Enjuagar con agua destilada por 3 min.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución de Nitrato de Plata (AgNO_3) al

20% AgNO_3 6 g

Agua destilada 30 mL

Proteger la solución de la luz.

Solución de AgNO_3 amoniacal

AgNO_3 al 20%. 30mL

Etanol Absoluto..... 20 mL

A la solución anterior se le adiciona Hidróxido de Amonio (NH_4OH) concentrado gota a

gota, hasta que se forme un precipitado café. Éste se continua adicionando hasta que el precipitado se disuelva y finalmente se agregan 5 gotas más.

Solución de

Tiosulfato de

Sodio al 5%

Tiosulfato de

Sodio..... 5 g

Agua destilada 100 mL

RESULTADOS

Axones: marrón, oscuro.

Anexo 1. Formato de Consentimiento Informado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS

Título del Estudio	Nervio periférico humano descelularizado y rescelularizado con células tipo Schwann <i>in vitro</i> .
Nombre del Investigador Principal	Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos
Servicio / Departamento	Servicio de Ortopedia y Traumatología y Banco De Huesos y Tejidos, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Teléfono de Contacto	8183294154
Persona de Contacto	Dra. Yadira Alejandra Tamez Mata
Versión de Documento	V.1.0
Fecha de Documento	Diciembre 2020

Usted ha sido invitado(a) a participar en un estudio de investigación. Este documento contiene información importante acerca del propósito del estudio, lo que Usted hará si decide participar, y la forma en que nos gustaría utilizar su información personal y la de su salud.

Puede contener palabras que Usted no entienda. Por favor solicite a su médico o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara.

1.-¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DEL ESTUDIO?

Las lesiones de nervio periférico (LNP) (es decir los nervios que se encuentran en los brazos y piernas) son una de las causas más frecuentes de pérdida sensitiva (dolor, temperatura) y funcional (movilidad) de los brazos y piernas. Estas lesiones suceden en eventos traumáticos (accidentes) y en las que el nervio se ve lesionado (herido) y pierde su función (sensitiva y motora). Cuando un nervio se lesiona, lo ideal es repararlo (unir nuevamente los dos extremos), pero si no se puede, se tiene que ver la manera de unirlos de alguna forma. Una opción son los injertos (éstos son una porción de algún tejido, como la piel o nervio, que se toma y se coloca en otro sitio diferente a su origen). Los injertos pueden ser colocados en la misma persona de un sitio a otro (autoinjertos) o a pueden ser colocados desde una persona (donador) a otra (receptor), éstos se llaman aloinjertos. El receptor y el donador no siempre son "compatibles" (es decir que sean por ejemplo el mismo tipo de sangre) por lo que se tiene que ver la manera de hacer compatible al aloinjerto. Para ello nosotros estamos estudiando la manera de hacerlos compatibles, quitándoles todas las células a los nervios (a esto se le llama descelularización). Por lo que el propósito de este estudio es desarrollar la mejor técnica para quitar las células al nervio.

2.-¿CUÁL SERÁ LA DURACIÓN DEL ESTUDIO Y CUANTAS MUESTRAS HABRÁ EN ESTE ESTUDIO?

La duración del estudio será de 1 año. Las muestras necesarias para analizar la mejor técnica para descelularización (quitar las células del nervio) serán provenientes de 7 donadores de nervio como usted. Los nervios que se estudiarán son los que se encuentran en las extremidades (brazos y piernas). Si a usted le realizan una cirugía en la que tenga un sobrante de nervio, éste sobrante, si usted decide donarlo para este estudio, se le realizarán estudios en el laboratorio para quitarle todas las células. Se estima que el tamaño del nervio sobrante no será mayor a 3 cm (aproximadamente del tamaño de la uña del dedo gordo de la mano).



SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte.s/n. y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, Monterrey, N.L. México Apartado Postal 1-4469, Tels.: 8347-6698 y 8333-5456
E-mail: serviciotraumatologiahu@gmail.com

1



Lo que se pretende lograr con este estudio es que este nervio descelularizado (libre de células) pueda ser aplicado en un futuro a otros pacientes que lo necesiten. Si usted no decide donar el nervio sobrante, éste será desechado y nosotros no podremos hacer uso de éste en este estudio.

3.-¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS QUE SE TOMARÁN EN CUENTA PARA MI PARTICIPACIÓN?

Si usted decide participar en la donación de nervio periférico, los requisitos son los siguientes:

- Tener entre 18 a 55 años.
- No tener la enfermedad del "azúcar" (Diabetes Mellitus).
- Cualquier sexo (mujer / hombre).
- Aceptar donar la muestra de nervio sobrante de la cirugía.
- Firmar este consentimiento informado.

4.-¿CUÁL ES EL PROCESO DEL ESTUDIO?

A usted no se le realizará ningún procedimiento; las técnicas y el enfoque serán sólo a la muestra de nervio donada. Si usted decide participar en este estudio de investigación nos autoriza obtener la muestra sobrante de su nervio periférico después de la cirugía para usarlo en nuestro estudio y aplicar las técnicas de "descelularización". Esto no alterará el proceso habitual para la mejoría después de la cirugía que le realizaron. Esto no afectará o cambiará el manejo habitual que se realiza para desechar el tejido sobrante después del estudio.

5.-¿CUÁLES SON LOS PROCEDIMIENTOS QUE SE REALIZARÁN A LA MUESTRA DE NERVIOS DONADA?

Al tejido nervioso sobrante de la cirugía que será donado por usted, se le realizarán dos técnicas en nuestro estudio. La primera es llamada descelularización, ésta consiste en quitar las células del nervio con distintas sustancias (detergentes celulares) que hacen que el tejido quede limpio de células, pero al mismo tiempo conserva su estructura y forma (sólo queda libre de células). El segundo proceso que se realizará es llamado recelularización. Aquí se le va a poner células otra vez, pero ahora del paciente receptor (el que recibe el injerto de nervio descelularizado). Para poder recelularizar otra vez el nervio, se va a obtener una muestra de grasa del paciente receptor y después ese tejido adiposo (grasa) se va a filtrar para que sólo queden Células Madre Mesenquimales. Lo que se pretende lograr con esto es que este nervio descelularizado (libre de células) pueda ser recelularizado y aplicado en un futuro a otros pacientes que lo necesiten.

6.-¿QUÉ VA A SUCEDER SI USTED DECIDE DONAR SU MUESTRA DE TEJIDO PARA ESTE ESTUDIO?

Si usted da su consentimiento (autorización) para donar su nervio sobrante de la cirugía, nosotros lo estudiaremos para quitarle todas las células (descelularizarlo). Si usted no decide donar el nervio sobrante, éste será desechado y nosotros no podremos hacer uso de este en este estudio.



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

7.-¿CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS DE LA DONACIÓN?

Como será una donación del tejido de nervio periférico sobrante de su cirugía, a usted no se le realizará ningún otro procedimiento, los riesgos y molestias le serán indicados por su médico tratante enfocados a la operación que se le realizó y no sobre este estudio. No se compromete el pronóstico de su cirugía si usted decide donarnos su nervio sobrante.

8.-¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED O PARA OTROS?

Si usted decide participar como donador de tejido nervioso en nuestro estudio tendrá la oportunidad y la satisfacción de apoyar a los estudios científicos en el campo de medicina, en especial nuestra investigación, ayudando en base a los resultados obtenidos a desarrollar nuevos protocolos de investigación en esta línea de estudio que facilitarán en un futuro a crear mejores injertos nerviosos, procesados de forma exitosa y funcional para las personas que los necesiten.

9.-¿QUÉ OTROS PROCEDIMIENTOS SE LE REALIZARÁN A LA MUESTRA DE TEJIDO?

No se le realizara ningún otro procedimiento que no se haya descrito antes a la muestra de tejido nervioso que ha donado. Una vez concluido el estudio esta muestra de tejido se desechará en base a los protocolos de seguridad sobre Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI) descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL-SSA1-2002). Usted no tiene que participar como donador en este estudio de investigación si no lo desea. En caso de negar su participación, no habrá ninguna repercusión al respecto.

10.-¿SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO LE GENERARÁ ALGÚN COSTO?

No habrá costos para Usted por participar en este estudio. Se realizarán pruebas y en el tejido donado los cuales serán cubiertos por recursos propios del servicio.

11.-¿SE LE PROPORCIONARÁ ALGUNA COMPENSACIÓN ECONÓMICA PARA GASTOS DE TRANSPORTACIÓN?

A Usted no se le proporcionará ninguna compensación para sus gastos de transportación.

12.-¿RECIBIRÁ ALGÚN PAGO POR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

Usted no recibirá ningún pago por la participación en este estudio.

13.-¿SE ALMACENARÁN MUESTRAS DE SANGRE O TEJIDOS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES?

Su muestra de nervio será almacenada sólo para fines de esta investigación y no se comercializará. La investigación que se realizará con estas muestras puede llevar al desarrollo de nuevos injertos de nervio periférico en un futuro. La muestra de nervio se almacenará en frascos y estarán en refrigeración a 4°C hasta que se puedan procesar en el laboratorio para descellularizarlo (quitar las células). Posteriormente se almacenará en congelación en -80°C hasta que requieran ser utilizados nuevamente. Todo esto se realizará en el laboratorio de Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



14.-¿QUÉ DEBE HACER SI LE PASA ALGO COMO RESULTADO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Si Usted sufre una lesión o enfermedad durante su participación en el estudio, debe buscar tratamiento a través de su médico de cabecera o centro de atención médica de elección y debe informárselo inmediatamente al médico del estudio.

Los gastos que genere dicha lesión o enfermedad sólo le serán pagados si el médico del estudio ha decidido que la lesión / enfermedad está directamente relacionada con los procedimientos del estudio, y no es el resultado de una condición pre-existente de la progresión normal de su enfermedad, o porque no se han seguido las indicaciones que el médico de estudio ha recomendado.

15.-¿CUÁLES SON SUS DERECHOS COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN?

Si decide participar en este estudio, Usted tiene derecho a ser tratado con respeto, incluyendo la decisión de continuar o no su participación en el estudio. Usted es libre de terminar su participación en este estudio en cualquier momento.

16.- ¿PUEDE TERMINAR SU PARTICIPACIÓN EN CUALQUIER MOMENTO DEL ESTUDIO?

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención médica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

Su participación también podrá ser suspendida o terminada por el médico del estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Que el estudio haya sido cancelado.
- Que el médico considere que es lo mejor para Usted.
- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiere con esta investigación.
- Que no ha seguido las indicaciones del médico lo que pudiera traer como consecuencias problemas en su salud.

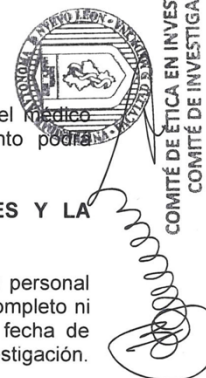
Si Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente:

- Notificar a su médico tratante del estudio
- Deberá de regresar todo el material que su médico le solicite.

Si su participación en el estudio se da por terminada, por cualquier razón, por su seguridad, el médico continuará con seguimientos clínicos. Además, su información médica recabada hasta ese momento podrá ser utilizada para fines de la investigación.

17.- ¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE SUS DATOS PERSONALES Y LA INFORMACIÓN DE SU EXPEDIENTE CLÍNICO?

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra Ley.





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina y Hospital Universitario, así como el Investigador serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales.

Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al médico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo agencias reguladoras locales (Secretaría de Salud SSA a través de la COFEPRIS), así como al Comité de Ética en Investigación y al Comité de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como la Secretaría de Salud y el Comité de Ética en Investigación y/o el Comité de Investigación de nuestra Institución, podrán inspeccionar su expediente clínico, incluso los datos que fueron recabados antes del inicio de su participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio u otra información personal.

En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parte o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como sujeto en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted autoriza el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

18.- SI TIENE PREGUNTAS O INQUIETUDES ACERCA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, ¿A QUIÉN PUEDE LLAMAR?

En caso de tener alguna pregunta relacionada a sus derechos como sujeto de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario podrá contactar al **Dr. José Gerardo Garza Leal**, Presidente del Comité de Ética en Investigación de nuestra Institución o al **Lic. Antonio Zapata de la Riva** en caso de tener dudas en relación a sus derechos como paciente.

Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n
Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León México
CP 64460
Teléfonos: 8183294050 ext. 2870 a 2874
Correo electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte.s/n. y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, N.L. Mexico Apartado Postal 1-4469 Tels.: 8347-6698 y 8333-5456
E-mail: serviciotraumatologiahu@gmail.com

5
Formato de Consentimiento Informado V. 1.0 Diciembre 2020



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

RESUMEN CONSENTIMIENTO

PARA LLENAR POR EL SUJETO DE INVESTIGACIÓN

- Mi participación es completamente voluntaria
- Confirmando que he leído y entendido este documento y la información proporcionada del estudio.
- Confirmando que se me ha explicado el estudio, que he tenido la oportunidad de hacer preguntas y que se me ha dado el tiempo suficiente para decidir sobre mi participación. Sé con quién debo comunicarme si tengo más preguntas.
- Entiendo que las secciones de mis anotaciones médicas serán revisadas cuando sea pertinente por el Comité de Ética en Investigación o cualquier otra autoridad regulatoria para proteger mi participación en el estudio.
- Acepto que mis datos personales se archiven bajo códigos que permitan mi identificación.
- Acepto que mis materiales biológicos (nervio) recolectados puedan usarse para los fines que convengan a este estudio.
- Acepto que mi médico general sea informado de mi participación en este estudio.
- Acepto que la información acerca de este estudio y los resultados de cualquier examen o procedimiento pueden ser incluidos en mi expediente clínico.
- Confirmando que se me ha entregado una copia de este documento de consentimiento firmado.

Nombre del Sujeto de Investigación

Firma

Fecha


COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

[Handwritten signature]



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

PRIMER TESTIGO

Nombre del Primer Testigo

Firma

Dirección

Fecha

Relación con el Sujeto de Investigación

SEGUNDO TESTIGO

Nombre del Segundo Testigo

Firma

Dirección

Fecha

Relación con el Sujeto de Investigación

PERSONA QUE OBTIENE CONSENTIMIENTO

He discutido lo anterior y he aclarado las dudas. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Nombre de la Persona que obtiene el Consentimiento

Firma

Fecha



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte.s/n. y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, N.L. Mexico Apartado Postal 1-4469 Tels.: 8347-6698 y 8333-5456 E-mail: serviciotraumatologiahu@gmail.com

Formato de Consentimiento Informado V. 1.0 Diciembre 2020

MÉTODOS DE EVALUACIÓN.

- Los datos se vaciaron y analizaron en el programa Excel® v14.7.2.
- Los datos obtenidos se procesaron utilizando los softwares estadísticos SPSS y Graph Pad Prism 7.
- Los datos de medición se expresaron como media \pm desviación estándar.
- Para los casos de comparaciones múltiples se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Barlett ($p < 0.05$).

RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 7 muestras de nervio sural donados de 7 diferentes pacientes (Figura 1). Los tejidos se prepararon en un cuarto limpio clase 5 manteniéndose en buffer PBS 1x pH 7.4 para posteriormente ser congelados para su conservación.



Figura 3. Izquierda: Remoción de tejidos blandos adyacentes y división de nervio sural por grupo
Derecha: Bloque de parafina con nervio sural en disposición longitudinal, axial proximal y axial distal para generación de laminillas

Una vez procuradas las 7 muestras se inició el protocolo de decelularización a base de sulfobetainas (Figura 3), y se le agregó condroitinasa, la decelularización se realizó en 5 muestras y 2 muestras no fueron tratadas.

El **análisis morfológico** se llevó a cabo en las laminillas de cortes longitudinales de 1 mm con un aumento microscópico de 40x, bajo las tinciones de HYE, TCM y PAS. De cada una de las tinciones mencionadas se analizó un

control de nervio periférico sural no descelularizado contra la muestra descelularizada con el protocolo descrito en la secciones anteriores. En la figura 4, se aprecia en la tinción de HYE una disminución del número de núcleos neuronales en la muestra descelularizada (B) en comparación con su control (A), lo que corresponde con el objetivo principal del estudio.

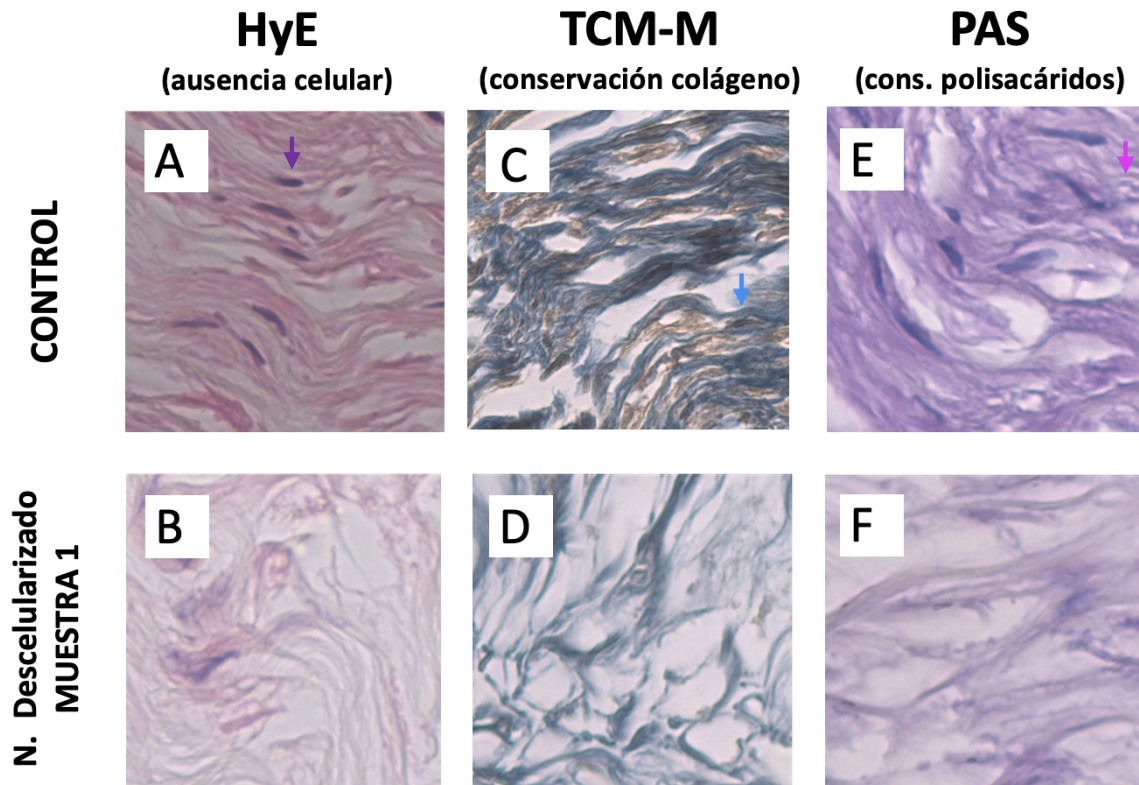
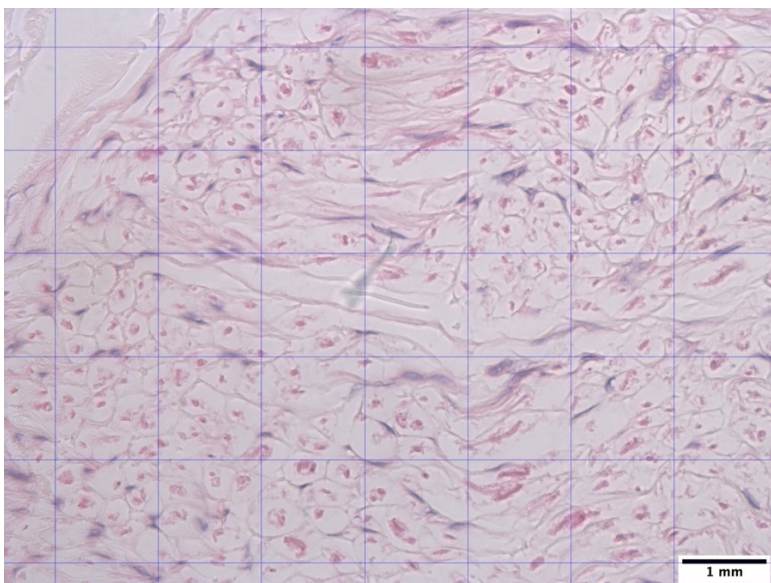
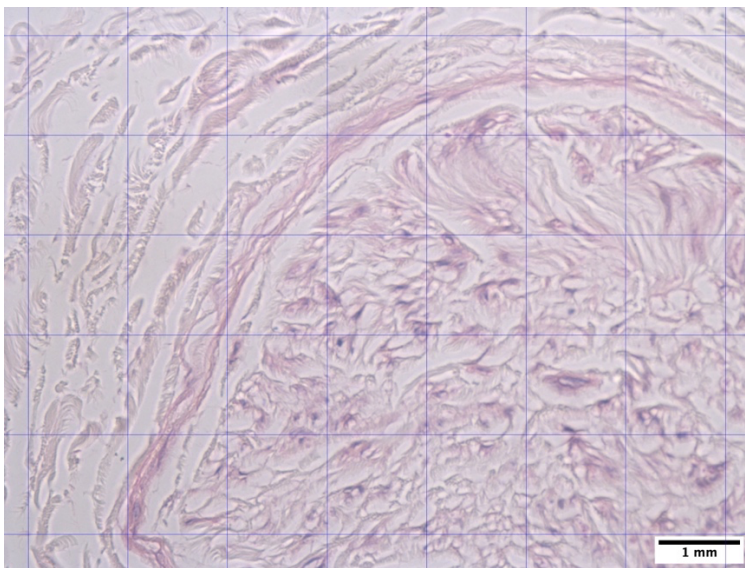


Figura 4. Se presentan cortes longitudinales de nervio sural con diversas tinciones (organizadas por columnas): HYE (A, B); TCM (C, D); PAS (E, F). Se señala en el grupo control: A) nucelos (flecha morada), C) el colágeno (flecha azul), E) los polisacáridos (flecha magenta).

Así mismo, en las columnas C-D se presentan el control y muestra teñidos con TCM en la que se visualiza la presencia de colágeno ambos cuadros. El control y muestra bajo tinción de PAS, se representan en la columna E-F, en la que se identifica la persistencia de polisacáridos en ambos segmentos. Estos hallazgos muestran la persistencia del andamiaje de la membrana extracelular posterior a la descelularización, lo cual es otro de los objetivos del estudio.

El conteo celular para el **análisis morfométrico** se llevó a cabo seleccionando 8 campos aleatorios los cortes longitudinal, axiales proximal y distal teñidos con HYE a una amplificación de 40x de segmentos de muestra 1 y muestra 1.2 descelularizados *versus* y el control HYE por medio del software Image J (Figura 5).



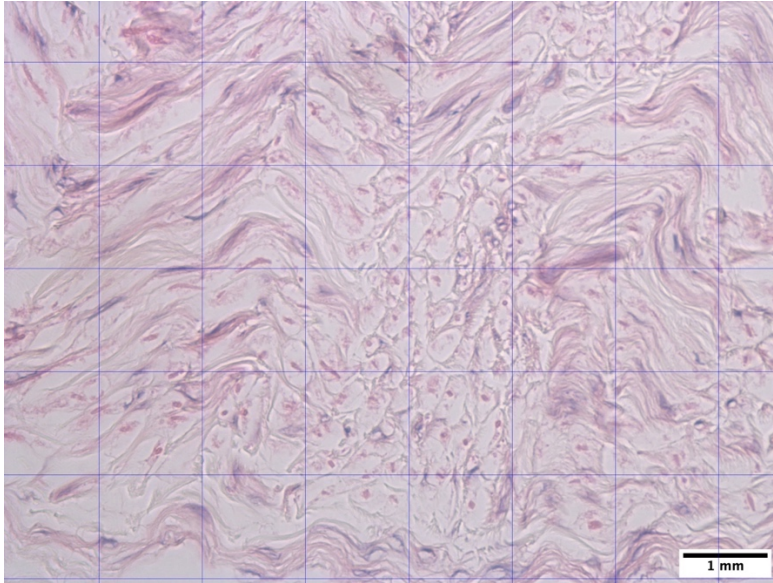


Figura 5. Se presentan cortes axial distal, proximal y longitudinal de nervio sural descellularizado bajo tinción HYE en un aumento 40X, divididos en campos mediante el programa Image J.

Se comparó el contéo de nucleos neuronales de los 3 grupos (control, muestra 1 y muestra 1.2) en sus 3 respectivos cortes (axial proximal, axial distal y longitudinal) por medio de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, resumido en Tabla 1.

T. ANOVA Lng	SC	GD	MC	ANOVA 1v Long	C. Núcleos
Tratamiento	72.47	2	36.23	Valor P	<0.0001
Residual	364.7	117	3.117	Grupos	3
Total	437	119		F	11.62
				R²	0.16
T. ANOVA AxP	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	44.2	2	22.11	Valor P	0.0039

Residual	445.4	117	3.807	Grupos	3
Total	489.6	119		F	5.80
				R²	0.09031
T. ANOVA AxD	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	126.8	2	63.41	Valor P	<0.0001
Residual	451.8	117	3.861	Grupos	3
Total	578.6	119		F	16.42
				R²	0.2192

Tabla 1. Resumen de tablas y resultados de **ANOVA** de una vía para grupos HYE descelularizados longitudinal (LNg), axial proximal (AxP) y axial distal (AxD) comparados su respectivo control no descelularizado. T=Tabla, SC (Suma de los cuadrados), GD (Grados de libertad), MC (media de los cuadrados), ANOVA (Análisis de Varianza), 1v (de una vía),

Los grupos descelularizados presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en comparación con sus controles, apreciable en las gráficas de la **Figura 6**.

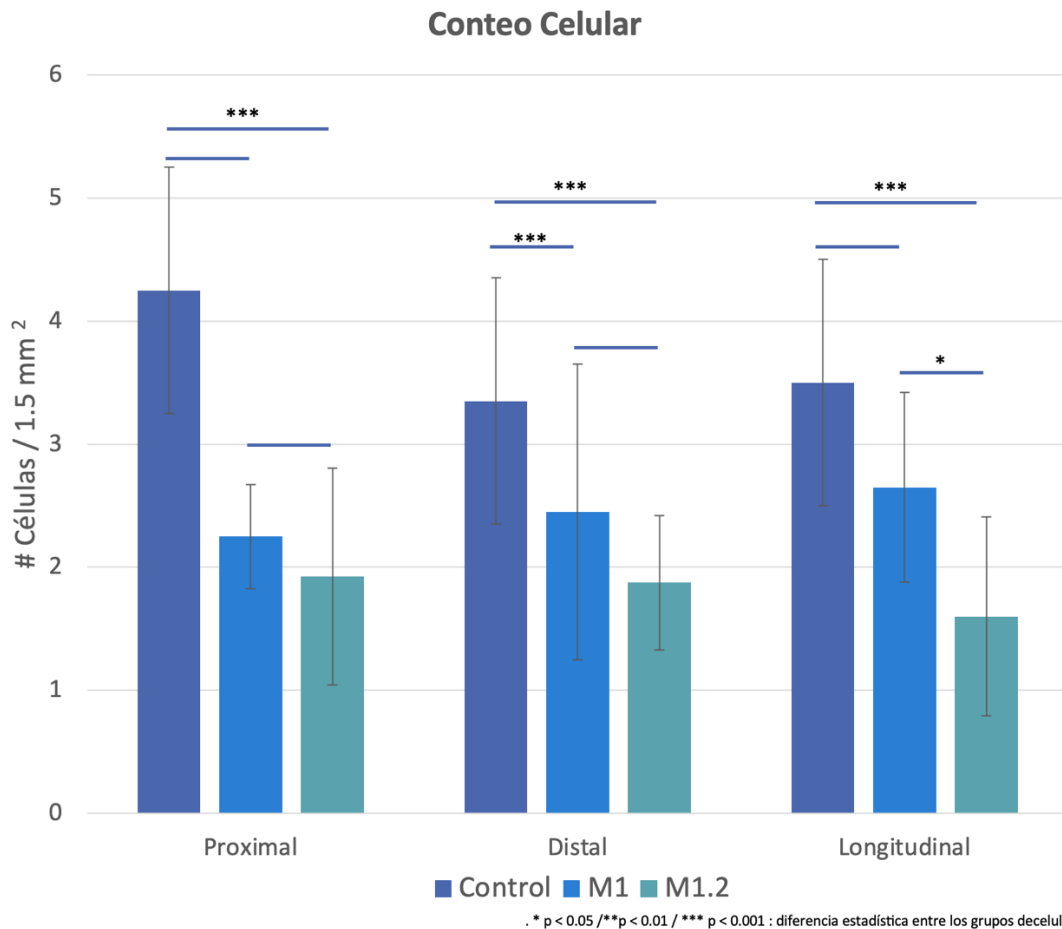


Figura 6. Resultados de prueba **ANOVA** de una vía del número de células por celda de 1.5mm². Conteo axial **Proximal (izquierda)**, conteo axial **distal (centro)**, conteo **longitudinal (derecha)**

La tripleta de columnas a la izquierda corresponde al número de células en el corte axial proximal, siendo de 4.5 células por campo de 1.5mm² en el grupo control, 2.25 en el grupo de la muestra 1 (M1) y 1.925 en el grupo de muestra 1.2 (M1.2). En tercia de columnas centrales representan el conteo celular en el corte axial distal, resultando de 3.35 en el control, 2.45 en el grupo M1 y 1.87 en el grupo M1.2. La cuenta de células de los cortes longitudinal del grupo control fue de 3.5, 2.65 en el grupo M1 y 1.6 en el grupo M1.2, apreciable en las tres columnas de la derecha.

La intensidad densitométrica de los polisacáridos de la membrana basal fue otro parámetro evaluado dentro del **análisis morfométrico**, para lo cual se tomaron capturas de ocho campos de cortes longitudinal, axiales proximal y distal bajo tinción de PAS a una amplificación de 40x de segmentos de muestra 1 y muestra 1.2 descelularizados vs el control en tinción de PAS (**Figura 7**).

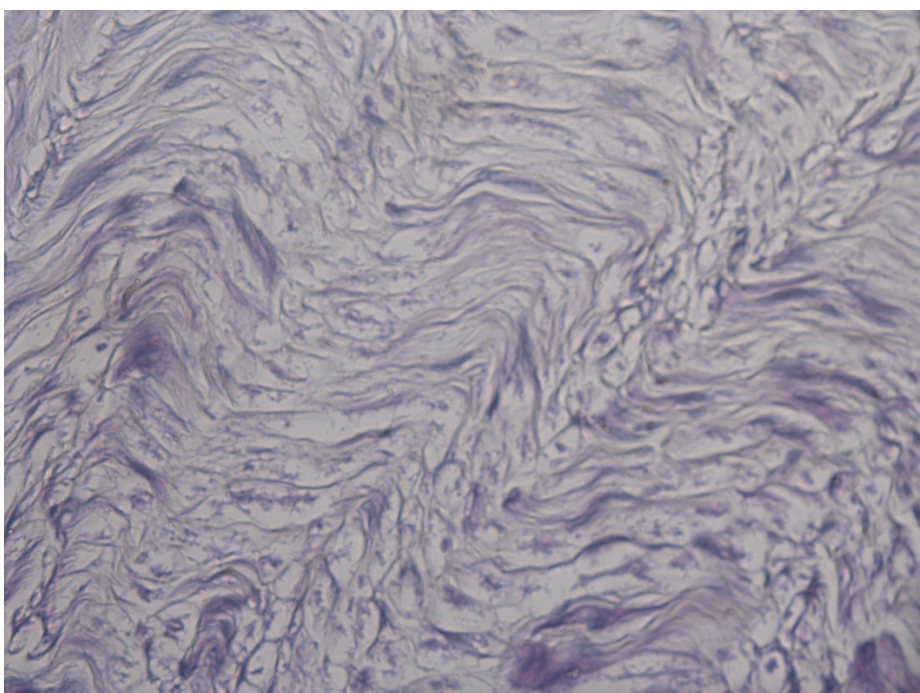


Figura 7. Ejemplo de captura campos (corte longitudinal) de nervio sural descelularizado bajo tinción PAS en un aumento 40X.

Estos se convirtieron en un archivo de 8 bits (escala de grises) para calcular la intensidad densitométrica por medio del software Image J y el GraphPad Prism; se presentan el área, media, desviación estándar, mínimo, máximo e intensidad de los campos teñidos con PAS en las **tablas 2-4**.

Valores en Cortes Axiales Distales de Tinción PAS							
Control Axial Distal PAS							
	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	208.394	27.524	104	255	13253.668	1024296458.000
2	63.599	209.764	30.299	102	255	13340.835	1031033117.000
3	63.599	206.636	28.015	104	255	13141.901	1015658697.000
4	63.599	209.970	29.118	104	255	13353.907	1032043316.000
5	63.599	218.465	26.145	104	255	13894.193	1073798848.000
6	63.599	214.027	25.771	99	255	13611.926	1051984054.000
7	63.599	211.892	26.194	99	255	13476.146	1041490503.000
8	63.599	210.386	27.371	92	254	13380.405	1034091218.000
Muestra 1. Corte Axial Distal PAS							
	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	198.590	25.902	104	251	12630.195	976111972
2	63.599	195.166	24.843	92	249	12412.406	959280377
3	63.599	193.455	24.102	84	247	12303.590	950870614
4	63.599	193.340	24.141	98	249	12296.296	950306933
5	63.599	192.933	23.545	95	247	12270.414	948306680
6	63.599	192.010	24.447	92	250	12211.660	943765894
7	63.599	197.823	23.090	96	253	12581.389	972340054
8	63.599	195.480	25.863	87	250	12432.358	960822371
Muestra 1.2 Corte Axial Distal PAS							
	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	147.149	26.261	57	211	9358.536	723265111.000
2	63.599	152.724	22.091	68	213	9713.124	750669057.000
3	63.599	155.816	21.995	57	219	9909.791	765868320.000
4	63.599	156.412	19.000	71	225	9947.684	768796827.000
5	63.599	154.347	21.700	73	209	9816.321	758644530.000
6	63.599	157.974	19.728	72	218	10047.012	776473304.000
7	63.599	158.269	19.164	69	214	10065.789	777924418.000
8	63.599	158.111	18.783	71	210	10055.714	777145817.000

Tabla 2. Valores extrapolados de los 8 campos axiales distales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de PAS. D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Valores en Cortes Axiales Proximales de Tinción PAS							
Control Axial Proximal PAS							
C	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen

1	63.599	203.665	32.191	93	255	12952.908	1001052507.000
2	63.599	201.675	33.498	82	254	12826.353	991271857.000
3	63.599	201.016	31.422	94	254	12784.446	988033134.000
4	63.599	205.011	34.803	90	255	13038.553	1007671497.000
5	63.599	195.740	32.847	80	254	12448.901	962100846.000
6	63.599	197.831	34.779	92	255	12581.906	972380041.000
7	63.599	198.101	31.904	76	254	12599.085	973707676.000
8	63.599	189.565	37.162	79	255	12056.186	931750276.000
Muestra 1. Corte Axial Proximal PAS							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	190.151	24.434	84	245	12093.458	934630780.000
2	63.599	191.187	22.694	94	247	12159.367	939724540.000
3	63.599	191.811	24.508	85	244	12198.997	942787320.000
4	63.599	192.690	24.613	91	253	12254.909	947108357.000
5	63.599	194.086	23.668	96	246	12343.712	953971410.000
6	63.599	193.483	22.814	99	244	12305.376	951008696.000
7	63.599	197.351	21.456	96	241	12551.394	970021916.000
8	63.599	195.367	24.127	91	243	12425.195	960268770.000
Muestra 1.2 Corte Axial Proximal PAS							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	151.121	23.545	74	210	9611.169	742789606.000
2	63.599	149.305	21.461	73	210	9495.679	733864093.000
3	63.599	153.722	20.807	68	208	9776.624	755576571.000
4	63.599	157.427	18.793	77	203	10012.240	773785922.000
5	63.599	158.586	18.269	78	216	10085.924	779480539.000
6	63.599	148.675	20.972	73	209	9455.611	730767413.000
7	63.599	156.236	18.470	78	234	9936.506	767932896.000
8	63.599	155.364	18.676	74	220	9881.036	763645961.000

Tabla 3. Valores extrapolados de los 8 campos axiales proximales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de PAS. C=Campo, D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Valores en Cortes Longitudinales de Tinción PAS							
Control Longitudinal PAS							
C	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	170.609	38.567	74	255	10850.616	838579028.000
2	63.599	179.020	32.219	65	254	11385.544	879920345.000
3	63.599	180.858	35.758	71	253	11502.412	888952379.000
4	63.599	177.023	36.163	71	255	11258.521	870103563.000

5	63.599	176.283	44.213	68	253	11211.482	866468137.000
6	63.599	181.341	44.469	72	255	11533.153	891328160.000
7	63.599	183.667	36.249	85	249	11681.063	902759254.000
8	63.599	181.907	41.015	72	255	11569.149	894110086.000
Muestra 1. Corte Longitudinal PAS							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	186.799	24.750	92	248	11880.265	918154365.000
2	63.599	184.782	22.536	92	246	11751.970	908239239.000
3	63.599	184.529	25.092	72	244	11735.892	906996684.000
4	63.599	187.491	23.639	85	249	11924.307	921558145.000
5	63.599	186.898	24.410	93	245	11886.565	918641328.000
6	63.599	184.460	24.604	89	247	11731.486	906656171.000
7	63.599	191.850	25.316	73	249	12201.486	942979676.000
8	63.599	188.963	25.778	89	248	12017.876	928789542.000
Muestra 1.2 Corte Longitudinal PAS							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	154.567	19.205	72	211	9830.362	759729712
2	63.599	144.213	21.197	65	218	9171.859	708837942
3	63.599	143.709	22.913	57	212	9139.803	706360508
4	63.599	149.473	19.896	66	201	9506.386	734691531
5	63.599	147.376	20.540	57	209	9373.012	724383855
6	63.599	150.307	20.783	58	204	9559.375	738786703
7	63.599	151.253	20.272	59	207	9619.599	743441121
8	63.599	152.685	20.420	66	207	9710.628	750476183

Tabla 4. Valores extrapolados de los 8 campos longitudinales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de PAS. C=Campo, D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Se comparó la intensidad densitométrica de los 3 grupos (control, muestra 1 y muestra 1.2) en sus 3 respectivos cortes (axial proximal, axial distal y longitudinal) por medio de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, resumido en **Tabla 5**.

T. ANOVA Lng	SC	GD	MC	ANOVA 1v Lng	C. Núcleos
Tratamiento	2.558e+007	2	1.279e+007	Valor P	< 0.0001
Residual	1.095e+006	21	52119	Grupos	3
Total	2.667e+007	23		F	245.4
				R²	0.9590
T. ANOVA AxP	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	3.927e+007	2	1.963e+007	Valor P	< 0.0001
Residual	1.243e+006	21	59186	Grupos	3
Total	4.051e+007	23		F	331.7
				R²	0.9693
T. ANOVA AxD	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	5.386e+007	2	2.693e+007	Valor P	< 0.0001
Residual	940502	21	44786	Grupos	3
Total	5.480e+007	23		F	601.3
				R²	0.9828

Tabla 5. Resumen de tablas y resultados de **ANOVA** de una vía para grupos PAS descelularizados longitudinal (Lng), axial proximal (AxP) y axial distal (AxD) comparados su respectivo control no descelularizado. T=Tabla, SC (Suma de los cuadrados), GD (Grados de libertad), MC (media de los cuadrados), ANOVA (Análisis de Varianza), 1v (de una vía),

Los grupos descelularizados presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en comparación con sus controles, apreciable en la gráfica de la **Figura 8**.

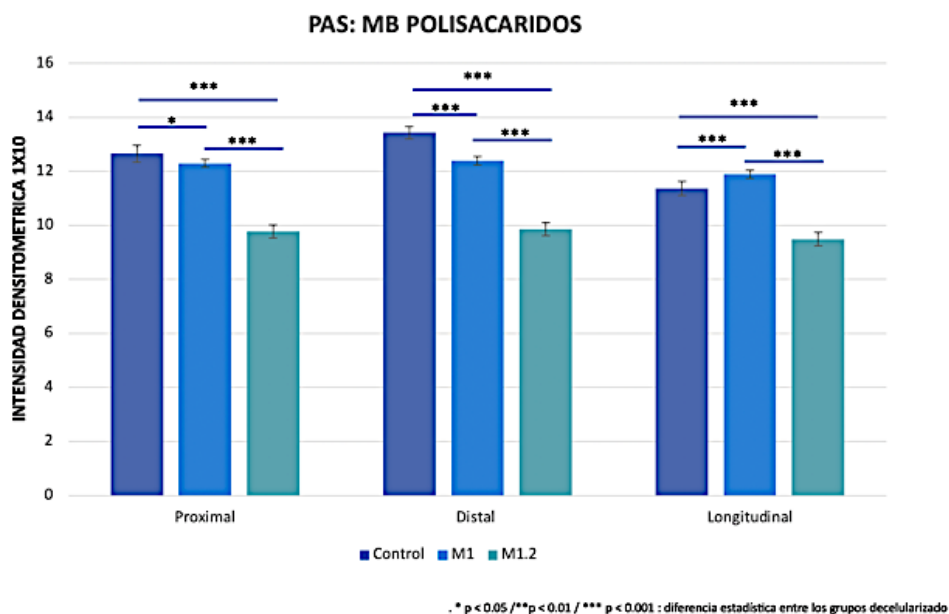


Figura 8. Resultados de prueba **ANOVA** de una vía para cuantificación de intensidad densitométrica. Conteo axial **Proximal** (izquierda), conteo axial **distal** (centro), conteo **longitudinal** (derecha)

La triplete de columnas a la izquierda corresponde la intensidad densitométrica de los componentes de polisacáridos de la membrana extracelular teñidos bajo tinción de PAS en el corte axial proximal, siendo de 12,661.04 en el grupo control, 12,291.55 en el grupo de la muestra 1 (M1) y 9,781.84 en el grupo de muestra 1.2 (M1.2). En tercia de columnas centrales representan la intensidad densitométrica en el corte axial distal, resultando de 13,431.62 en el control, 12,392.28 en el grupo M1 y 9,864.24 en el grupo M1.2. La intensidad densitométrica de los cortes longitudinal del grupo control fue de 11,373.99, 11,891.23 en el grupo M1 y 9,488.84 en el grupo M1.2, apreciable en las tres columnas de la derecha.

Otro de los componentes evaluados dentro del **análisis morfométrico** fue la

intensidad densitométrica del colágeno de la membrana basal. **Por lo que nuevamente,** se tomaron capturas de ocho campos de cortes longitudinal, axiales proximal y distal bajo tinción de TCM a una amplificación de 40x de segmentos de muestra 1 y muestra 1.2 descelularizados *versus* y el control TCM (**Figura 9**).

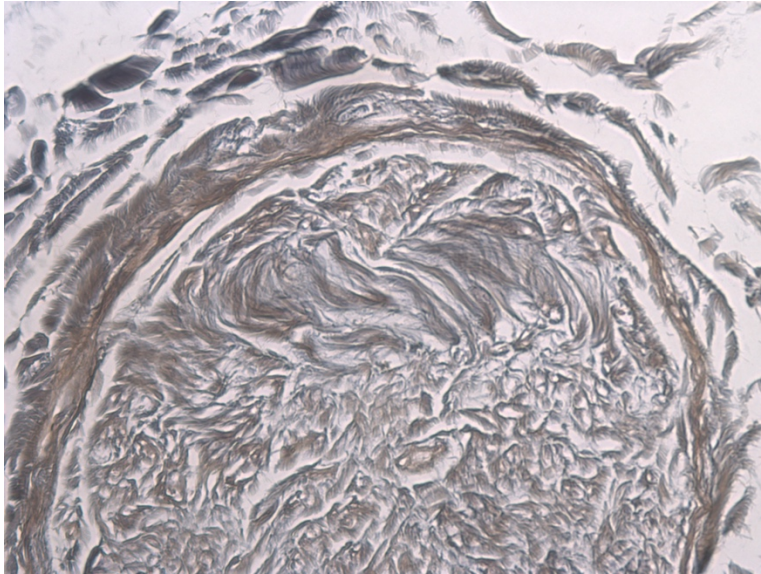


Figura 9. Ejemplo de captura campos (corte axial distal) de nervio sural descelularizado bajo tinción TCM en un aumento 40X

Estos se convirtieron en un archivo de 8 bits (escala de grises) para calcular la intensidad densitométrica por medio del software Image J y el GraphPad Prism; se presentan el área, media, desviación estándar, mínimo, máximo e intensidad de los campos teñidos con TCM en las **tablas 6-8**.

Valores en Cortes Axiales Distales de Tinción TCM							
Control Axial Distal TCM							
	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	166.900	45.767	62	250	10614.693	820345956
2	63.599	162.684	48.095	61	248	10346.582	799625214
3	63.599	171.650	45.890	64	249	10916.774	843691938
4	63.599	186.779	43.503	63	253	11879.009	918057304
5	63.599	172.493	40.878	66	252	10970.385	847835208
6	63.599	171.353	44.278	66	252	10897.887	842232292

7	63.599	163.379	43.227	59	254	10390.771	803040340
8	63.599	161.940	42.338	62	252	10299.233	795965907
Muestra 1. Corte Axial Distal TCM							
	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	173.293	42.872	61	254	11021.286	851769075
2	63.599	176.535	41.841	68	254	11227.506	867706588
3	63.599	163.716	38.788	64	252	10412.230	804698754
4	63.599	169.522	44.565	54	255	10781.443	833233052
5	63.599	171.284	42.021	59	251	10893.503	841893492
6	63.599	179.073	39.475	62	253	11388.873	880177646
7	63.599	172.785	40.401	57	254	10988.957	849270550
8	63.599	171.960	40.713	54	255	10936.543	845219826
Muestra 1.2 Corte Axial Distal TCM							
	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	63.599	174.615	36.879	65	253	11105.395
2	63.599	63.599	169.274	38.321	58	252	10765.714
3	63.599	63.599	178.427	33.719	71	251	11347.805
4	63.599	63.599	177.418	34.285	66	255	11283.617
5	63.599	63.599	173.149	36.305	66	252	11012.119
6	63.599	63.599	179.440	34.292	72	253	11412.218
7	63.599	63.599	180.992	34.127	67	252	11510.970
8	63.599	63.599	183.155	33.750	54	254	11648.492

Tabla 6. Valores extrapolados de los 8 campos axiales distales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de TCM. D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Valores en Cortes Axiales Proximales de Tinción TCM							
Control Axial Proximal TCM							
C	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	151.306	50.941	53	252	9622.963	743701054
2	63.599	150.659	48.537	55	251	9581.773	740517752
3	63.599	158.886	49.069	61	249	10105.035	780957544
4	63.599	157.726	47.077	54	246	10031.263	775256100
5	63.599	157.514	47.885	57	248	10017.745	774211427
6	63.599	160.166	46.040	62	248	10186.415	787246887
7	63.599	163.174	43.458	70	253	10377.751	802034138
8	63.599	153.593	45.348	46	254	9768.387	754939983
Muestra 1. Corte Axial Proximal TCM							

C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	176.012	42.392	66	255	11194.221	865134196.000
2	63.599	178.074	39.106	64	254	11325.350	875268335.000
3	63.599	171.626	41.473	65	254	10915.302	843578164.000
4	63.599	176.976	40.090	57	254	11255.532	869872498.000
5	63.599	182.091	36.015	52	255	11580.834	895013179.000
6	63.599	182.243	35.263	82	255	11590.507	895760766.000
7	63.599	185.901	37.290	70	255	11823.180	913742677.000
8	63.599	183.654	36.493	74	255	11680.271	902698101.000
Muestra 1.2 Corte Axial Proximal TCM							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	173.511	39.197	59	252	11035.172	852842252.000
2	63.599	161.826	38.412	53	252	10292.006	795407416.000
3	63.599	153.615	43.424	41	244	9769.775	755047264.000
4	63.599	168.533	43.055	50	248	10718.577	828374495.000
5	63.599	159.248	41.386	54	249	10128.015	782733521.000
6	63.599	156.225	37.885	47	253	9935.772	767876232.000
7	63.599	154.203	42.376	43	249	9807.211	757940510.000
8	63.599	163.529	39.588	52	246	10400.286	803775668.000

Tabla 7. Valores extrapolados de los 8 campos axiales proximales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de TCM. C=Campo, D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Valores en Cortes Longitudinales de Tinción PAS							
Control Longitudinal TCM							
C	Area	Mean	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	127.752	44.704	46	251	8124.955	627929055
2	63.599	152.266	48.849	51	248	9684.005	748418613
3	63.599	157.586	43.502	54	252	10022.345	774566885
4	63.599	138.525	43.655	54	248	8810.099	680879699
5	63.599	127.606	43.641	47	246	8115.637	627208886
6	63.599	147.712	48.266	44	248	9394.366	726034184
7	63.599	143.291	48.553	54	253	9113.218	704305936
8	63.599	144.850	47.381	49	250	9212.331	711965823
Muestra 1. Corte Longitudinal TCM							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	163.276	41.871	54	251	10384.214	802533606
2	63.599	162.767	42.839	55	255	10351.875	800034339
3	63.599	162.549	43.974	41	254	10338.008	798962632

4	63.599	166.623	43.017	44	254	10597.065	818983602
5	63.599	161.762	40.990	56	253	10287.912	795090985
6	63.599	167.782	40.682	54	252	10670.781	824680631
7	63.599	166.449	41.431	59	254	10585.996	818128142
8	63.599	170.598	40.191	56	251	10849.913	838524688
Muestra 1.2 Corte Longitudinal TCM							
C	Area	Media	D. Est	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	63.599	178.847	32.399	69	253	11374.529	879069128
2	63.599	175.543	35.034	44	251	11164.424	862831332
3	63.599	173.955	36.373	59	253	11063.367	855021276
4	63.599	176.430	34.325	58	250	11220.829	867190563
5	63.599	175.404	34.957	67	251	11155.550	862145521
6	63.599	175.529	35.374	52	251	11163.515	862761120
7	63.599	171.927	35.266	65	249	10934.429	845056429
8	63.599	169.723	36.497	58	249	10794.252	834222971

Tabla 8. Valores extrapolados de los 8 campos longitudinales 8bit de grupos control, muestra 1 y muestra 1.2 en tinción de TCM. C=Campo, D. Est=Desviación estándar, min=mínimo, max=máximo, IntDen=Intensidad densitométrica.

Se comparó la intensidad densitométrica de los 3 grupos (control, muestra 1 y muestra 1.2) en sus 3 respectivos cortes (axial proximal, axial distal y longitudinal) por medio de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, resumido en **Tabla 9.**

T. ANOVA	SC	GD	MC	ANOVA 1v Lng	C. Núcleos
Lng					
Tratamiento	1.776e+007	2	8.878e+006	Valor P	< 0.0001
Residual	3.779e+006	21	179962	Grupos	3
Total	2.154e+007	23		F	49.33
				R²	0.8245

T. ANOVA AxP	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	9.504e+006	2	4.752e+006	Valor P	< 0.0001
Residual	2.575e+006	21	122632	Grupos	3
Total	1.208e+007	23		F	38.75
				R²	0.7868
T. ANOVA AxD	SC	GD	MC	ANOVA 1v AxP	C. Núcleos
Tratamiento	914027	2	457014	Valor P	< 0.0001
Residual	3.046e+006	21	145032	Grupos	3
Total	3.960e+006	23		F	3.151
				R²	0.2308

Tabla 9. Resumen de tablas y resultados de **ANOVA** de una vía para grupos TCM descelularizados longitudinal (Lng), axial proximal (AxP) y axial distal (AxD) comparados su respectivo control no descelularizado. T=Tabla, SC (Suma de los cuadrados), GD (Grados de libertad), MC (media de los cuadrados), ANOVA (Análisis de Varianza), 1v (de una vía),

Los grupos descelularizados presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en comparación con sus controles, apreciable en la gráfica de la **Figura 10**.

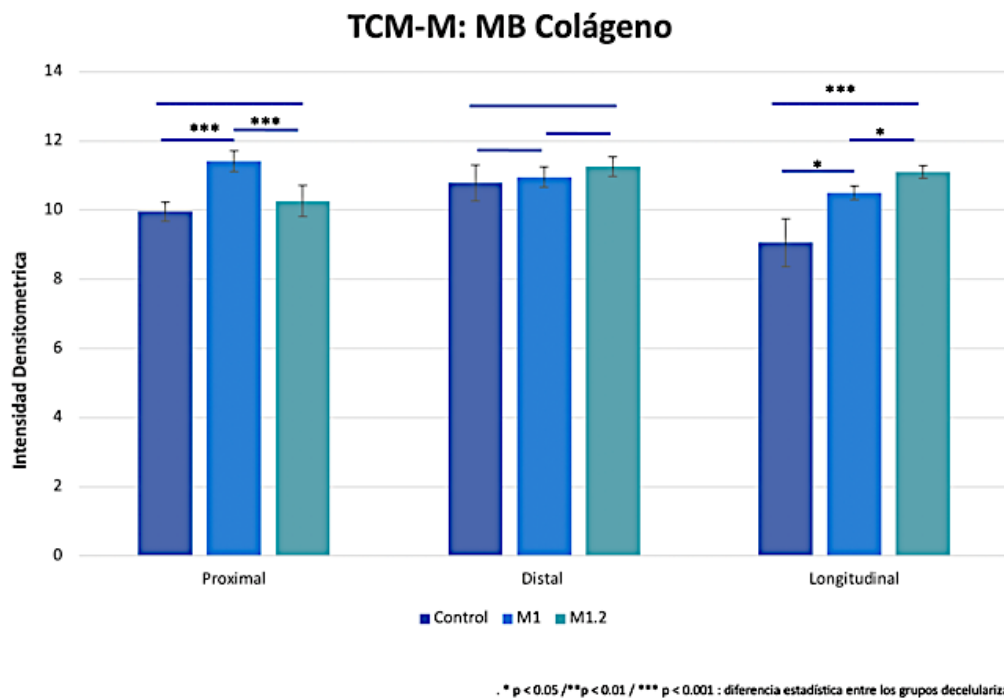


Figura 10. Resultados de prueba **ANOVA** de una vía para cuantificación de intensidad densitométrica. Conteo axial **Proximal (izquierda)**, conteo axial **distal (centro)**, conteo **longitudinal** (derecha)

La triplete de columnas a la izquierda corresponde la intensidad densitométrica de los componentes de colágeno de la membrana extracelular teñidos bajo tinción de TCM en el corte axial proximal, siendo de 9,961.41 en el grupo control, 11,420.64 en el grupo de la muestra 1 (M1) y 10,260.85 en el grupo de muestra 1.2 (M1.2). En tercia de columnas centrales representan la intensidad densitométrica en el corte axial distal, resultando de 10,789.41 en el control, 10,956.29 en el grupo M1 y 11,260.79 en el grupo M1.2. La intensidad densitométrica de los cortes longitudinal del grupo control fue de 9,059.61, 10,508.22 en el grupo M1 y 11,108.86 en el grupo M1.2, apreciable en las tres columnas de la derecha.

Finalmente se realizó un Test de Barlett para evaluar la homocedasticidad de los grupos del conteo celular, integridad de polisacáridos de membrana basal en

PAS e integridad del colágeno de la membrana basal en TCM comparando grupo control versus grupo descelularizado longitudinal, axial proximal y axial distal, resumido en la **tabla 10**.

Grupo	Corte	Barlett C.	Valor p	P < 0.05
C. Núcleos	Long	7.487	0.0237	Si
	A. Prox	17.97	0.0001	Si
	A. Dist	16.70	0.0002	Si
PAS	Long	1.654	0.4374	No
	A. Prox	3.390	0.1836	No
	A. Dist	1.575	0.4550	No
TCM	Long	15.13	0.0005	Si
	A. Prox	1.797	0.4071	No
	A. Dist	3.204	0.2015	No

Tabla 10. Resultado de contraste de igualdad de varianzas. Barlett C.= Barlett Corregido, C. Núcleos = Contéo de Núcleos, Long = Longitudinal, A. Prox = Axial Proximal, A. Dist = A. Distal.

Además, se cuantificó la intensidad densitométrica para evaluar la integridad de la MEC.

En este análisis, se presentaron diferencias entre las tres diferentes regiones de las muestras del NPH, en la que se observa conservación de polisacáridos. Se cuantificó la intensidad densitométrica para evaluar la integridad de la MEC con sus componentes de colágeno con la tinción de TCM. Se observó que el tejido estaba respetado y tenía buena organización.

Se cuantificó la intensidad densitométrica para evaluar la integridad de la MEC con sus componentes de polisacáridos con la tinción de PAS y colágeno con la tinción de TCM. Se encontraron diferencias entre las tres diferentes regiones de las muestras del NPH, en la que se observa conservación de polisacáridos y colágeno, además de la estructura de la muestra.

DISCUSIÓN.

La reparación de lesiones nerviosas con injertos de nervio periférico re-celularizados con células tipo-Schwann derivadas de células madre mesenquimales ha tenido resultados óptimos en modelos animales, superando incluso al convencional autoinjerto nervioso²².

Para ello, es fundamental lograr la eliminación de núcleos neuronales con la mayor preservación de los componentes de andamiaje del nervio periférico; por lo que se han escalado progresivamente los modelos animales para el protocolo de descelularización y re-celularización²⁵. En los que el detergente principal empleado para la remoción celular fue el tritón X-100 de tipo aniónico.

En este trabajo se utilizaron detergentes de tipo anfotérico siguiendo el protocolo US Patient "Justia"³¹. Obteniendo resultados que apoyan nuestra hipótesis de que las técnicas de descelularización a base de detergentes promueven la remoción celular, con cierta tendencia de preservación de polisacáridos y colágeno de la membrana basal según la prueba de Barlett. Sin embargo, aunque los resultados del ANOVA fueron favorables en cuestión del conteo celular e integridad de poliscacáridos fueron estadísticamente significativos y solo tendencia hacia la preservación del colágeno de la membrana basal.

Al comparar nuestros resultados de descelularización con detergente anfotérico (condroitina) contra el detergente aniónico X-100; aunque favorables la preservación de andamiaje fue estadísticamente significativa solo en ocasiones dentro de los subgrupos TCM y no en todos como en el X-100.

Estas variaciones pueden deberse al tipo de nervio periférico, dado que para el actual estudio se usó nervio sural que es principalmente sensitivo. No así como el nervio ciático que tiene axones tanto motores como sensoriales, además de la importante diferencia de calibre y número de axones.

Otro factor relevante va en relación con Hudson et al, en el que mencionan que "Los nervios humanos procesados por el método de Hudson et al. mostraron sustancialmente más residuos celulares que los informados para los nervios de rata."³¹. Por lo que estamos haciendo modificaciones en la técnica de la preparación del andamio, para poder obtener el porcentaje adecuado de descelularización en el nervio periférico humano.

Ultimadamente, los resultados del análisis indican que las técnicas de descelularización a base de detergentes y condroitinasa promueven la remoción celular, necesaria para la recelularización del andamio con células tipo Schwann; sin embargo, aunque los resultados son favorecedores, se determinó que se buscaría una mayor remoción celular por medio de cambios en la concentración del buffer.

VIII

CONCLUSIÓN

De acuerdo con lo observado en este estudio, la técnica de descelularización a base de detergentes y controitinasa es un método efectivo en nervios periféricos humanos *in vitro*:

- El cual permite reducir su número de núcleos neuronales, lo cual es necesario para evitar rechazo tisular en modelos *in vivo*.
- Es capaz de conservar componentes clave del andamiaje neuronal como son los polisacáridos y colágeno de la membrana basal.

Se sugiere lograr una descelularización mayor a 90 por ciento del conteo de núcleos preservando polisacáridos y colágeno extracelulares antes de progresar esta línea de investigación al protocolo de recelularización *in vitro* con células tipo Schwann derivadas de adipocitos; por lo que hay que hacer modificaciones en la técnica de la preparación del andamio.

DECLARACIONES.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los estándares éticos del comité responsable para la experimentación en humanos de nuestra institución.

Se obtuvo el Consentimiento Informado de todos los participantes incluidos en el estudio individualmente, de acuerdo con las regulaciones establecidas por el comité de ética de nuestra institución.

No hay conflictos de intereses. No se recibió apoyo financiero para este estudio.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*. 1998;45(1):116–22.
2. Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, de la Garza-Castro O, Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S. [Study of peripheral nerve injury in trauma patients]. *Gaceta medica de Mexico*. 2014;150(6):527–32.
3. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair [Internet]. Vol. 87, *International Review of Neurobiology*. *Int Rev Neurobiol*; 2009 [cited 2021 Jun 21]. p. 141–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682637/>
4. Horteur C, Forli A, Corcella D, Pailhé R, Lateur G, Saragaglia D. Short- and long-term results of common peroneal nerve injuries treated by neurolysis, direct suture or nerve graft. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopedie traumatologie*. 2019 May;29(4):893—898. 2005
5. Ruijs ACJ, Jaquet JB, Kalmijn S, Giele H, Hovius SER. Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair [Internet]. Vol. 116, *Plastic and Reconstructive Surgery*.

6. Draeger RW, Bynum Jr DK, Patterson JMM. Simplified cable nerve grafting with nerve-cutting guides and fibrin glue. *J Hand Microsurg.* 2017;9:167-169.
7. Kuffler DP, Foy C. Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
8. Zhang, P. X., Han, N., Kou, Y. H., Zhu, Q. T., Liu, X. L., Quan, D. P., Chen, J. G., & Jiang, B. G. (2019). Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 14(1), 51–58. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.243701>
9. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery* [Internet]. 2001 [cited 2020 Oct 14];107(6):1419–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11335811/>
10. Whitlock, E. L., Tuffaha, S. H., Luciano, J. P., Yan, Y., Hunter, D. A., Magill, C. K., Moore, A. M., Tong, A. Y., Mackinnon, S. E., & Borschel, G. H. (2009). Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 39(6), 787–799.
11. Chato-Astrain J, Philips C, Campos F, Durand-Herrera D, García-García OD, Roosens A, et al. Detergent-based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Oct 14];14(6):789–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293801/>
12. Rbia N, Bulstra LF, Bishop AT, van Wijnen AJ, Shin AY. A simple dynamic strategy to deliver stem cells to decellularized nerve allografts. Vol. 142, *Plastic*

- and Reconstructive Surgery. 2018. p. 402–13.
13. Moore ZEH, Webster J. Dressings and topical agents for preventing pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2013;8(8):CD009362. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955535>
 14. di Summa PG, Kingham PJ, Campisi CC, Raffoul W, Kalbermatten DF. Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair. *NeurosciLett*. 2014 Jun;572:26–31.
 15. Jiang, L., Zheng, Y., Chen, O., Chu, T., Ding, J., & Yu, Q. (2016). Nerve defect repair by differentiated adipose-derived stem cells and chondroitinase ABC-treated acellular nerves. *International Journal of Neuroscience*, 126(6), 568–576. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1048547>
 16. Dudakovic A, Camilleri E, Riester SM, Lewallen EA, Kvasha S, Chen X, et al. High-resolution molecular validation of self-renewal and spontaneous differentiation in clinical-grade adipose-tissue derived human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2014;115(10):1816–28.
 17. Taniuchi, M., Clark, H. B., & Johnson, E. M. (1986). Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), 4094–4098. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.4094>
 18. Gersey, Z. C., Burks, S. S., Anderson, K. D., Dididze, M., Khan, A., Dietrich, W. D., & Levi, A. D. (2017). First human experience with autologous Schwann cells to supplement sciatic nerve repair: Report of 2 cases with long-term follow-up. *Neurosurgical Focus*, 42(3), 1–7. <https://doi.org/10.3171/2016.12.FOCUS16474>
 19. Mathot F, Rbia N, Bishop AT, Hovius SER, van Wijnen AJ, Shin AY. Adhesion,

- distribution, and migration of differentiated and undifferentiated mesenchymal stemcells (MSCs) seeded on nerve allografts. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Oct 14];73(1):81–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31202698/>
20. Arreola Romero A. Células mesenquimales humanas diferenciadas in vitro a células de schwann. 2011: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080223828.PDF>
 21. Sondell, M., Lundborg, G., & Kanje, M. (1998). Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Research*, 795(1–2), 44– 54. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00251-0)
 22. García-Pérez MM, Martínez-Rodríguez HG, López-Guerra GG, Soto-Domínguez A, Said-Fernández SL, Morales-Ávalos R, et al. A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: Morphological and functional assessments. *Histology and Histopathology* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 Oct 14];32(8):779–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27858399/>
 23. López Guerra GG. Descelularización de nervio ciático de rata y su posterior recelularización in vitro con células de Schwann. 2014: <http://eprints.uanl.mx/4846/1/1080233189.pdf>
 24. Pedroza-Montoya F. Reparación de lesiones nerviosas por xenoinjertos acelulares humanos, recelularizados con células de schwann en un modelo ovino. 2019: <http://eprints.uanl.mx/17794/1/1080291904.pdf>
 25. Tamez-Mata Y, Pedroza-Montoya FE, Martínez-Rodríguez HG, García-Pérez MM, Ríos-Cantú AA, González-Flores JR, et al. Nerve gaps repaired with

- acellular nerve allografts recellularized with Schwann-like cells: Pre-clinical trial. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2021 Jun 17;
26. Mathot F, Rbia N, Thaler R, Bishop AT, van Wijnen AJ, Shin AY. Introducing human adipose-derived mesenchymal stem cells to Avance® nerve grafts and NeuraGen® nerve guides. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2020;73(8):1473–81.
 27. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (2003). *Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico- infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*.
 28. Hudson, T. W., Liu, S. Y., & Schmidt, C. E. (2004). Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Engineering*, 10(9–10), 1346– 1358.
 29. Muir, D. F. (2017). *METHOD FOR DECELLULARIZATION OF TSSUE GRAFTS* (Patent No. US 9,572,911 B2).
 30. Debbie Neubauer, James B. Graham, and D. M. (2007). Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Exp Neurol*, 207(1), 163–170. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
 31. US Patent for Method for decellularization of tissue grafts Patent (Patent # 9,572,911 issued February 21, 2017) Justia Patents Search <https://patents.justia.com/patent/9572911>
 32. Ahmed, O., Brockmeier, D., Lee, K., Chapman, W. C., & Doyle, M. B. M. (2020). Organ donation during the COVID-19 pandemic. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. <https://doi.org/10.1111/ajt.16199>

33. Lovati, A. B., D'Arrigo, D., Odella, S., Tos, P., Geuna, S., & Raimondo, S. (2018). Nerve repair using decellularized nerve grafts in rat models. A review of the literature. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00427>

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.

Edgar Arturo Peñarrieta Daher

Candidato para el Grado de

Especialista en Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva

Tesis: “DESCELULARIZACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS HUMANOS *IN VITRO*: FASE 1”.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía: Nacido en Coatzacoalcos, Veracruz el 14 de Mayo de 1988, hijo de Jaime Peñarrieta Ruíz y Leticia Daher Romo.

Educación: Egresado de la Universidad La Salle, Facultad de Medicina, grado obtenido Médico Cirujano en 2012.

Grado de Especialista en Cirugía General obtenido 2018 por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Grado de Maestría en Administración de Hospitales y Servicios de Salud obtenido en 2021 por la Universidad Cuauhtemoc Aguascalientes.

Experiencia profesional: Adscrito del turno matutino en el Servicio de Cirugía General del Hospital General Balbuena de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México de Septiembre 2018 a Febrero 2020.

Residente del programa de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey, Nuevo León, de Marzo 2020 a Febrero 2024.

**“DESCELULARIZACIÓN DE NERVIOS
PERIFÉRICO HUMANO *IN VITRO*: FASE 1”.**

Por

DR. EDGAR ARTURO PEÑARRIETA DAHER

**Como requisito para obtener el grado de
Especialista en**

CIRUGÍA PLÁSTICA ESTÉTICA Y RECONSTRUCTIVA

Asesor: Dr. med. Mauricio Manuel García Pérez

Diciembre 2023