



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSIO VILLEGAS”
DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

**“EFECTO DE LA COLÁGENO POLIVINIL PIRROLIDONA
Y DEL PEGAMENTO DE FIBRINA SOBRE LA
REINERVAIÓN DEL NERVIO LARÍNGEO RECURRENTE
(ESTUDIO EXPERIMENTAL)”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA
Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA:

DR. ROSD BERTO CASTELLANOS LUNA

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
M. EN C. RAÚL OLMOS ZUÑIGA**

**CO-ASESORES:
DR. ANTONIO SODA-MERHY
DR. ROGELIO JASSO VICTORIA**



MÉXICO, D. F.

AGOSTO DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho este espacio no solo para agradecer por mi tesis sino durante mi carrera a:

A DIOS, aunque no te conozco siempre has estado conmigo

A toda mi FAMILIA, ya que con su ejemplo, apoyo incondicional, sacrificio y amor hicieron posible alcanzar esta meta

A la ciudad de México que me abrió sus puertas incondicionalmente

Al Dr. Antonio Soda por haber sido un maestro y abrirme las puertas de la mejor sede de Otorrinolaringología de México

A mis maestros y adscritos: Dr. Alejandro Jiménez, Dr. Arturo Ramirez, Dr. Gabriel Tona, Dra. Maria Lidia Sánchez, Dra. Carmen Tirado, Dra. Lissette Carranco, Dr. Bernardo Davila y muy especialmente a la Dra. Lisette Cristerna y a mi maestro y amigo Dr. Mario Hernández Palestina.

A mis compañeros y amigos: Carlos Fortuny, Eloisa, Leonardo, Santillan, Fernando, Yuria, Nidia, Ivette, Mario, Ingue, Laura, Karla, Karen, Gabriel, Jaime, Raul, Jenny, Tony, Ivan, Rigo, Adriana, Graciela, por todo el tiempo y recuerdos que compartimos durante la residencia y por brindarme su amistad.

A Daniel Figueredo e Ivan Schobert por la valiosa, verdadera y duradera amistad que hicimos y que nos unió, por los tiempos difíciles que compartimos y abrirme las puertas incondicionalmente en sus familias a quien también les guardo un profundo cariño, mi corazón y mis mejores deseos siempre con ustedes.

A mis amigas y compañeras de generación Rosalva y Iohannan por todo el tiempo que compartimos juntos en las buenas y malas...y a ti Miriam aunque muy lejos gracias por tu incondicional amistad.

A Iván Rosada y Eduardo López por la hermandad y amistad que nos une en todo momento y porque aprendimos a "...serle siempre fiel a nuestros sueños"

Muy especialmente a todo el departamento de Investigación en cirugía experimental del INER, M en C J Raul Olmos, Dr. Jasso, M en C Avelina Sotres, Matilde Baltarez-Lipp, Dr. Miguel Gaxiola, Dr. Santibáñez, Dr. Villalba, Lulu, Sergio, Juan Carlos, Beto así como Arturo de Biomédica por todo el esfuerzo, entrega y dedicación para la realización de este trabajo.

Le dedico todo este esfuerzo con toda mi alma y mi corazón a
Jessi, Ian, Josy e Isabella
...solo nosotros sabemos el valor de cada minuto juntos

M. EN C. J. RAÚL OLMOS-ZUÑIGA

ASESOR DE TESIS

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DR. ANTONIO SODA-MERHY

CO-ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO INER-ICV

DR. ROGELIO JASSO-VICTORIA

CO-ASESOR DE TESIS

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DR. MIGUEL GAXIOLA-GAXIOLA

CO-ASESOR DE TESIS

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA INER-ICV

M. EN C. AVELINA SOTRES-VEGA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

QFB MATILDE BALTAZARES LIPP
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DR. JAIME VILLALBA-CALOCA
CO-ASESOR DE TESIS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE TRANSPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL
INER-ICV

DR. J. ALFREDO SANTIBAÑEZ SALGADO
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

ÍNDICE

RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	2
II. JUSTIFICACIÓN.	6
III. HIPÓTESIS.	6
IV. OBJETIVOS.	
1. Objetivo general.	7
2. Objetivos específico.	7
V. MATERIAL Y MÉTODOS.	
1. Recursos.	8
2. Animales de experimentación.	9
2.1. Criterios de inclusión.	9
2.2. Criterios de exclusión.	9
2.3. Criterios de eliminación.	9
3. Grupos de estudio.	10
4. Anestesia.	10
5. Técnica quirúrgica.	11
6. Tratamiento.	12
7. Evaluación.	12
7.1. Clínica.	12
7.2. Endoscópica.	13
7.3. Estimulación eléctrica	13
7.4. Macroscópica.	14
7.5. Microscópica.	14
7.6 Identificación visual de la conducción neuronal utilizando una reacción colorida.	15

VI. RESULTADOS.	
1. Hallazgos clínicos.	17
2. Hallazgos endoscópicos.	17
3. Hallazgos de estimulación eléctrica.	18
4. Hallazgos macroscópicos.	19
5. Hallazgos microscópicos.	19
6. Hallazgos de la identificación visual de la conducción neuronal utilizando una reacción colorida.	21
VII. DISCUSIÓN.	23
VIII. CONCLUSIONES.	29
IX. FIGURAS.	30
X. GRÁFICAS.	37
XI. CUADROS.	41
XII. BIBLIOGRAFÍA.	42

RESUMEN

Efecto de la colágeno polivinil pirrolidona y del pegamento de fibrina sobre la reinervación del nervio laríngeo recurrente (Estudio experimental).

Introducción. En la actualidad, no existe un tratamiento óptimo para reparar el daño del nervio laríngeo recurrente (NLR), para tratar de solucionar este problema, se han realizado neurorrafias y la colocación de autoinjertos de nervios periféricos o de conductos biodegradables, pero con ninguna de estas opciones se ha alcanzado el éxito deseado, dado que no proporcionan una matriz extracelular capaz de mejorar la cicatrización, el crecimiento axonal y la conductividad de éste, regenerando la funcionalidad de la cuerda vocal. La colágeno polivinil pirrolidona (CPVP) y el pegamento de fibrina (PF) son fármacos que se han utilizado en la reparación de nervios periféricos y medula espinal y se ha observado, que favorecen la regeneración fascicular, la reconexión y la conducción nerviosa, lo que sugiere que pueden proporcionar una matriz que favorezca la cicatrización, el crecimiento axonal y la conductividad de éstos, además de prevenir la atrofia de los músculos laríngeos.

Objetivo. Determinar el efecto de la aplicación tópica de colágeno polivinil-pirrolidona y del pegamento de fibrina sobre la cicatrización de las anastomosis del NLR, así como en la regeneración neuronal y funcional del mismo.

Material y métodos. Se realizó neurorrafia del NLR en 18 conejos que fueron tratados con aplicación tópica del fármaco a estudiar de la siguiente manera: Grupo I (n=6): Neurorrafia con Solución Salina Fisiológica (SSF). Grupo II (n=6): Neurorrafia con CPVP. Grupo III (n=6): Neurorrafia con PF. Se realizaron evaluaciones clínica y endoscopia laríngea con y sin la estimulación eléctrica del NLR. Al finalizar el estudio, se realizaron evaluaciones macroscópica y microscópica (hallazgos histológicos y visualización del transporte axonal del nervio reanastomosado mediante el revelado de una peroxidasa). El análisis estadístico de todos los datos se llevó a cabo con ANDEVA y Tukey. Todos los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

Resultados. Todos los animales presentaron una evolución clínica satisfactoria. Endoscópicamente, los animales tratados con PF no mostraron atrofia de las cuerdas vocales. Al final del estudio, ningún animal presentó motilidad cordal espontánea, aunque en los grupos de CPVP y de PF, ésta se observó después de un estímulo eléctrico. Macroscópicamente, el grupo II (CPVP) desarrolló menos fibrosis (ANDEVA+Tukey, $p < 0.01$). Histológicamente todos los animales desarrollaron inflamación y fibrosis perineural, sin embargo en el grupo III (PF) ésta fue severa (ANDEVA+Tukey: $p < 0.05$). El ordenamiento de las fibras de colágena en el sitio de la anastomosis fue significativamente mejor en los grupos II (CPVP) y III (PF) (ANDEVA+Tukey: $p < 0.01$). La reacción colorida de la detección de peroxidasa indicó que el grupo III (PF) presentó mayor conducción neural ($p < 0.01$ ANDEVA+Tukey).

Conclusión. La aplicación tópica de PF postneurorrafia del NLR, disminuye la atrofia de las cuerdas vocales, favorece la motilidad cordal postestimulación eléctrica y una mayor conducción neural a las 6 semanas postcirugía.

Palabras clave: Nervio laríngeo recurrente (NLR), neurorrafia, colágeno polivinil pirrolidona (CPVP), pegamento de fibrina (PF), atrofia de las cuerdas vocales, motilidad cordal, conducción neural.

I. INTRODUCCIÓN.

La vía aérea superior, es una estructura que interviene en los procesos de respiración, fonación y deglución, y como todo sistema del organismo, no se encuentra libre de patologías que puedan interferir con alguna de estas funciones.

Entre las diferentes alteraciones que afectan las funciones del tracto respiratorio se incluye la parálisis de las cuerdas vocales, la cual puede ser el resultado del daño en los nervios laríngeo superior y/o recurrente, ocasionado por la presencia de neoplasias, cirugía de cuello o tórax, trauma laríngeo, enfermedades infecciosas, inflamatorias e idiopáticas (1,2).

La reinervación deficiente de los músculos laríngeos después del daño del nervio laríngeo recurrente (NLR) produce varios estados de disfunción laríngea, como la pérdida de las acciones motoras coordinadas, que generan en el paciente diferentes síntomas dentro de los que se incluyen varios grados de disfonía, tendencias a la aspiración o daño de la vía aérea (3). A esto, se le llama sinquinesis y puede variar en el carácter y la severidad, de clase I a clase IV (4). Se ha considerado como factor patológico fundamental de la sinquinesis laríngea la mala reinervación de los músculos laríngeos intrínsecos, dada posiblemente por otros nervios adyacentes o por la deficiente reinervación del NLR dañado, con la subsecuente pérdida de la organización topográfica central (3,4).

Se ha pensado que las ramas periféricas de los nervios craneales son más fáciles de regenerar que el sistema nervioso central (SNC). El daño de los axones periféricos, usualmente se extiende a través de las heridas ocasionadas por los traumas. Sin embargo, funcionalmente algunas ramas periféricas de los nervios craneales como el oculomotor y el laríngeo recurrente se regeneran poco como los del sistema nervioso central (5-8).

El sistema nervioso periférico (SNP) presenta regeneración axonal tanto en mamíferos adultos como en todos los vertebrados (9) y como las neuronas no son reemplazadas en estos, la recuperación de la función depende de que vuelvan a crecer los axones de las neuronas dañadas y formen las conexiones adecuadas. Sin embargo, el crecimiento de los axones es muy limitado y muchas de las funciones quedan bloqueadas de manera permanente (parálisis cordal), debido a que la restitución de la funcionalidad después de una axotomía de un nervio motor es generalmente dependiente de factores como una muerte neuronal, denudación sináptica, etapa de regeneración y grado de mala reinervación del músculo blanco (3,10-12).

Hoy en día, no existe un tratamiento óptimo para reparar el daño del nervio laríngeo recurrente. Se han intentado diversos métodos para restablecer el mecanismo de válvula de las cuerdas vocales, dentro de los que se incluye la realización de procedimientos de aumento de la cuerda vocal, medialización de la cuerda vocal con tiroplastia y aducción aritenoidea, pero con ninguno de éstos, se ha logrado el éxito deseado (13-16).

También se han realizado reanastomosis del NLR con ingesta de medicamentos como la nimodipina, y se ha observado que aunque incrementa el crecimiento axonal, la funcionalidad no es total (3), por otra parte, cuando el nervio se encuentra muy dañado para su reparación, se ha recurrido, como primera elección, al uso de autoinjertos de nervios periféricos, ninguno de esos procedimientos ha demostrado utilidad en este nervio, ya que genera serias complicaciones, como desórdenes funcionales del nervio y neuronas del sitio donador (5). Así mismo, se han desarrollado varios tipos de conductos nerviosos biodegradables, principalmente a base de ácido poliglicólico para la reconstrucción de estos y se han reportado altos porcentajes de mejoría, sin que llegue a ser el método ideal (17-19).

Si bien se ha intentado la reconstrucción del nervio laríngeo recurrente utilizando diferentes materiales y la ingesta de medicamentos, aún no se han encontrado alternativas quirúrgicas o fármacos capaces de mantener una matriz extracelular adecuada que permita la regeneración axonal y la cicatrización del NRL después de ser reanastomosado.

La colágeno polivinil pirrolidona (CPVP) es una mezcla de colágena porcina del tipo I y polivinil-pirrolidona (20,21,22). El pegamento de fibrina, es un compuesto hecho a base de albúmina sérica bovina (23) son fármacos que por su composición bioquímica, pueden aportar substancias como laminina, fibronectina y colágena, componentes de la matriz extracelular y contribuir a formar una buena cicatrización y favorecer la regeneración axonal (5,24).

La CPVP, se utiliza como modulador de la cicatrización (20-25,26). Se ha utilizado experimentalmente para mejorar la cicatrización de nervios ciáticos en ratas y se ha observado, que después de ser aplicado entre los bordes nerviosos seccionados y neurorrafia de los mismos, no se produce tejido cicatrizal en la periferia del nervio ni en los tejidos vecinos, favoreciendo la regeneración fascicular, la reconexión y la conducción nerviosa (27).

Existen otros estudios experimentales, en los que se ha utilizado pegamento de fibrina en la reparación de sección medular completa en ratas, en los que se reporta que éste, incrementa tanto el crecimiento de fibras nerviosas mielinizadas organizadas longitudinalmente, como el crecimiento y alineación de fibras neuronales y glía de Schwann (28).

Con base en lo anterior, es factible suponer que el realizar una neurorrafia del nervio laríngeo recurrente, en combinación con la aplicación tópica de CPVP o con pegamento de fibrina, pueden proporcionar una matriz extracelular que mejore la cicatrización, el crecimiento axonal y la conductividad de éste.

II. JUSTIFICACIÓN.

Existen diferentes patologías que afectan las funciones del tracto respiratorio y una de éstas, es la parálisis de los repliegues vocales, la cual puede ser el resultado de algún daño a los nervios laríngeo superior y/o recurrente, siendo las neoplasias y la cirugía de cuello o tórax las principales causas, aunque también contribuyen el trauma laríngeo, las enfermedades infecciosas, inflamatorias e idiopáticas. Existen varios tratamientos para las parálisis cordales uni y bilaterales, todas con diversos resultados funcionales. La reinervación del nervio laríngeo recurrente utilizando diversas técnicas se ha probado tanto en estudios experimentales como “in vivo” obteniendo resultados variables. Con este estudio, se intenta demostrar que las técnicas de reinervación convencionales asociadas al tratamiento con medicamentos de uso local capaces de promover y regular la cicatrización, mejorarán la regeneración nerviosa, el crecimiento axonal y la funcionalidad del NLR.

III. HIPÓTESIS.

La colágeno polivinil-pirrolidona y el pegamento de fibrina aplicados tópicamente en el sitio de la anastomosis termino-terminal del nervio laríngeo recurrente promoverán una buena cicatrización, así como la regeneración neuronal y funcional del segmento nervioso reanastomosado.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la aplicación tópica de colágeno polivinil-pirrolidona y del pegamento de fibrina sobre la cicatrización de las anastomosis del nervio laríngeo recurrente, así como en la regeneración neuronal y funcional del mismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar endoscópicamente la movilidad espontánea de las cuerdas vocales y después de la aplicación de un estímulo eléctrico en el nervio laríngeo recurrente reanastomosado, tratado con la aplicación tópica de CPVP o con pegamento de fibrina.
2. Valorar los cambios macroscópicos que sufren las anastomosis del nervio laríngeo recurrente después de ser tratadas con CPVP o con pegamento de fibrina.
3. Determinar histológicamente la cicatrización y regeneración neuronal en la anastomosis termino-terminal del nervio laríngeo recurrente después de la aplicación tópica de CPVP o pegamento de fibrina.
4. Determinar mediante la identificación microscópica de una reacción colorida, la conductividad nerviosa del segmento proximal a distal en la anastomosis termino-terminal del nervio laríngeo recurrente, después de la aplicación tópica de CPVP o pegamento de fibrina.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio experimental, prospectivo.

1. Recursos.

Esta investigación fue financiada por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER-ICV), con la participación de los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental y de los investigadores del departamento de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello del mismo Instituto.

El departamento de Cirugía Experimental proporcionó los quirófanos, equipos de anestesia inhalada, monitores, microscópios y el instrumental necesario para la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento postoperatorios de los animales.

También intervino en este estudio, personal del Departamento de Investigación en Morfología del INER-ICV, quién procesó las muestras de los tejidos sometidos a estudio. El responsable de la descripción de los hallazgos histopatológicos, fue el patólogo investigador de este departamento, Dr. Miguel Gaxiola-Gaxiola.

Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por el bioterio del INER-ICV.

2. Animales de experimentación.

Se utilizaron 18 conejos (Nueva Zelanda), sanos, sin importar el sexo o la edad, con un peso entre 3 y 3.5 Kg. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (29) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (30).

2.1. Criterios de inclusión.

Se incluyeron conejos Nueva Zelanda clínicamente sanos, que no presentaron datos de ningún padecimiento respiratorio, desde su ingreso al bioterio del INER hasta antes de que se realizara el procedimiento quirúrgico.

2.2. Criterios de exclusión.

Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al bioterio del INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de cuello, laringe o tráquea, fueron excluidos del estudio.

2.3. Criterios de eliminación.

Animales que mostraron datos clínicos de cualquier patología que no fueron producidos por el procedimiento quirúrgico

3. Grupos de estudio.

Grupo I (n=6): Se realizó sección quirúrgica del NLR cervical con anastomosis termino-terminal y con la aplicación tópica de solución fisiológica al 0.9%.

Grupo II (n=6): Se realizó sección quirúrgica del NLR cervical con anastomosis termino-terminal combinada con aplicación tópica de CPVP (Fibroquel, Aspid S.A. de C.V., México D.F)

Grupo III (n=6): Se realizó sección quirúrgica del NLR cervical con anastomosis termino-terminal combinada con la aplicación tópica de pegamento de fibrina (Bioglue, Surgical Adhesive, Cryolife Inc. Kennesaw, Georgia, USA.)

4. Anestesia.

Los animales se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos y líquidos. La anestesia en todos los grupos de estudio se indujo con hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) a dosis de 5 mg/Kg. y clorhidrato de ketamina (Ketavet, Fort Dodge, Iowa, USA) (35 mg/kg) IM mezclados en la misma jeringa e inmediatamente se les aplicó dipirona (Metamizol Sódico-Nondol-Sector Salud) a dosis de 28 mg/Kg. IV como analgésico. Durante todo el procedimiento quirúrgico, la anestesia fue mantenida con propofol (Diprivan, Astra Seneca, S.p.A. Milan Italia) en infusión IV a dosis de 1.5 mg/kg/min (31).

Una vez anestesiados, los animales fueron colocados sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, vigilando los signos vitales durante todo el procedimiento quirúrgico, con un monitor para electrocardiografía (Datascopé Passport, New Jersey, USA).

Acto seguido, se rasuró y se lavó con jabón quirúrgico la región traqueal cervical, con límite craneal en la región de la mandíbula y límite caudal con el hueso supraesternal. Finalmente, se realizó la antisepsia de la zona con yodo povidona (Dermodine Solución, Dermodex S.A. de C.V.)

5. Técnica quirúrgica.

Se realizó una incisión media en la región cervical ventral, se disecó el tejido celular subcutáneo y platisma hasta llegar a los músculos infrahioideos (esternohioideo y esternotirohioideo) los cuales se separaron en la línea alba hasta llegar a la tráquea, posteriormente con un microscopio para microcirugía (OPMI 19-FC, Karl Zeiss, West Germany, Germany) se identificó el nervio laríngeo recurrente, que se disecó (Figura 1A) y seccionó a nivel del octavo anillo traqueal (Figura 1B) y finalmente se realizó anastomosis termino-terminal con material no absorbible de 9 ceros (Nylon monofilamento, Ethicon, Sao Paulo, Brasil) con un punto separado (Figura 1C). Terminada la neurorrafia, se aplicó el tratamiento establecido de acuerdo al grupo de estudio (Figura 1D) y se cerró por planos sin dejar drenaje.

En el postoperatorio inmediato, a todos los animales se les aplicó metamizol como analgésico cada 6 horas durante los primeros 3 días post-cirugía, así como penicilina procaínica (22,000 UI/Kg., IM) más 500 mg de sulfato de estreptomicina IM durante 7 días (31).

6. Tratamiento.

El tratamiento, únicamente se aplicó en forma inmediata posterior a la neurorrafía. En los conejos del grupo I, se aplicó SSF. En el grupo II se instilaron 28.2 mg de CPVP (que es la dosis utilizada para los problemas de piel y tendones, estenosis traqueales crónicas y anastomosis de nervio ciático) diluidos en 3 ml de agua destilada (20-25-27). En el grupo III se instiló el pegamento de fibrina a la dosis utilizada para el tratamiento de las lesiones medulares (28).

7. Evaluación.

El estudio tuvo una duración de 6 semanas.

7.1. Clínica.

En forma posterior a la realización del procedimiento, los animales fueron colocados dentro de jaulas y mantenidos en condiciones habituales de bioterio. Se observó la presencia de disnea o estridor, coloración de mucosas, frecuencia respiratoria, ruidos respiratorios y frecuencia cardíaca. Se valoró asimismo la herida quirúrgica por la presencia de sangrado, hematoma y/o infección. La evaluación clínica, se realizó diariamente desde el postoperatorio inmediato y cada tercer día hasta concluir el tiempo del estudio establecido (6 semanas).

7.2. Endoscópica.

Los animales de experimentación fueron sometidos a una evaluación endoscópica de la laringe con ayuda de un endoscopio rígido de 5 mm (Karl Storz Germany, Germany) en forma previa al procedimiento quirúrgico, para la valoración de la movilidad cordal bilateral espontánea, inmediatamente después de la sección del NLR para corroborar la parálisis cordal producida, 3 días antes de someterlos a fin de estudio durante la inyección del colorante utilizado para identificar la conductividad y al finalizar el estudio. Los parámetros valorados fueron la movilidad cordal y presencia de atrofia de cuerdas vocales que se encuentren paralizadas. Todos los procedimientos fueron videograbados.

7.3. Estimulación eléctrica para valorar la motilidad de las cuerdas vocales.

Se realizó estimulación eléctrica directa del NLR, utilizando un equipo para evaluar la integridad de nervios (Medtronic Comed, NIM-Pulse 2.0, Jacksonville USA) programado en la modalidad de tiroides a 1.10 miliamperes con una frecuencia de 4 Hertz y una duración de estímulo de 100 microsegundos aplicando un filtro de 3.10 milisegundos. Esta evaluación se realizó al finalizar el estudio para valorar por vía endoscópica la motilidad cordal.

Para sensar la respuesta a la estimulación se utilizaron electrodos, los cuales se colocaron de la siguiente manera: Canal 1 en el músculo esternocleidomastoideo, canal 2 en el músculo tiroaritenideo derecho y el canal 3 (tierra del sistema) se colocó a nivel cutáneo supraesternal (Figura 2). (5)

7.4. Macroscópica.

Una vez transcurridas las 6 semanas postcirugía, los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) (31) en forma previa a la realización de la evaluación macroscópica de la neurorrafia del NRL.

Macroscópicamente se revisó la cantidad de adherencias formadas por el nervio hacia los tejidos de los alrededores, el estado de la anastomosis y el tipo de cicatriz formada (normal, presencia de neuromas o dehiscencia).

La evaluación de las adherencias se realizó de acuerdo con una escala subjetiva descrita por Olmos et al, con base en la severidad de éstas y con graduación de cero a cuatro, en la que: 0 = sin adherencias, 1 = adherencias mínimas fácilmente despegables, 2 = adherencia completa de fácil despegamiento, 3 = adherencia completa de difícil despegamiento (32,33).

7.5. Microscópica.

Para la evaluación microscópica, se resecó y disecó un segmento del NRL proximal de 5 mm y un segmento distal de 5 mm a la anastomosis. Inmediatamente después, el tejido fue sumergido durante 24 horas en una solución de formol amortiguado al 10% y procesado para su inclusión en bloques de parafina, cortes de 4 micras y tinciones con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, y azul de toluidina para evaluar inflamación, presencia de fibrosis, organización de las fibras de colágena y estado general de la anastomosis nerviosa.

La evaluación histológica del tejido mediante microscopía de luz se realizó en toda la circunferencia y longitud del NLR utilizando una escala semicuantitativa, en la cual, a cada parámetro evaluado le fue asignado un porcentaje de acuerdo con la intensidad de los cambios histopatológicos (0-10 % ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado y del 51-100% severo).

La organización de las fibras de colágena se realizó mediante una escala subjetiva descrita por el Dr. Miguel Gaxiola, la cual se basa en la disposición que toman las fibras de colágena: 1 fibras de colágena sin dirección definida, 2 alineamiento de las fibras de colágena con forma de espina de pescado, con tendencia a ser paralelas al plano del borde de la lesión, 3 alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión y 4 proliferación excesiva de las fibras de colágena con alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión.

7.6. Identificación visual de la conducción neuronal utilizando una reacción colorida.

Utilizando un corte de 2 micras obtenido del tejido incluido en el bloque de parafina, montado sobre una laminilla silanizada, desparafinado mediante incubación a 60°C durante 30 minutos, rehidratado, clarificado e hidratado utilizando xilol y una serie de alcoholes absoluto-96°C-70° se identificó la recuperación del transporte axonal a través de un marcador proteico (enzima peroxidasa rábano picante) que fue inyectado en la porción proximal del nervio reanastomosado (Figura 3) tres días antes de finalizar el estudio y evaluar, si después de la instilación, el marcador se

encontraba presente en la porción distal del mismo utilizando una tinción con aminoetilcarbazol y contratinción con hematoxilina-eosina y carbonato de litio. La presencia de la peroxidasa en el tejido (reacción positiva, recuperación del transporte axonal) estuvo indicada por una tinción marrón y su ausencia (reacción negativa, el tejido no contiene la enzima) por una tinción color azul. Los resultados obtenidos fueron interpretados como positivos y negativos. Como controles positivos y negativos de la determinación, se incluyeron muestras de tejido sano, sin ningún tipo de tratamiento con y sin inyección de la peroxidasa respectivamente (5).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo para observar las diferencias dentro de cada grupo y entre grupos Análisis de Varianza (ANDEVA) y para identificar las diferencias significativas se utilizará la prueba de Tukey. Todos los valores de $p < 0.05$ se consideraran como significativos.

VI. RESULTADOS.

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido.

1. Hallazgos clínicos.

En todos los grupos de estudio, ningún animal (0%) mostró signos clínicos de infección de la herida quirúrgica, disnea, estridor o alteraciones en las constantes fisiológicas que siempre se encontraron dentro de los parámetros normales ($p=NS$ Andeva).

2. Hallazgos endoscópicos.

En forma previa a la cirugía, en todos los casos se observó motilidad espontánea de ambas cuerdas vocales y después de la sección del nervio, la cuerda derecha no mostró motilidad. Al respecto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni dentro ni entre los grupos de estudio. Al finalizar el estudio, el 100 % de los animales operados (18 conejos) mostraron parálisis de la cuerda vocal derecha [ANDEVA+Tukey, $p>0.05$ (ns)]. Sin embargo, al compararla con la motilidad precirugía, sí se observó diferencia significativa [ANDEVA+Tukey, $p<0.05$] (Gráfica 1).

En ningún caso se observó atrofia de las cuerdas vocales antes del procedimiento quirúrgico ni en forma inmediata posterior a la sección del nervio [ANDEVA+Tukey, $p>0.05$ (ns)]. Al final del estudio, el 100% de los animales del grupo I (SSF) mostraron atrofia de la cuerda vocal derecha, a diferencia de los que fueron tratados

con CPVP en los que únicamente 2 (33.3%) la presentaron y ninguno (0%) de pegamento de fibrina [ANDEVA+Tukey, $p<0.01$] (Gráfica 2) [Figura (4)]

3. Hallazgos de motilidad de las cuerdas vocales por estímulo eléctrico.

Al aplicar un estímulo eléctrico para desencadenar un potencial de acción del músculo tiroaritenoso derecho que moviliza la cuerda vocal, se observó que en los animales del grupo I (SSF), solo en 2 casos (33.3%) se presentó motilidad, en 5 casos (83.3%) del grupo II (CPVP) y en el 100% de los casos del grupo III (Fibrina) (Figura 5 y 6). Al comparar la motilidad de las cuerdas vocales por estímulo eléctrico entre grupos se encontró que los animales del grupo I (SSF) presentaron una menor motilidad, esta disminución, fue estadísticamente significativa [ANDEVA+Tukey, $p<0.01$] (Gráfica 3).

Con respecto a los estímulos mínimo y máximo que fueron requeridos para producir la motilidad, se observó que los animales del grupo I necesitaron un estímulo promedio mínimo de 0.38 mA con un máximo de 0.46 mA. En el grupo II (CPVP) fueron 0.39 mA como mínimo y 0.47 mA como máximo. Mientras que en el grupo III (Fibrina) el promedio del estímulo mínimo fue de 0.41 mA y el máximo de 0.47 mA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores promedio de los estímulos mínimo y máximo entre grupos de estudio [ANDEVA+Tukey, $p>0.05$ (ns)]

4. Hallazgos macroscópicos.

A la evaluación macroscópica, las anastomosis del NLR se observaron sin dehiscencia y con una cicatriz de apariencia normal. Con respecto a la cantidad de adherencias formadas del nervio hacia los tejidos de los alrededores, se observó que en el grupo I (SSF), 4 animales (66.6%) desarrollaron adherencia completa de fácil despegamiento y 2 de ellos (33.3%) adherencia completa de difícil despegamiento (Cuadro 1) (Figura 7A). En el grupo II (CPVP), 5 conejos (83.3%) desarrollaron adherencias laxas y uno, (16.6%) adherencia completa de fácil despegamiento (Cuadro 1). El 100% de los conejos del grupo III (Fibrina) desarrollaron adherencias, 3 conejos (50%) adherencia completa de fácil despegamiento y 3 (50%) adherencia completa de difícil despegamiento (Cuadro 1) (Figura 7B).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el desarrollo de adherencias dentro de cada uno de los grupos de estudio [ANDEVA+Tukey, $p>0.05$ (ns)], sin embargo, el desarrollo de adherencias fue estadísticamente menos severo cuando se utilizó tratamiento con CPVP (Grupo II) en comparación con los grupos de estudio I (SSF) y III (Fibrina) (ANDEVA+Tukey, $p<0.01$) (Cuadro 1).

5. Hallazgos microscópicos.

a) Inflamación perineural

Los resultados de la microscopía de luz revelaron que todos los animales operados (100%), presentaron inflamación perineural leve, moderada o severa (Figura 8).

En el grupo I (Solución salina), la inflamación perineural fue: leve en 4 conejos (66.66%) y moderada en dos animales (33.33%) (Figura 8B). En el grupo II (CPVP), la inflamación perineural fue moderada en 5 casos (83.3%) y en uno, severa (16.6%) (Figura 8C), mientras que en el grupo III (Fibrina), en 5 conejos (83.3%) fue severa y en uno (16.6%) leve (Figura 8D). Al comparar el grado de inflamación perineural entre los grupos de estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grados leve y moderado [ANDEVA: Inflamación leve y moderada, $p > 0.05$, (ns)], pero no así con la inflamación severa (ANDEVA: $p = 0.02$), que con respecto al grupo I (SSF) fue significativamente mayor en el grupo III (Fibrina) [ANDEVA+Tukey: SSF vs Fibrina, $p < 0.05$]. No se encontraron diferencias estadísticas en la inflamación perineural severa entre los grupos de estudio I (SSF) y II (CPVP), ni entre los grupos de estudio II (CPVP) y III (Fibrina) (ANDEVA+Tukey: SSF vs CPVP, y CPVP vs Fibrina, $p = \text{NS ANDEVA}$) (Gráfica 4).

b) Fibrosis perineural

Los resultados histológicos indicaron que todos los animales operados (100%) desarrollaron fibrosis perineural leve, moderada o severa a nivel de la anastomosis (Figura 8).

En el grupo de estudio I (SSF), la fibrosis perineural a nivel de la anastomosis fue: leve en un animal (16.6%), moderada en 2 (33.33%) y severa en 3 (50%) (Figura 8B). En los animales del grupo II (CPVP), en un caso (16.6%) se observó fibrosis leve, moderada en 3 (50%) y severa en 2 (33.3%) (Figura 8C). En el grupo III, un conejo (16.6%) presentó fibrosis perineural leve, otro (16.6%) moderada y 4 (66.6%)

severa (Figura 8D). El grado de fibrosis perineural severa a nivel de la anastomosis fue significativamente mayor en los animales del grupo III (Fibrina) (ANDEVA+Tukey: $p < 0.05$) en comparación con los que fueron tratados con SSF y CPVP (Gráfica 5).

C) Fibras de colágena

Con respecto a la disposición de ordenamiento que toman las fibras de colágena, en el grupo I (SSF), en los 6 animales (100%), las fibras de colágena formadas se observaron sin dirección definida (Figura 8B). En el grupo II (CPVP), 5 conejos (83.3%) desarrollaron fibras de colágena con alineación paralela al plano del borde de la lesión y solamente en un caso (16.6%), las fibras de colágena no presentaron dirección definida (Figura 8C). En cuatro conejos (66.6%) del grupo III (Fibrina) se observó una proliferación excesiva de las fibras de colágena con alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión y en los 2 (33.3%) casos restantes, fibras sin dirección (Figura 8D). El ordenamiento de las fibras de colágena con alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión fue estadísticamente mayor (ANDEVA+Tukey: $p < 0.01$) en los grupos de estudio II y III en los que los animales fueron tratados con CPVP y Fibrina con respecto al grupo I (SSF) (Gráfica 6) (Figura 9)

6. Hallazgos de la identificación visual de la conducción neuronal utilizando una reacción colorida.

Cinco de las muestras de tejido nervioso (83.34%) del grupo III (Fibrina) y una de las muestras (16.66%) del grupo II (CPVP), presentaron una coloración marrón interpretada como una reacción positiva que denota la presencia de peroxidasa y

conducción neural (Figura 9), lo que fue ratificado con las muestras de “tejido control positivo de la determinación”, obtenidas de animales sanos que no recibieron ningún tipo de tratamiento pero sí fueron inyectados con peroxidasa (Figura 10). Esta conducción, fue significativamente mayor en el grupo III (Fibrina), (ANDEVA+Tukey: Gpo I (SSF) vs Gpo II (CPVP): $p=0.06$ (ns), Gpo III (Fibrina) vs Gpo I (SSF): $p=0.002$ y Gpo III (Fibrina) vs Gpo II (CPVP): $p= 0.009$). En los 6 casos (100%) del grupo I (SSF), y en 5 (83.34%) del grupo II (CPVP), no se detectó la presencia de la peroxidasa (tinción azul, reacción negativa, al igual que en las muestras de “tejido control negativo” de la determinación obtenidas de animales sanos que no recibieron ningún tipo de tratamiento ni inyección con peroxidasa). Estos resultados se muestran en el cuadro 2 y se ilustran en la gráfica 7.

VII. DISCUSIÓN.

Existen diferentes patologías que afectan las funciones del tracto respiratorio y una de éstas es la parálisis de las cuerdas vocales, la cual puede ser el resultado de algún daño a los nervios laríngeo superior y/o recurrente (NLR), ocasionado por neoplasias y la cirugía de cuello o tórax, aunque también contribuyen el trauma laríngeo, las enfermedades infecciosas, inflamatorias e idiopáticas.

Aunque la mitad de los pacientes recupera espontáneamente la función del NLR, en ocasiones se tiene que recurrir a la reconstrucción quirúrgica del mismo, realizando una neurorráfa con anastomosis termino-terminal del segmento afectado (34), con el fin de recuperar la motilidad cordal y mejorar la calidad de voz; estas técnicas, son menos efectivas en mejorar los trastornos de aspiración (35). Sin embargo, cuando el nervio se encuentra muy dañado, se tiene que recurrir al uso de materiales que favorezcan su cicatrización, o a la colocación de injertos que permitan realizar la anastomosis del nervio dañado, además de someter a los pacientes a métodos de rehabilitación (24,36).

Se han utilizado conductos fabricados a base ácido poliglicólico, poliéster, poliláctidos y venas, embebidos en sangre o en suero autólogo con la finalidad de favorecer una matriz extracelular adecuada (24,37), sin embargo, ninguno de ellos ha figurado como el “método ideal”. Para favorecer la cicatrización, también se ha intentado la aplicación de medios que contienen proteínas presentes en la matriz extracelular como laminina, fibronectina y colágena (24), y que no generan el

desarrollo de tejido fibroso con el objeto de evitar la formación de neuromas y favorecer la regeneración axonal (5).

Con base en los componentes que integran la matriz extracelular y con la finalidad de desarrollar, establecer y mantener una matriz adecuada que permita la regeneración axonal y la cicatrización del NRL después de ser reanastomosado, en este estudio, se utilizaron 2 fármacos (Pegamento de fibrina y Colágeno polivinil pirrolidona) que de acuerdo a su composición bioquímica, es probable que proporcionen las proteínas adecuadas. Además, está reportado que el uso de ambos fármacos propician la formación de procesos cicatrizales normales y provocan mínima reacción inflamatoria. (20-23).

Los resultados obtenidos en esta investigación, denotan que después del procedimiento, todos los conejos operados presentaron una evolución clínica satisfactoria, sin la presencia de problemas respiratorios, ni de de deglución dado que solo se afectó una cuerda vocal.

Al parecer, la parálisis cordal observada al final del estudio, fue ocasionada porque después de reanastomosar el NRL y de aplicar el tratamiento con los fármacos, se requiere de una regeneración axonal completa y probablemente por la degeneración de los músculos de las cuerdas vocales, los cuales se atrofian fácilmente en ausencia del control nervioso, tal y como lo describe Nahm y Hydman (3,7). Sin embargo, al concluir el estudio, en los grupos de estudio II (CPVP) y III (Fibrina), se apreció una respuesta visual endoscópica de movilidad cordal al aplicar un estímulo

eléctrico, la cual de manera subjetiva, no se consideró como normal ni satisfactoria. Estos hallazgos coinciden con los reportados en la literatura (5) en los que inicia la motilidad cordal 8 semanas después de utilizar tubos de ácido poliglicólico como puente entre segmentos de NRL seccionado en un modelo experimental canino, sin embargo, advierten que esta respuesta motora presentó un registro normal entre los 4 y 6 meses poscirugía, lo que puede indicar que el proceso de regeneración axonal requiere de más tiempo para que se regenere la reinervación de los músculos cordales. Los hallazgos observados son similares a los observados por Woodson (38) quien en un estudio experimental realizado en gatos, demostró que en forma posterior a la sección de los nervios laríngeo recurrente y vago, existe reinervación preferencial del músculo tiroaritenideo, hallazgos histológicos de regeneración de mielina y resultados electromiográficos indicativos de regeneración de la función neuronal 6 meses después de realizada la sección, desafortunadamente, el tiempo de estudio establecido en este estudio fue de 6 semanas por lo que no fue posible corroborar los hallazgos.

La atrofia de la cuerda vocal observada al final del estudio en los grupos I (SSF) y II (CPVP) fue ocasionada por la denervación posterior a la sección del NLR y deficiencias en los procesos de cicatrización y regeneración del mismo, dado que estas respuestas se degeneran entre la segunda y tercera semana posterior al daño, tal y como lo reportó Gacek (39) quien denervó los NLR en gatos y describió los cambios producidos en el músculo cricoaritenideo posterior.

Los hallazgos macroscópicos encontrados en este estudio denotan que si bien se utilizó la técnica de anastomosis termino-terminal uniendo con un solo punto de sutura, en todos los casos, a nivel de la anastomosis se observó la formación de adherencias con los tejidos circundantes, probablemente ocasionadas como consecuencia del trauma quirúrgico (40). A este respecto, el hallazgo más importante fue que en los animales del grupo II (CPVP), estas adherencias fueron más laxas, lo cual puede atribuirse al tratamiento con colágeno polivinil pirrolidona que al parecer, participa en la regulación de la cicatrización, disminuyendo el proceso inflamatorio y la cantidad de colágena formada tal y como lo han descrito diferentes autores que la han utilizado en otros tejidos (21,22,41).

Con respecto a los hallazgos histológicos, es probable que la inflamación perineural severa observada en los tejidos de los animales del grupo III (Fibrina) se atribuya a una reacción derivada en respuesta al suero bovino fetal (SBF), que es uno de los componentes del pegamento, que puede actuar como una fuente potencial de factores inmunogénicos y de proteínas virales capaces de generar respuestas inflamatorias.

Por otra parte, el grado de fibrosis perineural moderada y severa observada por microscopía de luz en los conejos de los grupos de estudio I (SSF) y II (CPVP) permitió confirmar que tanto el pegamento de fibrina como la CPVP posiblemente aportaron las proteínas propicias para la formación de una matriz extracelular adecuada para el desarrollo de este tejido, como lo describió Rosen y la Food and Drug Administration (24,42). Aunque, los hallazgos encontrados en este trabajo no

coinciden con los descritos por otros autores que han utilizado la CPVP y que mencionan que ésta disminuye la inflamación y formación de fibras de colágena (21,22,41).

Los hallazgos de mejor organización de las fibras de colágena observada en las anastomosis del grupo II, coinciden con los de otros autores que mencionan que la CPVP ordena de manera adecuada las fibras de colágena del tejido cicatrizal (21,22,41).

Con relación a los grupos de estudio I (SSF) y III (Fibrina), en los cortes histológicos de los nervios pertenecientes al grupo II (CPVP) encontramos un aumento sustancial de colágena endoneural, especialmente a nivel de la anastomosis con características histológicas similares a las de la colágena nativa endoneural, lo cual pudiera sugerir una regeneración más temprana con relación a los grupos I (SSF) y III (Fibrina) en los que prácticamente la colágena endoneural se considero normal. Sin embargo, este incremento en la colágena endoneural no necesariamente sugiere conductividad y transmisión temprana, como lo está reportado en un estudio realizado por Kanemaru et al (5) en donde el desarrollo de nuevas fibras de colágena se apreció a las 8 semanas postcirugía, sin embargo, reporta que el tiempo mínimo requerido para la regeneración axonal es de 6 meses. Estos hallazgos pueden sugerir que, aunque la regeneración neuronal requiere de mayor tiempo para llegar a alcanzar los grupos musculares y producir movilidad de los mismos, los primeros indicios pueden aparecer incluso desde las 6 semanas, como lo demuestran los resultados encontrados en este estudio, ya que el revelado de la enzima peroxidasa rábano

picante utilizando el colorante aminoetilcarbazol, permitió observar el paso de ésta a través de la anastomosis del NLR, en los de los grupos de tratamiento con CPVP y principalmente con fibrina, lo que sugiere que la aplicación de CPVP o del pegamento de fibrina actúan como una matriz de soporte que favorece la regeneración axonal y por lo tanto buena regeneración del nervio, hallazgos que coinciden con lo descrito por otros autores que han trabajado en investigaciones enfocadas en la reinervación del NLR (5).

VIII. CONCLUSIONES.

- El aplicar tópicamente CPVP después de una neurorrafia de NLR disminuye la atrofia cordal, favorece la motilidad de las cuerdas vocales postestimulación eléctrica, disminuye la fibrosis perianastomótica, ordena de manera adecuada las fibras de colágena cicatrizales, aunque a través de la visualización del transporte axonal del nervio reanastomosado mediante el revelado de una peroxidasa muestra menor conducción neural (vs Fibrina) a las 6 semanas postcirugía.

- La aplicación tópica de PF postneurorrafia del NLR disminuye la atrofia de las cuerdas vocales, favorece la motilidad cordal postestimulación eléctrica, y a través de la visualización del transporte axonal del nervio reanastomosado mediante el revelado de una peroxidasa muestra mayor conducción neural (vs CPVP) a las 6 semanas postcirugía.

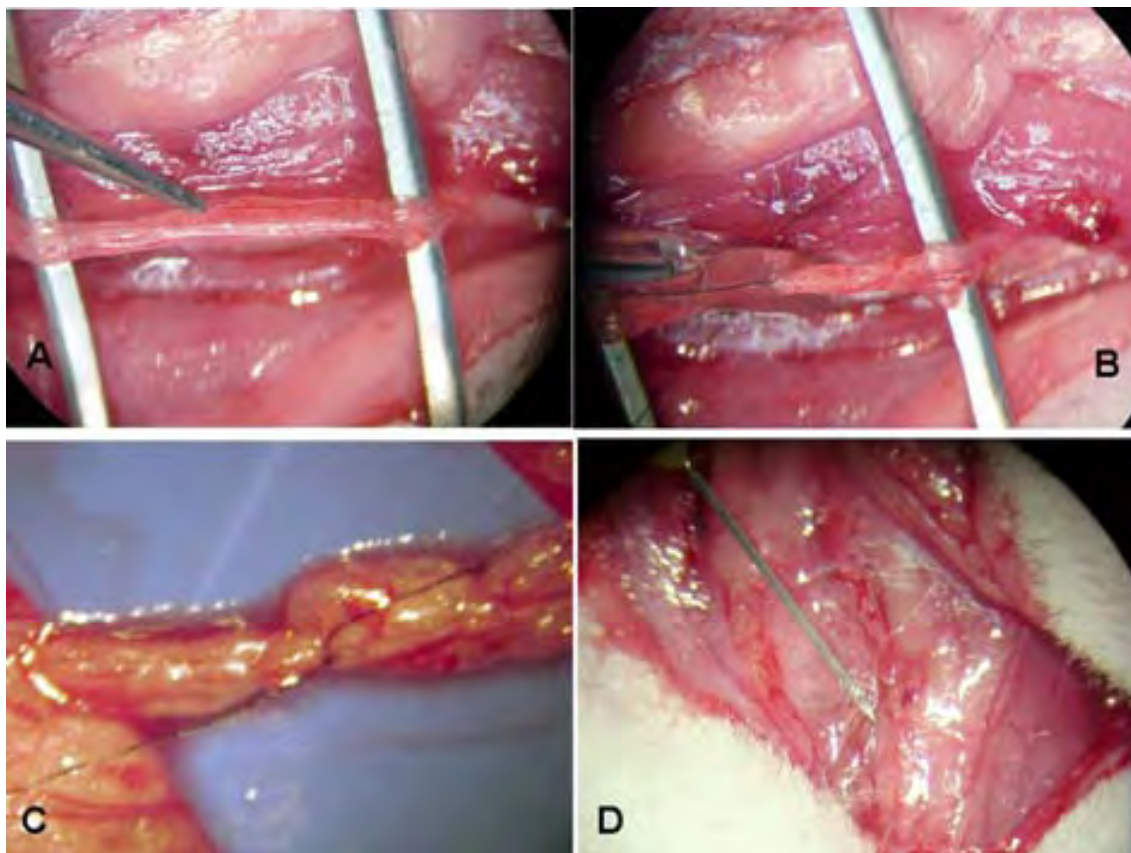
IX. FIGURAS.

Figura 1. Técnica quirúrgica A) Disección del nervio laríngeo recurrente (NLR). B) Sección del NLR. C) Fin de neurorrafia y D) Aplicación de CPVP.



Figura 2. Colocación de electrodos para estimulación eléctrica directa del NLR.



Figura 3. Inyección de la peroxidasa en la porción proximal del NLR reanastomosado.

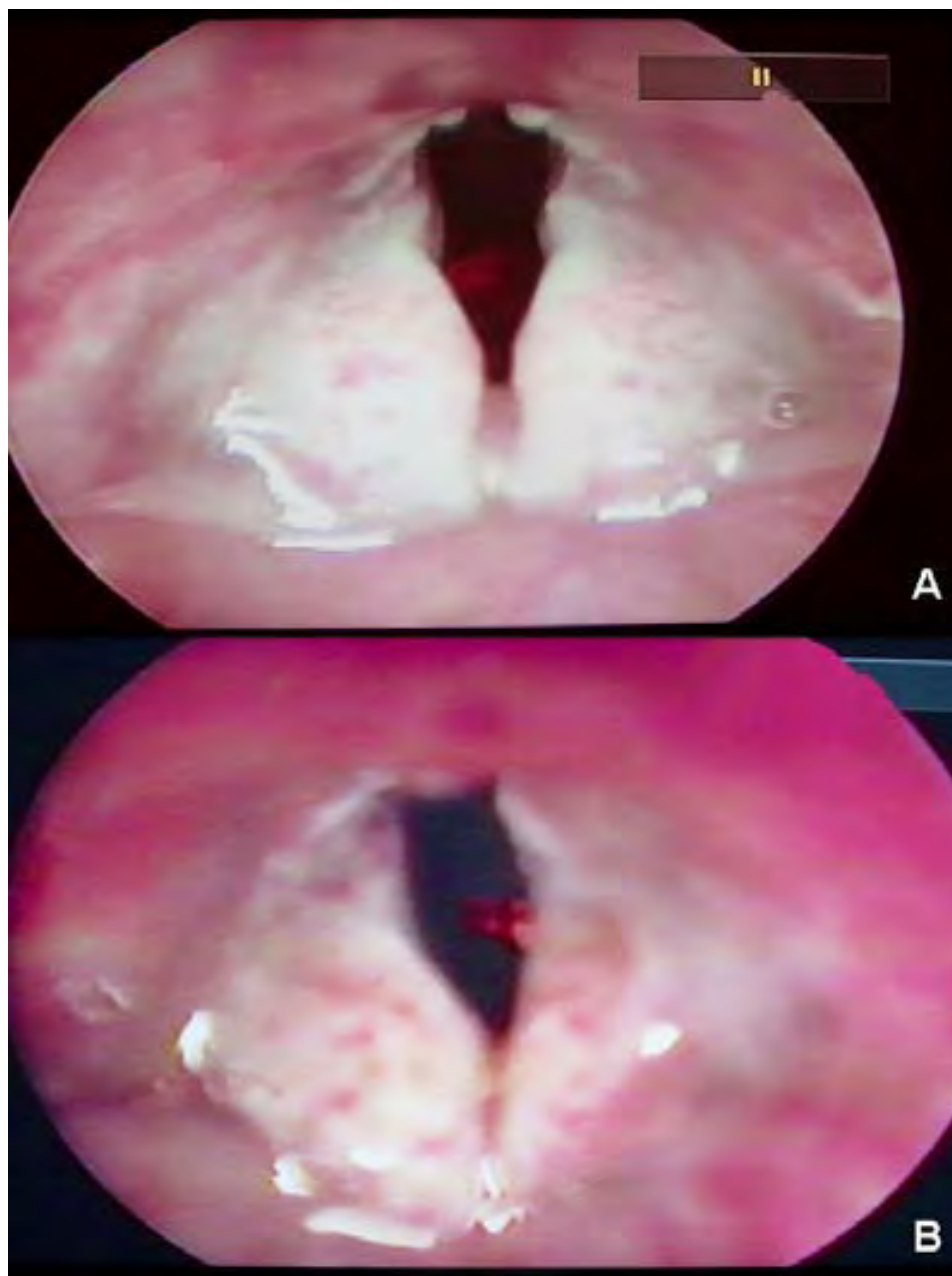


Figura 4. A) Muestra cuerda vocal normal precirugía y B) cuerda vocal atrofiada al final del estudio.

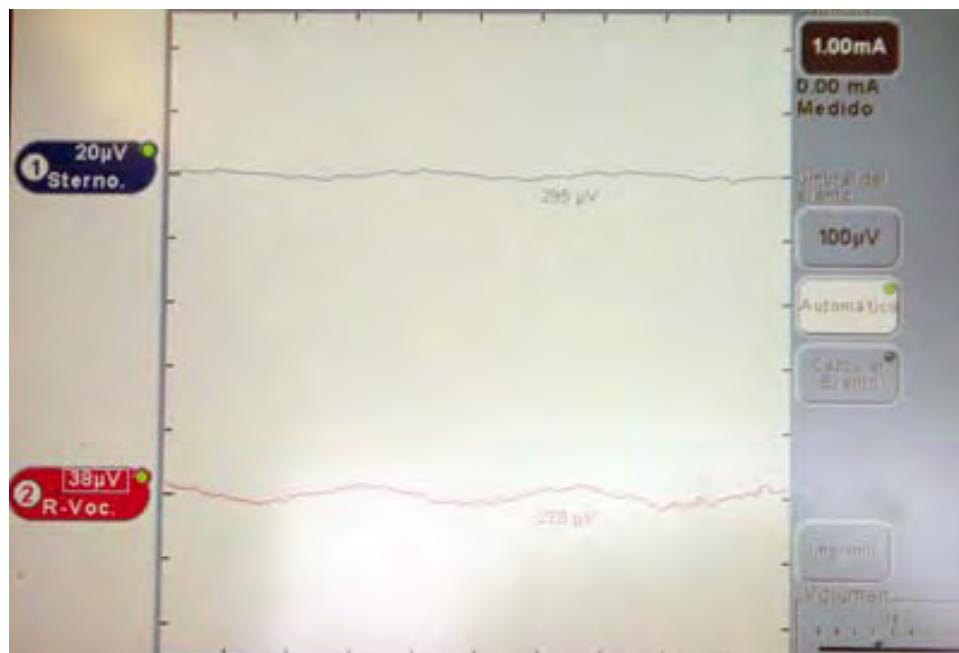


Figura 5. Se observa el EMG sin repuesta en un animal del grupo I al final del estudio.

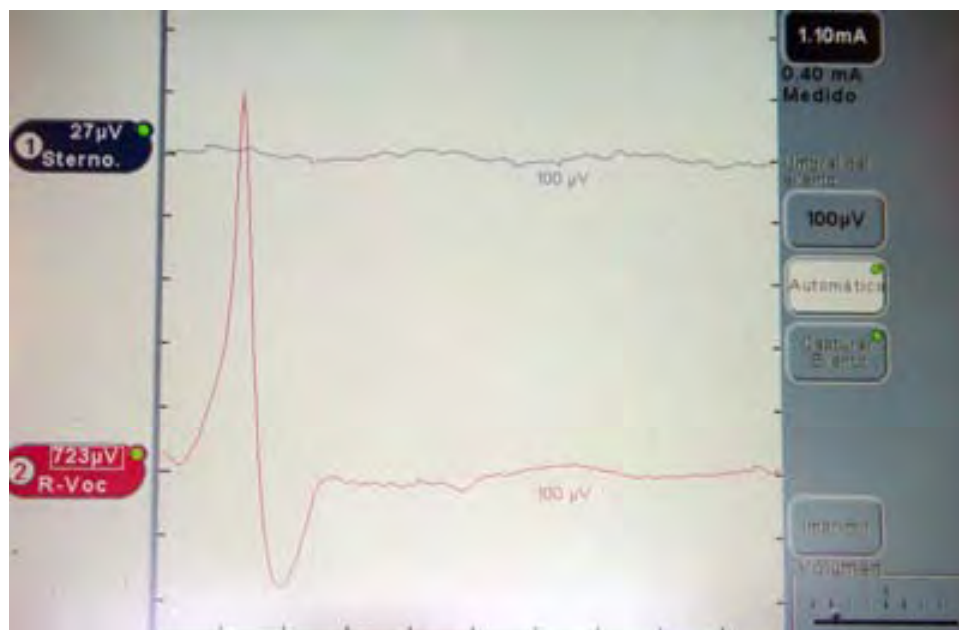


Figura 6. Muestra el EMG con repuesta en un animal del grupo III al final del estudio.

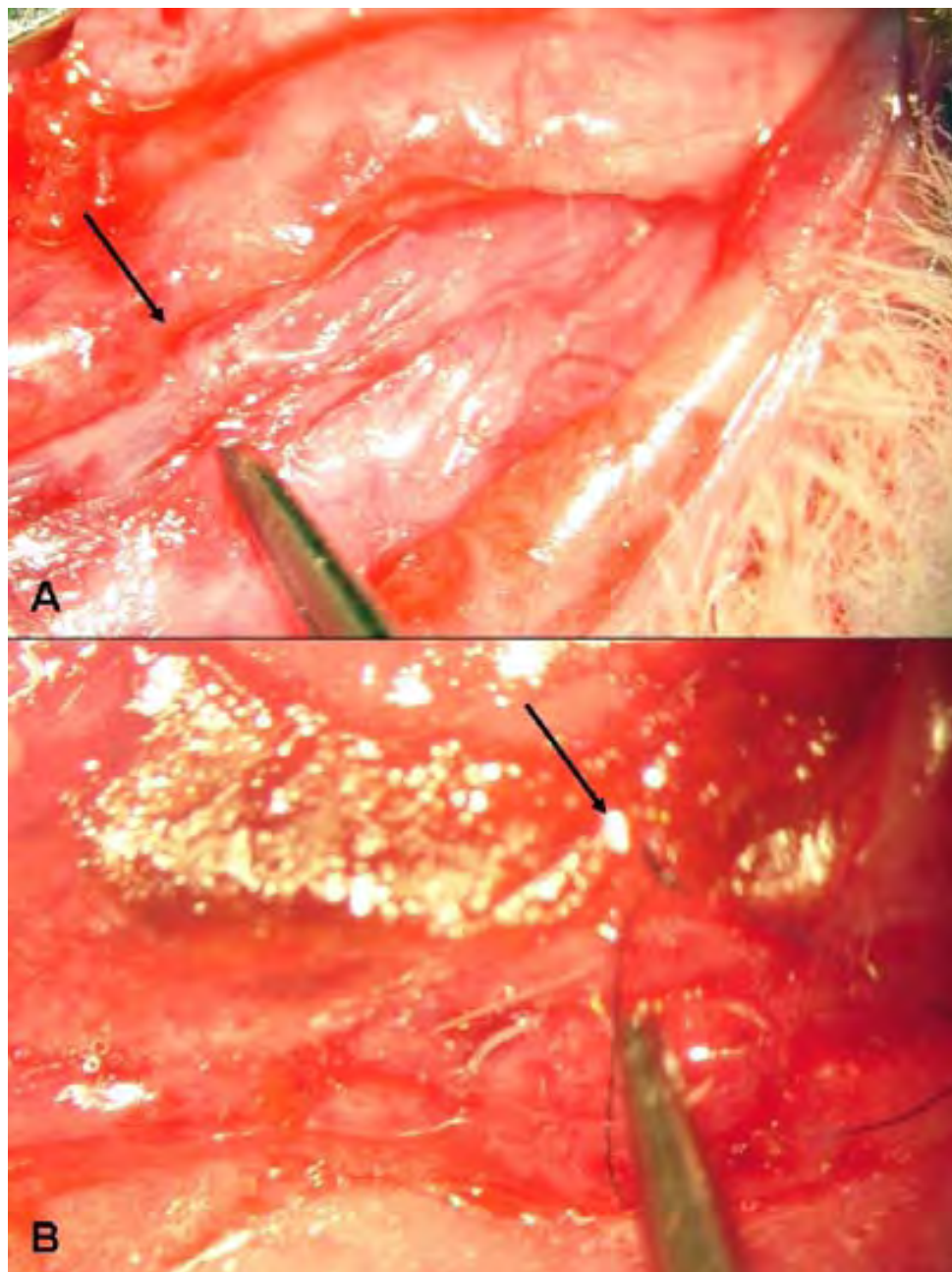


Figura 7. A) muestra la anastomosis del NLR con adherencias laxas al final del estudio en un animal tratado con CPVP.

B) Anastomosis del NLR (Flecha) con adherencias firmes al final del estudio en un animal tratado con PF.

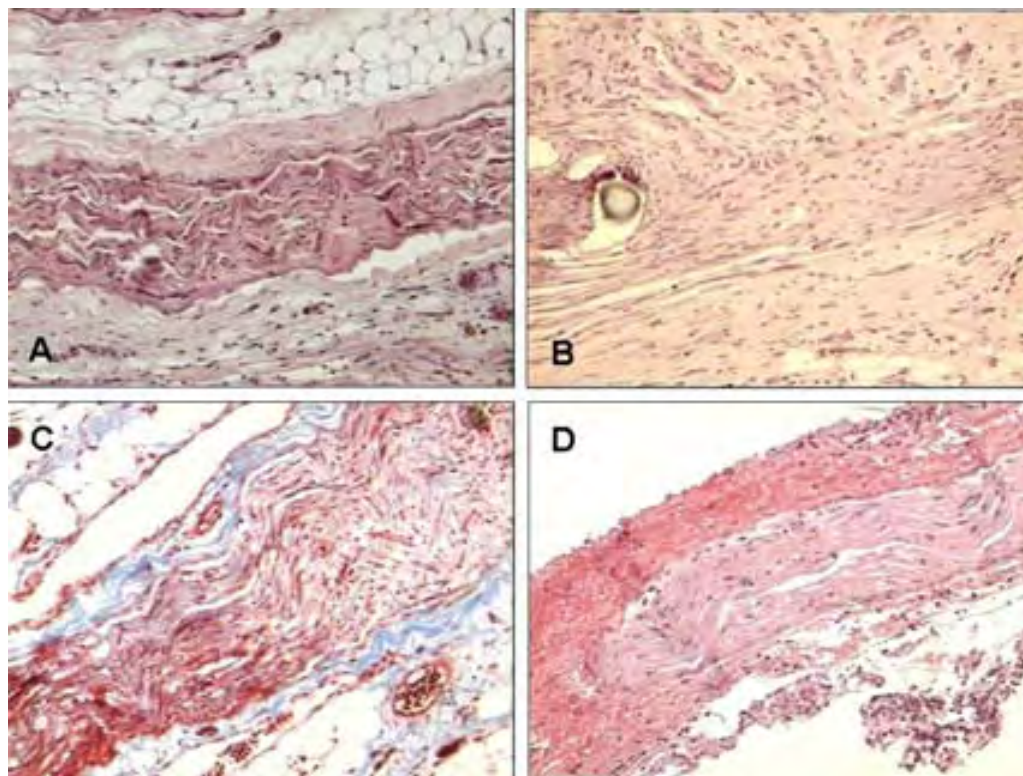


Figura 8. Macrofotografía que muestra

A) nervio laríngeo recurrente sano (HE, 10X), B) reacción inflamatoria y fibrosis perineural en un nervio tratado con SSF (HE, 10X), B), C) colágena endo y perineural bien organizada en un nervio tratado con CPVP (Masson 10X) y D) Fibrosis severa perineural y reacción inflamatoria en un nervio tratado con PF (HE, 10X).

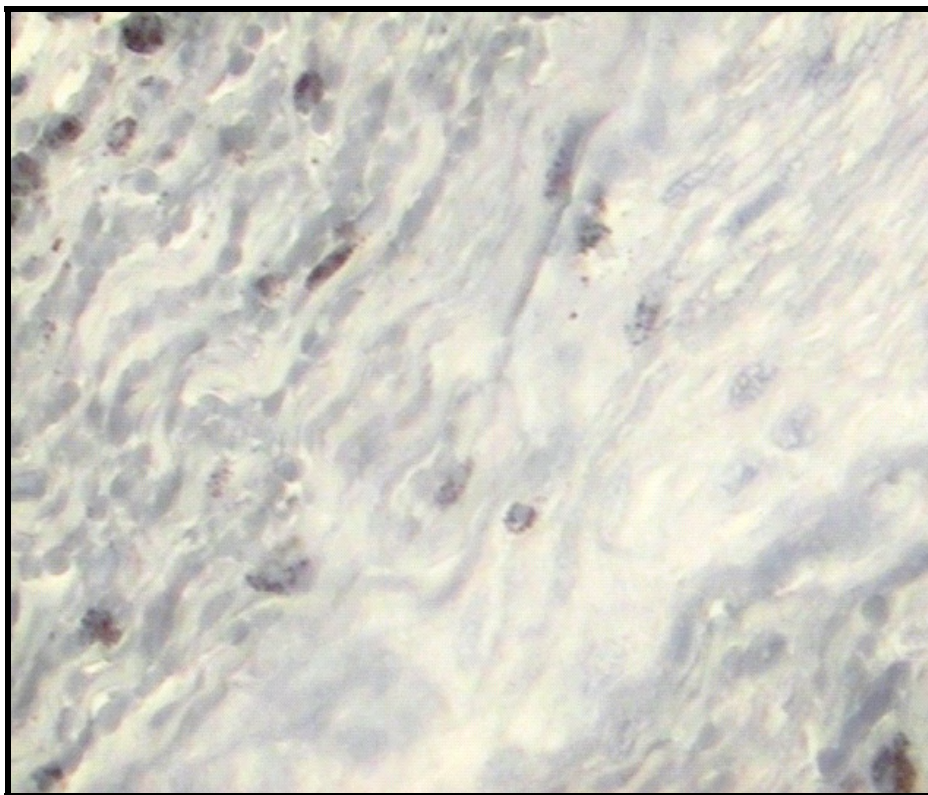


Figura 9. Conducción positiva (40X, AEC-H&E).

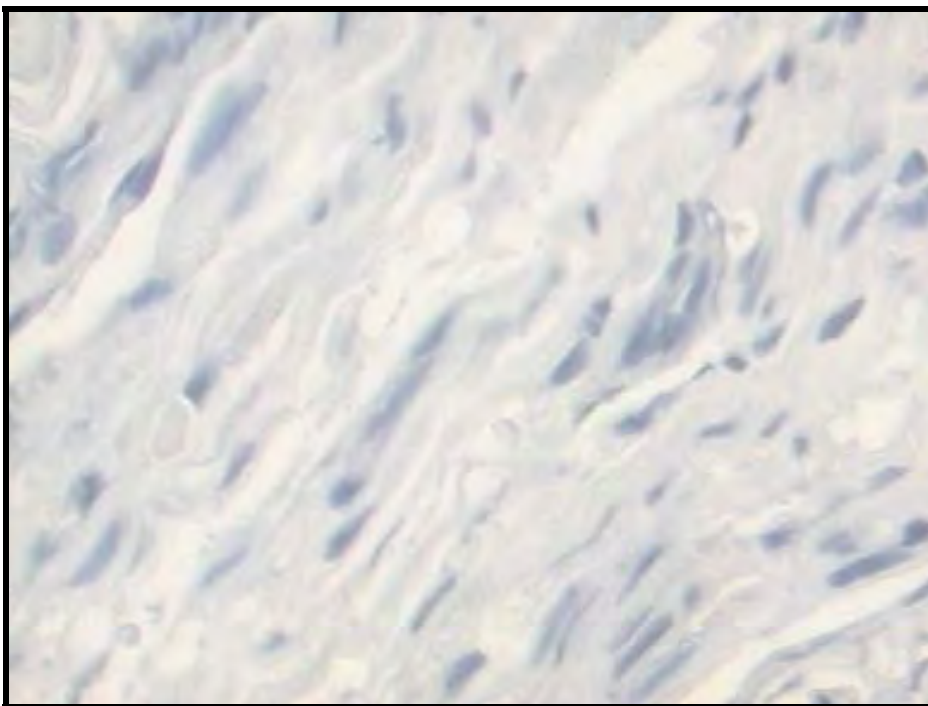
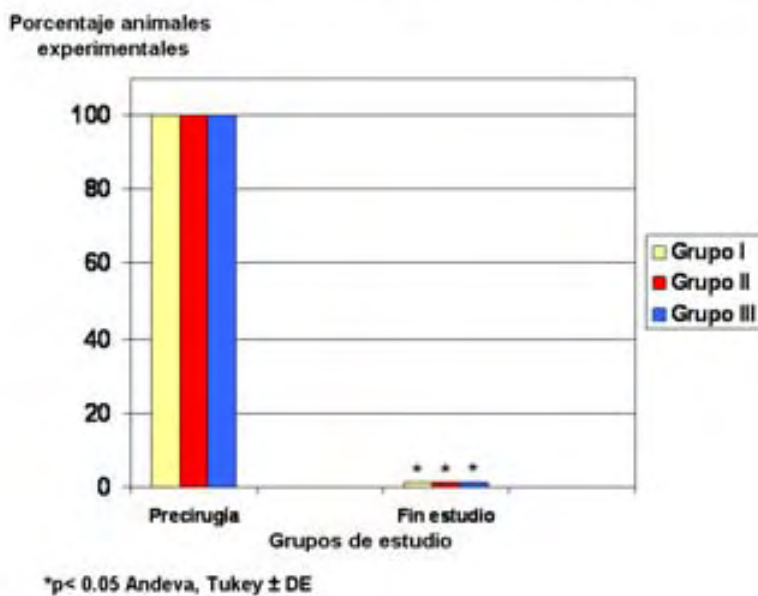


Figura 10. Conducción Negativa (40X, AEC-H&E).

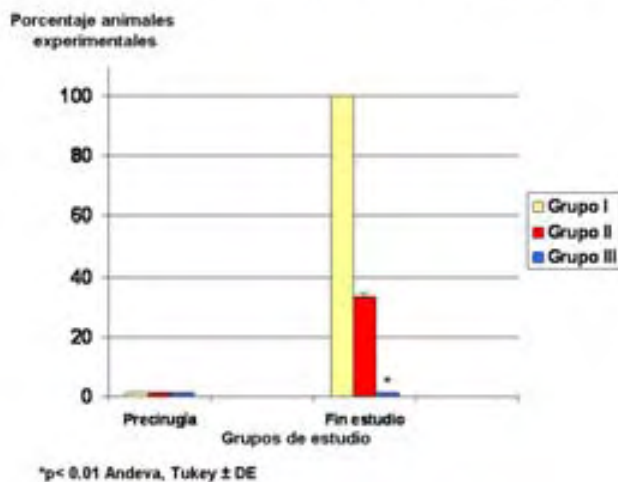
X. GRAFICAS.

Motilidad espontánea de la cuerda vocal derecha precirugía y al final del estudio.

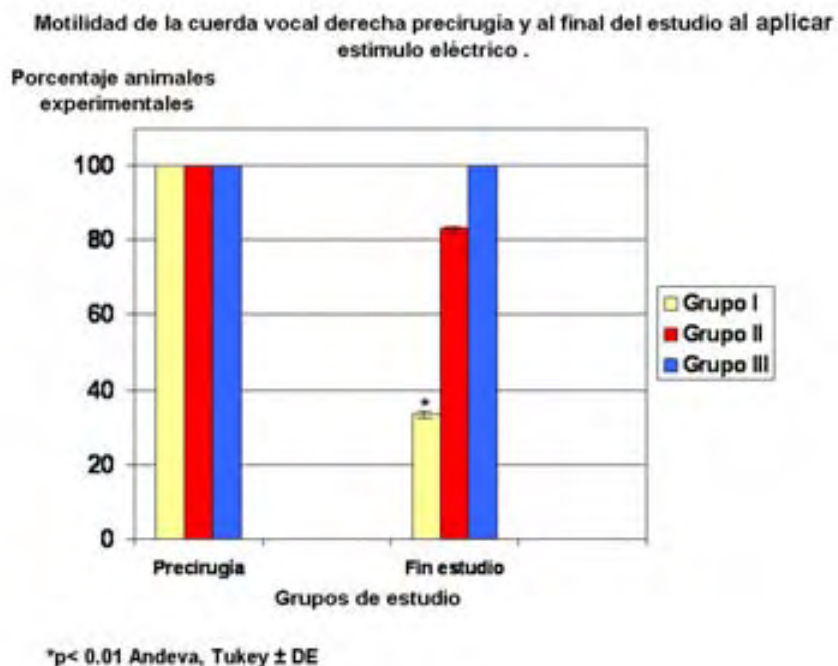


Grafica 1. Muestra la nula motilidad espontánea a las 6 semanas después de realizar la neurografía del NLR.

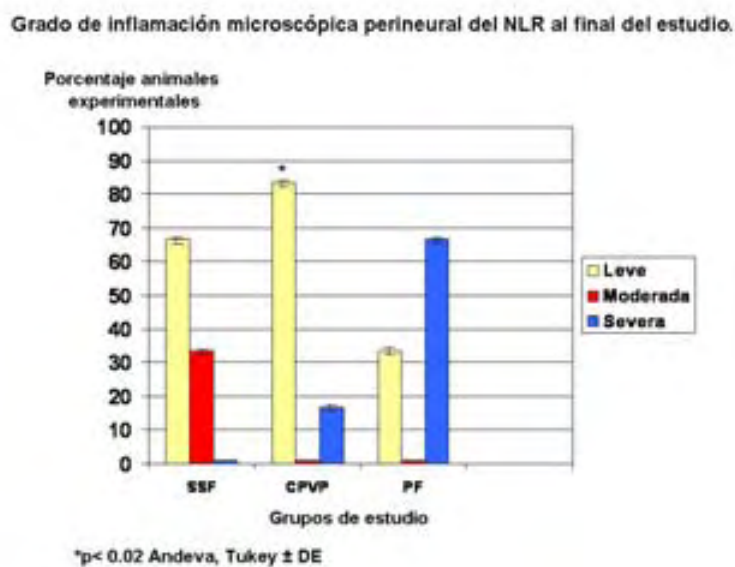
Atrofia de las cuerdas vocales precirugía y al final del estudio.



Gráfica 2. Se observa la importante atrofia de la cuerda vocal derecha en los animales del grupo I a las 6 semanas después de realizar la neurografía del NLR.

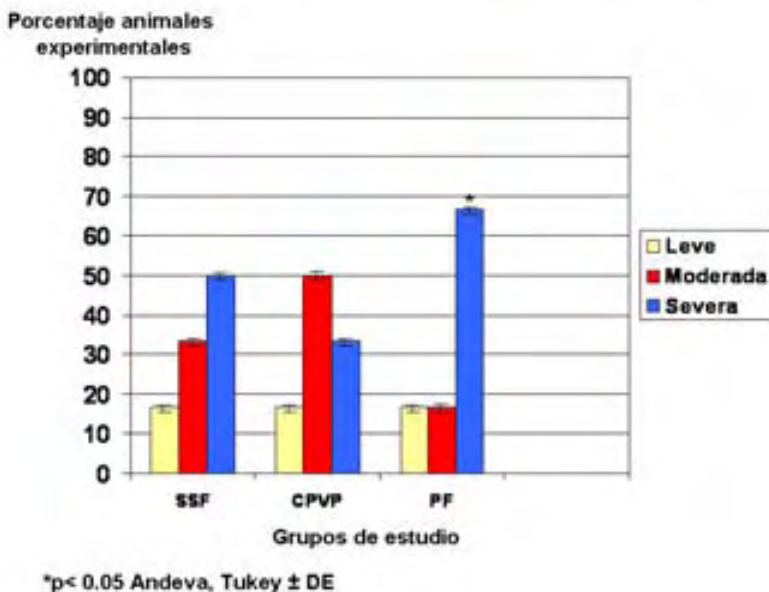


Gráfica 3. Motilidad de la cuerda vocal derecha posterior al estímulo eléctrico antes de la cirugía y al final del estudio.



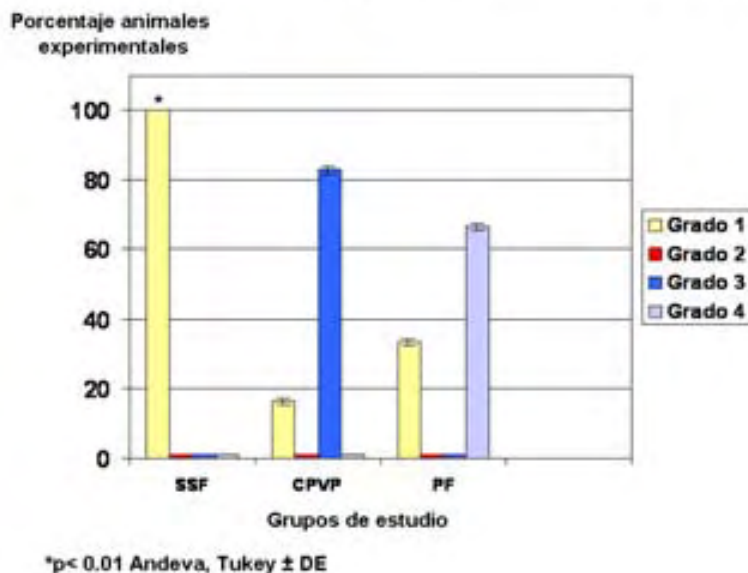
Gráfica 4. Grado de inflamación microscópica observada en cada grupo de estudio a las 6 semanas después de realizar la neurografía del NLR.

Grado de fibrosis microscópica perineural del NLR al final del estudio.



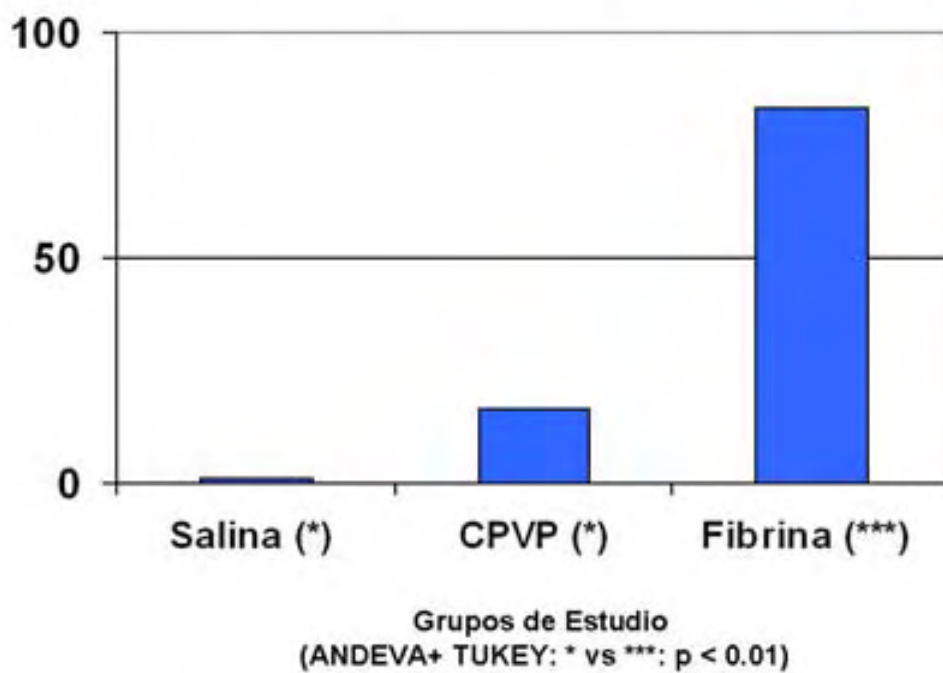
Gráfica 5. Grado de fibrosis microscópica perineural observada al final del estudio.

Disposición microscópica de las fibras de coágena en la anastomosis del NLR al final del estudio.



Gráfica 6. Se observa el grado de disposición de las fibras de colágena en cada grupo de estudio a las 6 semanas después de realizar la neurorrafía del NLR.

Porcentaje de reacción colorida positiva al final del estudio



Gráfica 7. Se observa la conducción neuronal mediante el porcentaje de reacción colorida positiva al final del estudio.

XI. CUADROS.

Cuantificación de adherencias			
Grado	Grupo		
	Grupo I SSF	Grupo II CPVP	Grupo III PF
0 Sin adherencias	0	0	0
1 Minimas fácilmente despegables	0	5*	0
2 Completa despegable	4	1	3
3 Completa firme de difícil despegamiento	2	0	3

* $p < 0.01$ ANDEVA, Tukey

Cuadro 1. Muestra el grado de adherencias formada por grupo de estudio, a las 6 semanas postcirugía.

Reacción colorida (Peroxidasa con Aminoetilcarbazon) por grupo de estudio .			
Grupo de Estudio	(n)	Conducción Positiva (n / %)	Conducción Negativa (n / %)
I (Tx Salina)	6	(0 / 0)	(6 / 100)
II (Tx CPVP)	6	(1 / 16.66)	(5 / 83.34)
III (Tx Fibrina)	6	(5 / 83.34)	(1 / 16.66)

ANDEVA + Tukey (p): Gpo I vs Gpo II: (ns), Gpos I y II vs Gpo III: (p < 0.01).

Cuadro 2: Número y porcentaje de nervios laringorecurrentes con conducción positiva y con conducción negativa detectadas mediante una reacción colorida (Peroxidasa con Aminoetilcarbazon) por grupo de estudio. ANDEVA + Tukey (p): Gpo I vs Gpo II: (ns), Gpos I y II vs Gpo III: (p < 0.01).

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Goldfarb, D., Keane W.M. and Lowry L.D. Laryngeal pacing as a treatment for vocal fold paralysis. *Journal of Voice*. 1994; 8: 179-185.
- 2.- Parnell F.W., Brandenburg J.H. Vocal cord paralysis: A review of 100 cases. *Laryngoscope*. 1982; 92: 31-39.
- 3.- Hydman J, Remahl S, Björck G, Svensson M, Mattsson P. Nimodipine improves reinnervation and neuromuscular function after injury to the recurrent laryngeal nerve in the rat. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*. 2007; 116: 623-630.
- 4.- Crumley RL. Laryngeal synkinesis revisited. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:365-371.
- 5.- Kanemaru SI, Nakamura T, Omori K, Kohma H, Magruffov A, et al. Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003; 112: 492-498.
- 6.- Guntinas O, Streppel M, Angelov DN, Stenert E, Neiss W, Effect of delayed fascial-nerve suture on fascial nerve regeneration. A horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Act Otolaryngol (Stockh)*. 1997; 117: 670-674.
- 7.- Nahm I, Shin T, Watanabe H, Macyama T. Misdirected regeneration of injured recurrent laryngeal nerve in the cat. *Am J Otolaryngol*. 1993; 14:43-48.
- 8.- Dedo H. Electromyographic and visual evaluation of recurrent laryngeal nerve anastomosis in dogs. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*. 1971; 80: 664-668.
- 9.- Horner PJ, and Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*. 2000; 407: 963-970.

- 10.- Brecknell JE, Fawcett JW. Axonal regeneration. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1996; 71: 227-255.
- 11.- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996; 25: 101-121
- 12.- Dent MA. Daño y reparación del sistema nervioso. *Ciencia ergo sum.* 2003; 10: 68-79.
- 13.- Lu FL., Casiano R.R. Lundy D.S. and Xue J.W. Longitudinal Evaluation Of Vocal Function After Thyroplasty Type I In The treatment Of Unilateral Vocal Paralysis. *Laryngoscope.* 1996; 106: 573-577.)
- 14.- Koufmann JA and Isaacson G. Laryngoplastic phonosurgery. *Otolaryngol Clin North Am.* 1991; 24: 1151-1177.)
- 15.- Koufman JA. Laryngoplasty for vocal cord medialization: an alternative to Teflon. *Laryngoscope* 1986; 96:726-731.)
- 16.- Isshiki N, Morita H, Okamura H, Hiramoto M, Thyroplasty as a new phonosurgical technique. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1974; 78:451-457.)
- 17.- Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimisu Y, Endo K. Nerve regeneration across a 25 mm gap bridge by polyglycolic acid-collagen tube: A histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 2000; 868: 315-328.
- 18.- Hazari A, Wiberg M, Johansson G, Green C, Terenghi G. Resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *Br J Plast Surg.* 1999; 52: 653-657.
- 19.- Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E. Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: A tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a one centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105:660-666.

20.- Chimal J, Bravo T, Krotz F and Díaz L. Implantes de fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. Rev. Biomed 1997; 8: 81-88.

21.- Olmos-Zúñiga JR, Hernández-Jiménez C, Díaz-Martínez E, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Villalba-Caloca J, Baltazares-Lipp M, Santillán-Doherty P, Santibáñez-Salgado JA. Wound Healing Modulators In A Tracheoplasty Canine Model. Journal Of Investigative Surgery; 2007; 20: 333-338.

22.- Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen/polinyllpirrolidone in hypertrophic scars J. Invest Dermatol. 1998; 111: 828-834.

23.- Gundry SR, Black KS, and Izutani H. Sutureless coronary artery bypass with biologic glued anastomoses:Preliminary *in vivo* and *in vitro* results. J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 120:473-7.

24.- Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, Padilla MA, Sabelman EE, Pham HN. Artificial Nerve Graft Using Collagen As An Experimental Extracelular Matrix For Nerve Repair Compared Whit Sutured Autograft In A rat Model. Ann Plast Surg. 1990; 25: 375-387.

25.- Olmos-Zuñiga JR, Santos-Cordero A, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Mora-Fol R, Franco-Oropeza A y Santillan-Doherty P. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. Acta Otorrinolaringológica Española. 2004; 55: 81-8.

26.- Loyola-Garcia U. Respuesta Terapéutica A La Colágeno-Polivinil Pirrolidona En Un Modelo Experimental De Estenosis Traqueal Canino. Tesis Especialidad de Cirugía Torácica. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2001.

27.- Mella Romero MC. Reparación nerviosa con la utilización de colágena tipo I y polivinilpirrolidona (Fibroquel). Tesis de Especialidad de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 1996.

28.- Caballero Chacón S, Nieto Sampedro M. Tratamiento de lesiones medulares por transección completa con la matriz biocompatible: Tissucol. Memorias del XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 2005; C255-182.

29.- Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación 6 dic, 1999.

30.- National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.

31.- Academy of Surgical Research. Course of Animal Anesthesia and Models. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.

32.- Olmos Zuñiga JR, Jasso Victoria R, Sotres Vega A, Gaxiola Gaxiola M, Cedillo Ley I, Argote Green M, Santillan Doherty P. Suture line reinforcement with glutaraldehyde preserved bovine pericardium for non-anatomic of lung tissue resection. Journal of Investigative Surgery. 2001; 14 (3): 161–168.

33.- Santillan P, Jasso R, Sotres A, Olmos R et al. Thoraco-abdominal wall repair with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. J Invest Surg. 1996; 9:45-55.

- 34.- Paniello RC. Laryngeal reinnervation. *Otolaryngol Clin N Am.* 2004; 37:161-181.
- 35.- Tucker HM, Harvey J, Ogura JH. Vocal cord remobilization in the canine larynx. *Arch Otolaryngol.* 1970; 92: 530-533.
- 36.- Seddon HJ. *Surgical disorders of peripheral nerves.* Ed 2. Baltimore, Williams and Wilkins. 1972; 72-77.)
- 37.- Fields RD, le Beau JM, Longo FM, Elisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989; 33: 87.
- 38.- Woodson GE. Spontaneous laryngeal reinnervation after recurrent laryngeal or vagus nerve injury. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007; 116: 57-65.
- 39.- Gacek R. Morphologic correlates for laryngeal reinnervation. *Laryngoscope;* 2001; 111: 1871-1877.
- 40.- Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery.* 2005; 23: 37-42.
- 41.- Santillán Artolózaga Alberto. Efecto de diferentes moduladores cicatrizales en la traqueoplastia. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2006.
- 42.- Meek, M.F US Food and Drug Administration/Conformit Europe-Approved Absorbable Nerve Conduits for Clinical Repair of Peripheral and Cranial Nerves, *Annals of Plastic Surgery* 2008; 60:110-116.