



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN  
ANIMAL**

**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE TISSUCOL® Y  
PRECURSORES NEURALES SOBRE LA REPARACIÓN DEL  
NERVIO CIÁTICO TRANSECTADO DE RATA ADULTA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**LUIS ANTONIO ARMIJO GONZÁLEZ**

**TUTORA:**

**DRA. SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. ALFREDO CORTÉS ARCOS  
DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN**

**MÉXICO, D. F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón: por apoyarme en todo momento, por proporcionarme todo lo que he necesitado, por toda su ayuda y confianza que me da.

A la Dra. Graciela Gudiño Cabrera, a la Dra. Nidia Jannette Carrillo González, a la Dra. Marcela Rodríguez Baeza y a la Biol. Gabriela Escobar Camberos del CUCBA de la U. de G., quienes con su muy valiosa ayuda, paciencia y sobre todo su amistad, hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Hist. Verónica Rodríguez Mata y al Laboratorio de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina de la UNAM: por su dedicación, entusiasmo y deseos de ayudar.

Al Dr. Armando Zepeda Rodríguez, al Dr. Francisco Pasos, a la Dra. Patricia Bizarro y a la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la UNAM, porque su excelente manera de trabajar, optimismo y ganas de ayudar permitieron que este trabajo llegara a buen término.

Al Dr. José Luis Arreola Ramírez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), porque gracias a su ayuda completamente desinteresada, este trabajo pudo salir del estancamiento en el que se encontraba. Además de que su amistad, y sobre todo sus consejos, me permitieron conocer otros aspectos desconocidos de la vida profesional.

A la Dra. Patricia Segura Medina del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alberto Pizaña Venegas, al bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y a su personal (MVZ César Hernández y MVZ Pedro Urquijo): muchas gracias por proporcionarme los animales que se utilizaron en este trabajo y por ayudarme a mantenerlos en las mejores condiciones posibles.

Al Dr. Raúl Olmos y al Dr. Rogelio Jasso: porque su apoyo invaluable permitió finalizar de muy buena manera este trabajo. También al Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola: porque el tiempo que se tomó para ayudarme fue fundamental para poder entender lo que estaba observando.

Al Ing. José Luis Pablos Hasch, por todas las veces que nos reunimos para poder sacar adelante este trabajo, pero sobre todo por la paciencia que me tuvo.

A la Dra. Sandra Orozco, a la M. en C. Vinnitsa Buzoianu Anguiano, a la Hist. María del Carmen Baltazar y a la Unidad para la Investigación en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por ayudarme y guiarme en todo momento y hacerme sentir parte del laboratorio.

Al Dr. Moisés Valderrama Saborío, por su apoyo, consejos y amistad incondicional.

A Antonio Roldán Roldán, Carlos Castañeda Ayala, Daniel Guevara Gutiérrez, Roberto Ortíz Mercadillo y Karla Rodríguez Hernández. Muchas gracias por su amistad y por dejarme ser parte de todos esos momentos memorables que pasamos juntos y que me ayudaron a ser una mejor persona.

A Luis Miguel Chávez Vázquez, por compartir su experiencia conmigo y por tratar de enderezar mi camino.

Al futuro MVZ César Othón del Molino Sotelo por ayudarme en este trabajo cada vez que lo necesité, y a la Sra. Hilda Sotelo Olvera, por apoyarnos cada vez que terminamos muy tarde de trabajar.

A Yun, por aparecer y seguir aquí.

*Labor omnia vincit*

## RESUMEN

ARMIJO GONZÁLEZ LUIS ANTONIO. Efecto de la aplicación de Tissucol® y precursores neurales sobre la reparación del nervio ciático transectado de rata adulta. (Bajo la dirección de: Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón).

El sistema nervioso periférico, cuando está lesionado, puede repararse por sí solo debido a que las células de Schwann que lo acompañan producen factores de crecimiento que favorecen la regeneración axonal. Sin embargo, algunas lesiones como la sección completa, pueden provocar una reparación defectuosa y un desempeño motor y sensitivo inadecuado. Para propiciar una recuperación de los nervios periféricos completa, se han utilizado varias técnicas de reparación tales como la neurorrafia y las matrices biocompatibles, con el fin de formar puentes entre los segmentos del nervio y favorecer el crecimiento axonal. Otra alternativa es la utilización de trasplantes celulares como la glía envolvente o aldainoglía, la cual es capaz de favorecer la remielinización y el crecimiento neurítico ya que posee funciones muy similares a las células de Schwann. El objetivo de este trabajo fue conjuntar a los precursores neurales diferenciados a aldainoglía y al Tissucol e investigar sus efectos en un modelo murino sobre la reparación del nervio ciático transectado para propiciar una regeneración axonal óptima. De los diferentes grupos de experimentación, la combinación de los precursores neurales diferenciados a aldainoglía incorporados al Tissucol, fue la que ofreció mejores resultados a nivel histológico en cuanto a la alineación de las fibras nerviosas, remielinización y funcionalmente favoreció la recuperación de la sensibilidad; en los otros grupos experimentales la aplicación de solamente Tissucol provocó una fibrosis muy extensa y en el grupo que no recibió tratamiento no se presentó una regeneración adecuada. Esto significa que la combinación de varias técnicas de reparación resulta ser más eficaz que la utilización de una técnica aislada o no aplicar ningún tratamiento. Debido a que actualmente no existe técnica de reparación alguna que ofrezca una recuperación de las funciones sensitivas y motoras normales, es necesario seguir buscando alternativas que ofrezcan una buena recuperación de la función nerviosa.

Palabras clave: Precursores neurales, glía envolvente, aldainoglía, regeneración de nervio periférico.

## SUMMARY

ARMIJO GONZÁLEZ LUIS ANTONIO. Effects of Tissucol<sup>®</sup> and neural precursors in the repair of transected sciatic nerve of adult rat. (Led by: Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón).

The peripheral nervous system can repair itself, when injured, because Schwann cells produce growth factors that promote axonal regeneration. However, when injuries cross-section the entire nerve, a defective repair occurs leading to an inappropriate sensory and motor performance. To promote a complete recovery of peripheral nerves, several techniques have been used to repair, such as neurorrhaphy and the use of biocompatible matrixes to form bridges between the nerve stumps to promote axonal growth. Another alternative is the use of cellular transplants as ensheathing cells or aldynoglia, which are capable of promoting remyelination and neurite outgrowth through Schwann cells-like macroglia. The aim of this study was to assess the effects of the combined actions of neural precursors and Tissucol<sup>®</sup> in a murine model of transected sciatic nerve repair on promoting optimal axonal regeneration. The combination offered best results at the histological level as far as alignment of the nerve fibers is concerned. Also remyelination and restoration of sensitivity were superior as compared with other experimental groups. Tissucol<sup>®</sup> alone caused very extensive fibrosis only, and the untreated group did not show adequate regeneration. These results may indicate that the combination of several techniques applied to repair severed peripheral nerves, is more effective than the use of an isolated technique or not to apply treatment at all. Although currently there is no a repair technique that provides a recovery of motor and sensory functions recovery, it is here advanced that the combinations described be assessed in further experimental settings necessary as alternatives to achieve a good recovery of nerve function.

Keywords: Neural precursors, ensheathing cells, aldynoglia, peripheral nerve regeneration.

## Abreviaturas.

BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> ).
BMP:	Proteína básica de la mielina ( <i>Basic Myelin Protein</i> ).
CNTF:	Factor neurotrófico ciliar ( <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> ).
CS:	Células de Schwann.
DMEM:	Modificación por Dulbecco del medio de cultivo Eagle ( <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> ).
DN:	Dolor neuropático.
DW:	Degeneración Walleriana.
EGF:	Factor de crecimiento epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> ).
FGFb-2:	Factor de crecimiento fibroblástico básico tipo 2 ( <i>Fibroblastic Growth Factor basic</i> ).
GGF:	Factor de crecimiento glial ( <i>Glial Growth Factor</i> ).
HBSS:	Solución de Hanks.
IF:	Inmunofluorescencia
IGF-1:	Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 ( <i>Insulin-like Growth Factor 1</i> ).
IL-1 $\alpha$ :	Interleucina-1 $\alpha$ .
IL-1 $\beta$ :	Interleucina-1 $\beta$ .
IL-6:	Interleucina 6.
IL-10:	Interleucina 10.
LIF:	Factor inhibidor de leucemia ( <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> ).
MAG:	Glucoproteína asociada a la mielina ( <i>Myelin Associated Glycoprotein</i> ).
MET:	Microscopía electrónica de transmisión.
MPD:	Miembro pélvico derecho.
MPI:	Miembro pélvico izquierdo.
MQ:	Macrófago.
N-CAM:	Molécula de adhesión de células neurales ( <i>Neural-Cell Adhesion molecule</i> ).
Nest:	Nestina.
Neur:	Neurofilamento.

NGF:	Factor de crecimiento nervioso ( <i>Nerve Growth Factor</i> ).
NP:	Nervio periférico
P <sub>0</sub> :	Proteína 0.
PBS:	Buffer de fosfatos.
PLL:	Poli-L-lisina.
PN:	Precursores neurales multipotenciales.
PNA:	Precursores neurales diferenciados al fenotipo aldainoglia.
rpm:	revoluciones por minuto.
S-100:	Proteína de unión a calcio S-100.
SNC:	Sistema nervioso central.
SNP:	Sistema nervioso periférico.
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante-β ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> ).
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral α ( <i>Tumoral Necrosis Factor alpha</i> ).
YP:	Yoduro de propidio.

# CONTENIDO

Resumen. . . . .	I
Abreviaturas. . . . .	III
1. Introducción. . . . .	1
1.1 Anatomía del nervio periférico. . . . .	1
1.2 Lesiones en el nervio periférico. . . . .	4
1.3 Regeneración en el nervio periférico. . . . .	7
1.4 Alternativas de reparación. . . . .	9
1.4.1 Neurorrafia epineural. . . . .	10
1.4.2 Fibrin glue o Tissucol®. . . . .	11
1.4.3 Precursores neurales. . . . .	13
1.4.3.1 Glía envolvente o aldainoglía. . . . .	14
1.4.4 Otras alternativas. . . . .	15
2. Justificación. . . . .	16
3. Hipótesis. . . . .	17
4. Objetivo general. . . . .	17
4.1 Objetivos específicos. . . . .	17
5. Materiales y Métodos. . . . .	18
5.1 Diseño experimental y animales. . . . .	18
5.2 Preparación del Tissucol®. . . . .	19
5.3 Glía envolvente (fenotipo aldainoglía). . . . .	20
5.3.1 Medio basal de cultivo celular. . . . .	21
5.3.2 Medio condicionado de cultivo de glía envolvente. . . . .	21
5.3.3 PN diferenciados a aldainoglía. . . . .	22
5.3.4 Criopreservación de células. . . . .	24
5.3.4 Descongelación de células. . . . .	24
5.4 Procedimiento quirúrgico. . . . .	24
5.5 Morfología. . . . .	26
5.5.1 Evaluación macroscópica. . . . .	26
5.5.2 Evaluación microscópica. . . . .	26
5.5.2.1 Tinción Tricrómica de Masson. . . . .	27
5.5.2.2 Tinción de Hematoxilina y Eosina. . . . .	29
5.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET). . . . .	30
5.5.4 Inmunofluorescencia (IF). . . . .	31
5.6 Aestesiómetro. . . . .	32
5.6.1 Mediciones pre-tratamiento. . . . .	33
5.6.2 Mediciones post-tratamiento. . . . .	33
5.7 Calificación BBB. . . . .	34
6. Análisis estadístico. . . . .	35
6.1 Aestesiómetro. . . . .	35
6.2 Morfología y calificación. . . . .	35

7. Resultados. . . . .	36
7.1 PN diferenciados a aldainoglia. . . . .	36
7.1.1 Descongelado de las células y conteo celular. . . . .	36
7.1.2 Precursores neurales diferenciados a aldainoglia. . . . .	37
7.2. Procedimiento quirúrgico. . . . .	38
7.3 Hallazgos macroscópicos. . . . .	41
7.3.1 Formación de adherencias. . . . .	41
7.3.2 Reparación de la transección. . . . .	42
7.4 Microscopía óptica. . . . .	45
7.4.1 Nervio sano (control). . . . .	45
7.4.2 Tratamientos. . . . .	46
7.4.2.1 Inflamación perineural. . . . .	46
7.4.2.2 Grado de lesión: Segmento proximal. . . . .	46
7.4.2.3 Fibrosis y colágena: Segmento proximal. . . . .	47
7.4.2.4 Grado de lesión: Zona de la transección. . . . .	49
7.4.2.5 Fibrosis y colágena: Zona de la transección. . . . .	49
7.4.2.6 Grado de lesión: Segmento distal. . . . .	51
7.4.2.7 Fibrosis y colágena: Segmento distal. . . . .	52
7.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET). . . . .	53
7.6 Inmunofluorescencia (IF). . . . .	57
7.7 Aestesiómetro. . . . .	60
7.8 Calificación BBB. . . . .	65
8. Discusión. . . . .	67
8.1 Inflamación perineural. . . . .	68
8.2 Microscopía óptica, MET e IF. . . . .	69
8.2.1 Grupo TESTIGO. . . . .	70
8.2.2 Grupo TISSUCOL. . . . .	70
8.2.3 Grupo TRANSPLANTE. . . . .	72
8.3 Aestesiómetro. . . . .	75
8.4 Calificación BBB. . . . .	79
9. Conclusiones. . . . .	81
10. Bibliografía. . . . .	82

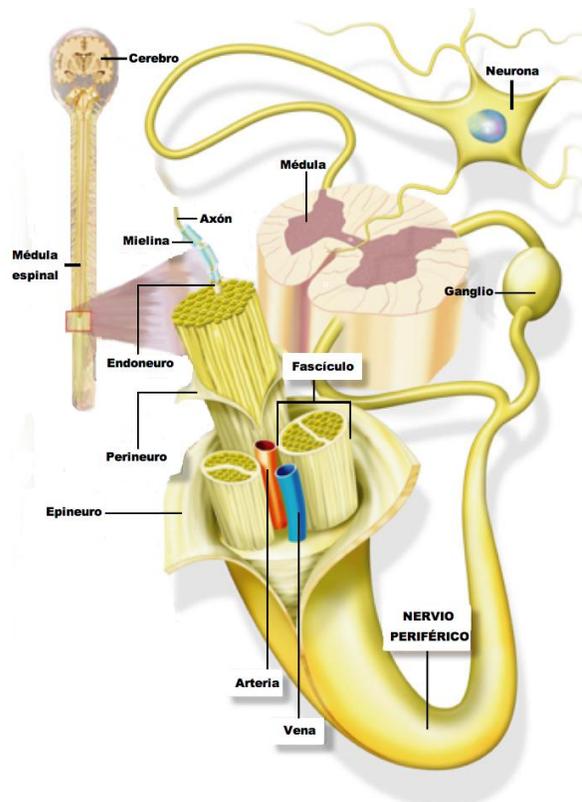
## 1. Introducción

El Sistema Nervioso, en coordinación con el sistema endócrino, controlan el funcionamiento de los órganos del cuerpo (Tartaglia & Waugh, 2005). Para ello, el Sistema Nervioso Periférico (SNP) sirve como un puente entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el resto de los órganos, conectándolos entre sí para mandar señales nerviosas del SNC hacia los órganos y viceversa. El SNP está conformado por nervios y ganglios que se encuentran fuera del SNC (cerebro y de la médula espinal), y a diferencia de este último, el SNP no está protegido por hueso sino que cuenta con algunas barreras defensivas como capas de tejido conectivo que los protegen del daño. A pesar de esto, por su disposición anatómica el SNP está expuesto al daño producido por diversas toxinas o por traumatismos (Newman, 1995). En condiciones de daño el SNP tiene posibilidad de repararse, pero aún así existen serios problemas relacionados precisamente con ese potencial de reparación debido a que se puede presentar una regeneración aberrante, producir neuromas o generar alodinia, por lo que las diversas estrategias que han sido utilizadas para su reparación buscan evitar esto.

### *1.1 Anatomía del nervio periférico*

Las primeras descripciones sobre la anatomía de los nervios periféricos fueron hechas por el médico griego Herophilo alrededor del año 300 A.C. Paul de Aegina fue el primero en describir la reparación de nervios. En el año 900 D.C. Rhazes hizo la primera descripción clara sobre la manera adecuada de cómo reparar un nervio. En 1873 Carl Hueter introdujo el término de sutura epineural, y a principios de los años 1900 Santiago Ramón y Cajal describió cómo los axones periféricos son capaces de regenerar y cómo son guiados por sustancias quimioatrayentes. En 1945 Sydney Sunderland promovió la utilización de técnicas quirúrgicas para la reparación de nervios periféricos lesionados.

Una neurona está constituida por un cuerpo celular o soma que se encuentra ya sea en el encéfalo, en la médula espinal o en los ganglios periféricos, del que emanan un axón y varias ramas fibrosas llamadas dendritas. Por lo tanto los axones o fibras nerviosas son en realidad extensiones protoplasmáticas de estos cuerpos neuronales. Desde el punto de vista funcional, los nervios que transmiten impulsos hacia el SNC se denominan nervios aferentes o sensitivos, en tanto que los nervios que transmiten señales del SNC hacia los órganos efectores se denominan nervios eferentes o motores (Jensen, 1979).

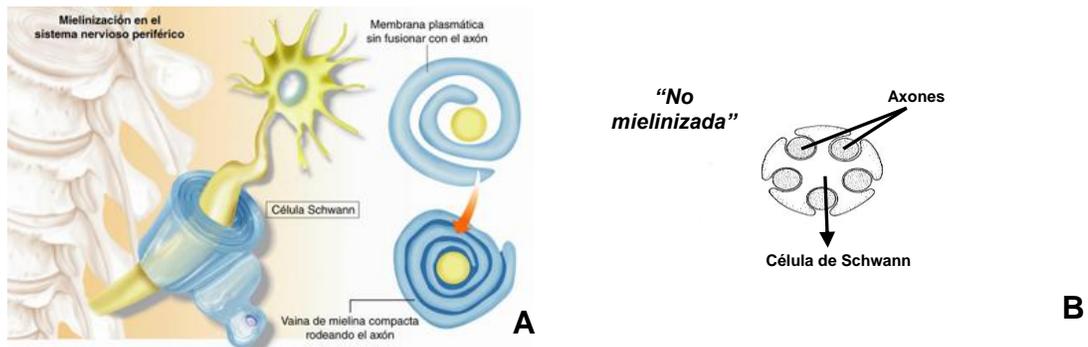


**Figura 1. Organización funcional y principales características de un nervio periférico.**

*Adaptado del Miniatlas de Psiquiatría, AstraZeneca, XL Sistemas*

Las axones de los nervios periféricos pueden ser mielinizadas o no mielinizadas (figuras 1 y 2), y en ambos casos los axones están rodeados por células gliales denominadas células de Schwann (CS). En los nervios mielinizados, un axón está asociado con solo una CS, la cual lo rodea con su membrana plasmática en forma de espiral para así formar la vaina de mielina (Lundborg, 2004). Esta vaina de

mielina está interrumpida a intervalos regulares a lo largo del axón, y a estas zonas que marcan los puntos donde las CS son discontinuas se les conoce como nodos de Ranvier. Por otra parte, en los nervios no mielinizados una CS se encarga de rodear a varias fibras nerviosas, por lo que la vaina de mielina no se forma en esta clase de nervios (Lundborg, 2004). Otra función muy importante de las CS es la de aumentar la velocidad de conducción, así como proteger y promover los procesos regenerativos en caso de existir algún daño.



**Figura 2. Función de la célula de Schwann en el aislamiento de las fibras nerviosas.**

En las fibras mielínicas (A) una sola célula de Schwann envuelve a un solo axón en capas concéntricas de mielina, mientras que en las fibras amielínicas (B) una célula de Schwann envuelve a varios axones.

*Adaptado del MiniAtlas de Psiquiatría, AstraZeneca, XL Sistemas*

Las fibras nerviosas se encuentran contenidas en fascículos dentro del epineuro (figura 3), que es la capa de tejido conectivo más externa que los rodea en un solo haz y su principal función es protegerlos contra golpes y sobreestiramientos, evitando lesiones durante el movimiento (Lundborg, 1987). Cada fascículo se encuentra rodeado por el perineuro, el cual los protege y funciona como una barrera de difusión para ciertas sustancias (Lundborg, 2004). Intrafascicularmente, las fibras nerviosas se encuentran rodeadas por el endoneuro que es la capa más interna, la cual es una matriz laxa de colágeno que contiene una red capilar bastante extensa que evita que ciertas sustancias que circulan por la sangre tengan contacto con las fibras nerviosas y las dañen. La principal función del endoneuro es ofrecer una protección a los axones contra golpes y dar soporte a los tubos endoneurales (Lundborg, 1987; Lee & Wolf, 2000).

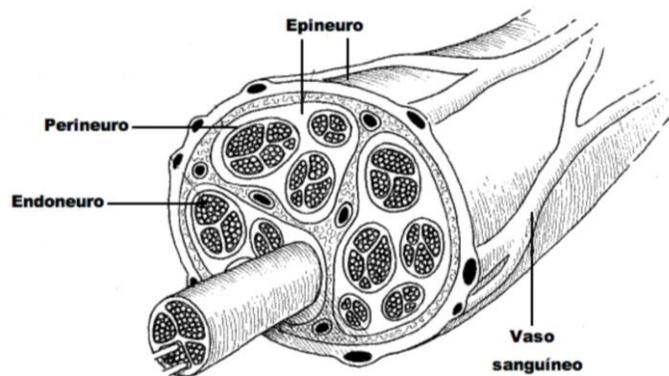


Figura 3. Microanatomía de un nervio periférico.

### 1.2 Lesiones en el nervio periférico

Las lesiones en el nervio periférico (NP) siguen representando uno de los retos quirúrgicos más importantes, ya que durante su proceso de reparación, no solamente intervienen eventos a nivel local, sino que también pueden verse afectados otros órganos como el músculo estriado esquelético (Lundborg, 2002).

Esta clase de lesiones pueden ser causadas por fracturas, traumatismos, durante alguna cirugía, por isquemia (Campbell, 2008; Glass *et al*, 2002), por iatrogenias, por toxinas exógenas, por químicos, por calor (Waldram, 2003) o incluso por alteraciones de origen metabólico como la *diabetes mellitus* (Abdin *et al*, 2006). Muchos de estos problemas pueden dar lugar a la compresión o sección de algún nervio periférico, lo que podría impedir que este tenga un desempeño motor y sensitivo adecuado e incluso inducir dolor neuropático (DN) o alodinia (Merskey, 1982; Navarro *et al*, 2007).

Cuando un nervio es lesionado por transección<sup>\*</sup>, en el segmento distal se inicia un proceso denominado degeneración Walleriana (DW) (Waller, 1850; Stoll *et al*, 2002) (figura 4). La DW consiste en una serie de alteraciones celulares y

---

\* *neurotmesis o axonotmesis en la clasificación de Seddon (1942), grado 2-5 de la clasificación de Sunderland (1978), lesión degenerativa en la clasificación de Giddins & Birch (2002).*

moleculares que suceden en el sitio de la lesión, tales como la activación de CS, atracción de macrófagos (MQ) al sitio de la lesión y un incremento en la síntesis de neurotrofinas y citocinas (Dubový, 2011). La DW comienza con la desintegración y degeneración del axoplasma y axolema (Stoll *et al*, 1989), fragmentación del retículo endoplásmico y disolución de neurofilamentos y microtúbulos (componentes del citoesqueleto) ocasionadas por la entrada de iones de calcio en el sitio de la lesión que activan a proteasas axonales (fosfolipasas y calpainas) (Schlaepfer *et al*, 1985; Glass *et al*, 2002; Campbell, 2008), todo esto dentro de las primeras 24-48 horas posteriores a la lesión (George *et al*, 1995; Gillingwater & Ribchester, 2001; Gaudet *et al*, 2011). La rapidez con que se presente la degeneración depende de las características intrínsecas de los axones, mismas que aún no han sido dilucidadas totalmente (Perry *et al*, 1990; Glass *et al*, 1993). Posteriormente los restos de mielina de los nervios dañados son degradados por CS (evento dependiente de fosfolipasa A<sub>2</sub>) causando que la vaina de mielina se retraiga y que se formen gotas de mielina (Stoll, 1989; Gillingwater & Ribchester, 2001). Después, MQ provenientes del torrente sanguíneo son atraídos por las citocinas liberadas por las CS (factor de necrosis tumoral  $\alpha$  [NTF- $\alpha$ ] e interleucina-1 $\alpha$  [IL-1 $\alpha$ ]) y fagocitan los restos de la mielina degradada para así eliminarla por completo del sitio de la lesión (Tanaka *et al*, 1992). También arriban al sitio de la lesión linfocitos T y neutrófilos en las primeras 48 horas. Algunos MQ, además de fagocitar los restos de mielina, secretan IL-1 $\alpha$  la cual regula la síntesis del factor de crecimiento nervioso (NGF) por parte de las CS (Lindholm *et al*, 1987).

El hecho de que los restos de mielina sean retirados con rapidez favorece la formación de un microambiente que sea capaz de estimular el crecimiento y regeneración axonal (Webber & Zochodne, 2010), ya que la mielina contiene inhibidores del crecimiento neuronal tales como la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) (Qiu *et al*, 2000; Lundborg, 2004) la cual impide que los axones puedan crecer adecuadamente.

Conforme la degradación axonal continúa en el segmento distal, la cantidad de CS aumenta ya que estas comienzan a des-diferenciarse, se unen una con otra y de esta manera forman las bandas de Büngner, mismas que funcionan como una guía para que las fibras nerviosas del segmento proximal puedan unirse con el sitio desnervado (Stoll *et al*, 1989; Stoll & Müller, 1999; Liu *et al*, 1995). Al involucionar, las CS pasan de un estado mielinizante a otro estado más inmaduro no mielinizante que favorece el crecimiento axonal (Ide, 1996). Este cambio se encuentra asociado con la disminución de la síntesis de genes asociados con la producción de proteínas inhibitoras de la mielina (MAG) y con el aumento en la síntesis de genes asociados con la regeneración (neurotrofinas y moléculas de adhesión) (Leblanc & Poduslo, 1990). Además, cuando las CS se encuentran en este estado inmaduro, tienen una gran cantidad de matriz extracelular y son la fuente principal de factores neurotróficos, tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento glial (GGF), moléculas de adhesión (laminina, colágena tipo IV, molécula de adhesión de células neurales [N-CAM], factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) (Ard *et al*, 1987; Acheson *et al*, 1991; Heumann *et al*, 1987; Nieke & Schachner, 1985; Kurek *et al*, 1996; Manthorpe *et al*, 1986; Rutkowski *et al*, 1999; Fenrich & Gordon, 2004) que estimulan y guían la regeneración axonal (Gordon, 2009; Dubový, 2011).

En cuanto a los cambios que se presentan en el soma neuronal (figura 4), estos pueden depender de la edad del individuo, de la especie animal, de la proximidad de la lesión, del tamaño de la célula y del tipo de la lesión, aunque a veces estos cambios no son tan marcados (Hall, 2005). En esta estructura comienza a generarse una cromatolisis, la cual consiste en una dispersión e incremento de los cuerpos de Nissl (retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas), que permite al citoesqueleto reordenarse y acumular fibras intermedias en el citoplasma

desplazando al núcleo hacia la periferia (Gillingwater & Ribchester, 2001). La desorganización de los ribosomas está relacionada con el aumento de la síntesis de proteínas, lo cual indica que la cromatolisis está asociada con la respuesta anabólica que da inicio con la regeneración axonal (Fu & Gordon, 1997). Estos cambios modifican la síntesis de proteínas por parte del soma, ya que de estar en un estado de mantenimiento, pasa a un estado de regeneración (Lundborg, 2004). La reacción que pueda tener lugar en el soma neuronal está determinada por la proximidad de la lesión, ya que entre más cercana se encuentre esta del soma, la neurona tiende a morir con mayor facilidad (Lunborg, 1987; Ygge, 1989) (figura 4).

### 1.3 Regeneración en el NP

La regeneración axonal es un proceso biológico único, ya que durante este proceso los axones no proliferan ni incrementan su número, tal y como sucede en otros tejidos. En lugar de esto, las neuronas buscan incrementar su volumen plasmático original y restablecer la morfología de cada una de ellas (Lundborg, 2004).

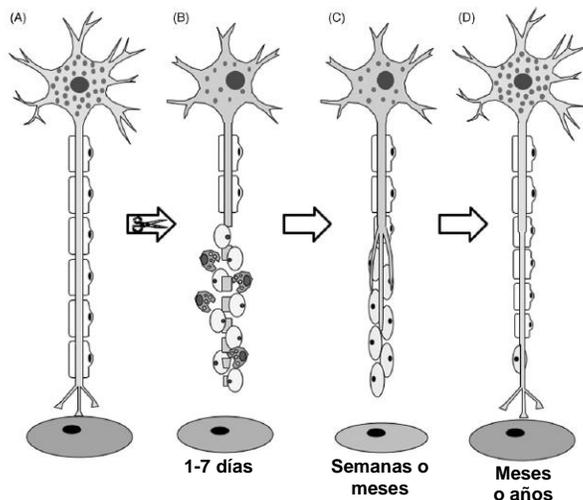


Figura 4. Degeneración y regeneración de un nervio periférico mielinizado. A) Fibra nerviosa normal manteniendo contacto sináptico con su órgano blanco. B) Transección de la fibra nerviosa, la cual provoca una fragmentación axonal y de la vaina de mielina distal al sitio de la lesión. Las CS y MQ empiezan a fagocitar los restos axonales y de mielina. En el soma neuronal da inicio la cromatolisis y hay una retracción dendrítica. C) Rebotes axonales provenientes del segmento proximal comienzan a crecer entre las CS que han formado las bandas de Büngner. D) Reconexión axonal con el órgano blanco y maduración de la fibra nerviosa y de las CS.

Adaptado de Navarro *et al*, 2007

Los rebotes axonales comienzan a crecer en el segmento proximal y su objetivo es atravesar la zona de la lesión para alcanzar al segmento distal. El material

necesario para que se pueda llevar a cabo el crecimiento axonal durante la regeneración (actina y tubulina), es proporcionado por el soma neuronal y es acarreado hasta el lugar donde se está llevando a cabo la regeneración a través del transporte axonal (McQuarrie & Lasek, 1989). Este material es movilizadado a lo largo del axón por unas moléculas transportadoras llamadas kinesinas, importinas y vimentinas (Lundborg, 2004; Galbraith & Gallant, 2000).

Para que una fibra nerviosa pueda sobrevivir es necesario que mantenga contacto con el soma neuronal (George *et al*, 1995). Un NP lesionado puede repararse endógenamente dadas sus características regenerativas asociadas a la activación de las CS y a la liberación de factores de crecimiento que permiten que los axones establezcan los contactos originales (Höke, 2006), aunque existen limitaciones en cuanto a la recuperación de su función que dependen del tipo de lesión sufrida y de la clase de nervio lesionado (Bruns *et al*, 2007), además de que la recuperación obtenida puede ser subóptima (Höke, 2006).

Existen otros factores que influyen de manera importante sobre la reparación de un nervio, la cual puede variar entre individuos en los que incluso las condiciones de la lesión y la técnica quirúrgica utilizada han sido idénticas. Por ejemplo, es bien sabido que la reparación de un nervio en individuos jóvenes tiene una mejor recuperación de la función en comparación con los adultos (Lundborg & Rosén, 2001). El tiempo en que tarde en ser reparado el nervio dañado es otro factor importante que puede afectar la regeneración nerviosa, ya que entre más rápido se realice disminuye considerablemente la posibilidad de que la célula nerviosa muera (Ma *et al*, 2003). Si se llega a retrasar demasiado la reparación de los dos segmentos estos comienzan a retraerse, el segmento distal comienza a sufrir una fibrosis (cicatrización), se presenta una degeneración progresiva del mismo y las CS mueren (Lundborg, 1987; Lundborg, 2004).

Si después de la lesión los segmentos del nervio seccionado quedan cerca uno del otro, la reparación axonal y la recuperación funcional podría ser más rápida. Por el contrario, si el segmento proximal queda alejado del distal la reparación se retrasaría, las prolongaciones de los axones regenerados podrían extenderse aleatoriamente y no alcanzarían sus terminaciones distales originales apropiadamente (Bruns *et al*, 2007; Lundborg, 2004).

La regeneración axonal puede fallar debido a la colagenización de los tubos endoneurales y a la fragmentación de la lámina basal de las CS, esto aunado a que los músculos desnervados pueden tener menor afinidad hacia los axones motores que les llegan debido a la pérdida de fibras musculares, disminución de células satélite y fibrosis muscular (Bain *et al*, 2001).

Cuando la lesión se vuelve crónica las CS mueren, la lámina basal se pierde y las bandas de Büngner y los túbulos de Schwann desaparecen (Vuorinen *et al*, 1995), evitando que la regeneración se pueda llevar a cabo.

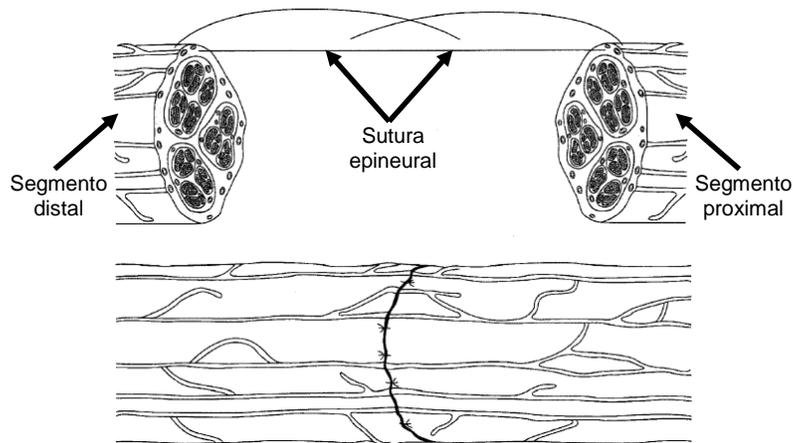
#### *1.4 Alternativas de reparación*

La pérdida de la orientación de los rebrotes axonales en el sitio de la lesión y la reinervación incorrecta, son los principales problemas a resolver en la regeneración axonal (Lundborg, 1987; Lundborg, 2004). En experimentos realizados en roedores (Wall *et al*, 1979b; Seltzer *et al*, 1989; Lee *et al*, 2000; Hamilton *et al*, 2011), se ha observado que estas complicaciones pueden ocasionar que fibras sensitivas se unan a fibras eferentes o que fibras eferentes regeneradas no inerven la placa motora adecuada, aumentando la probabilidad de que se generen señales aberrantes (Lundborg, 2004) y en el peor de los casos generar neuromas, DN y automutilación (Höke, 2006; Jubran & Widenfalk, 2003).

Por otro lado, cuando no existe una guía (tal y como sucede en el muñón distal al sitio de la lesión) los axones que están creciendo lo hacen de manera errónea y forman un neuroma, el cual está compuesto de rebrotes axonales inmaduros y tejido conectivo (Fried *et al*, 1991). Cuando algunos axones llegan a reinervar un órgano que no les corresponde estos se atrofian y degeneran (Navarro *et al*, 2007).

#### *1.4.1 Neurorrafia epineural*

El procedimiento más común para intentar reparar un nervio periférico es a través de la utilización de suturas o neurorrafia epineural (figura 5) (Saijilafu *et al*, 2008; Trumble & McCallister, 2000). Esta técnica es relativamente atraumática, fácil de realizar (Lundborg, 1987) y proporciona una buena regeneración axonal (Menovsky & Beek, 2001) pero tiene la desventaja de que, si el nervio es de calibre pequeño, se dificulta su manejo y algunas veces la sutura puede generar inflamación de la zona reparada por la tensión generada por la misma sutura, con lo que se podría complicar la regeneración axonal (Martins *et al*, 2005). Con la neurorrafia no se asegura que la alineación de las fibras nerviosas sea totalmente adecuada (Edshage, 1964), además de que el edema y la inflamación posteriores a la cirugía pueden provocar que las suturas (si están muy apretadas) estrangulen al nervio (Lundborg, 2004). Incluso se ha observado que después de una reparación inmediata de la lesión hay entre un 20% y un 50% de neuronas muertas en el ganglio de la raíz dorsal (Liss *et al*, 1996; Hall, 2005). A pesar de esto, si la reparación se realiza dentro de las primeras 24 horas posteriores a la lesión la muerte de neuronas sensitivas disminuye considerablemente (Lundborg, 2004), pero si la distancia entre ambos segmentos es muy grande (>5 mm) este método de reparación presenta resultados muy limitados en cuanto a la regeneración y recuperación funcional (Belkas *et al*, 2004).

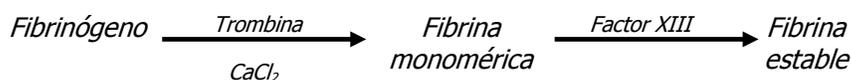


**Figura 5. Reparación de un nervio periférico mediante el uso de suturas epineurales.**  
Adaptado de Waldram, 2003

#### 1.4.2 Fibrin glue o Tissucol®

El propósito de todas las técnicas de reparación es restaurar la continuidad del nervio, limitar la fibrosis y la inflamación al asegurar un rápido afrontamiento de los segmentos del nervio (Bozorg *et al*, 2005), y para ello se ha utilizado la aplicación de matrices absorbibles como el cianocrilato (Landerger *et al*, 2007), metacrilato (Woerly *et al*, 2001) y quitosán (Hsu *et al*, 2007), con el fin de formar puentes entre los segmentos del nervio y favorecer el crecimiento axonal entre ellos. Sin embargo no se ha comprobado la funcionalidad nerviosa del nervio reparado (Bruns *et al*, 2006; Bozorg *et al*, 2005; Bruns *et al*, 2007; Petter *et al*, 2007; Tsai *et al*, 2006) y algunas de estas matrices son tóxicas (Júnior *et al*, 2004), pueden provocar necrosis del tejido (Jackson, 2001) y son inductoras de cáncer (Layden *et al*, 2007). Es por ello que se recurre a la utilización del pegamento “fibrin glue” o Tissucol® (Baxter, Austria), el cual es una matriz biocompatible que está constituida por dos componentes parecidos a la matriz extracelular más factores de la coagulación. Es un compuesto que no es citotóxico, es completamente reabsorbible y estimula las últimas etapas de la cascada de la coagulación, dando origen a la formación de un coágulo de fibrina muy similar al que se forma naturalmente.

El mecanismo de acción de Tissucol<sup>®</sup> corresponde a la última fase de la coagulación sanguínea (figura 6). La molécula de fibrinógeno humano es una glicoproteína compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas (Aa, Bb, g). El fibrinógeno, bajo la acción de la trombina, se transforma en fibrina (a, b, g) con liberación de dos moléculas de fibrinopéptido A y B. Los monómeros de fibrina formados se polimerizan en dímeros y posteriormente se unen entre sí mediante enlaces covalentes por acción del factor XIII, previamente activado por la trombina y en presencia de iones de calcio. La fibrina producida se adhiere a los tejidos expuestos posterior a la lesión tisular, con una afinidad especial hacia las fibras de colágena. La malla de fibrina formada sirve de soporte para la proliferación de fibroblastos y capilares que se forman en el proceso de cicatrización, y dicho proceso depende de varios factores entre los cuales la trombina, fibrina y el factor XIII estimulan la proliferación de fibroblastos (Le Guéhennec *et al*, 2004). La siguiente etapa del proceso de curación de heridas es la degradación por proteólisis y fagocitosis de la malla de fibrina. La fibrinolisis, entre otras cosas, depende de la presencia de los activadores tisulares del plasminógeno, cuya concentración puede variar de un tejido a otro. Así, la etapa final es la sustitución de la malla de fibrina por tejido conjuntivo y la posterior formación de un tejido de cicatrización. En el proceso de curación de la herida, se absorbe completamente el adhesivo de fibrina solidificado. La lisis prematura de la malla de fibrina es prevenida por la adición de un inhibidor de la fibrinolisis: la aprotinina.



**Figura 6. Esquema del proceso de formación de la malla de fibrina del Tissucol<sup>®</sup>.**

El Tissucol<sup>®</sup> puede ser mezclado con otras sustancias sin provocar alteraciones en cuanto a su composición (Thompson & Davis, 1997), y ha sido utilizado en modelos de lesión en médula espinal en donde favorece el crecimiento axonal y la remielinización (Caballero *et al*, 2007) y en modelos de lesión por transección de nervio ciático para evaluar diversos tratamientos que induzcan la reparación del

mismo (Jubran & Widenfalk, 2003; Martins *et al*, 2005; Lucchesi *et al*, 2007; Nichols *et al*, 2004; Kotulska *et al*, 2006; Menovsky & Beek, 2001; Suri *et al*, 2002; Petter *et al*, 2007).

#### 1.4.3 Precusores neurales

Una alternativa en los procesos de reparación axonal es el uso de los precusores neurales multipotenciales (PN), que son un subtipo de células progenitoras (inmaduras) del sistema nervioso que pueden dar origen a neuronas, así como a los diversos tipos de células gliales presentes en el sistema nervioso (Temple, 2001), y pueden mantener la capacidad de proliferar, migrar e integrarse al tejido neural (Widera *et al*, 2006). Estos PN pueden ser encontrados en diferentes zonas del cerebro adulto, tales como la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Alvarez *et al*, 2002). Por otro lado, la mucosa olfatoria también representa una fuente importante de PN (Murrel *et al*, 2008), los cuáles pueden migrar y proliferar hacia el sistema nervioso para reparar células dañadas, debido a su capacidad de poder diferenciarse en neuronas o células gliales (Aarum *et al*, 2003).

Los PN poseen varias diferencias en cuanto a su genotipo y fenotipo, las cuales dependen en gran medida de la etapa de desarrollo del individuo y de su localización dentro del cerebro (Alvarez *et al*, 2001). Estas células son capaces de modificar su expresión génica en respuesta a ciertas condiciones ambientales (Carrillo, 2006).

La variedad de células que los PN pueden producir depende de factores intrínsecos (programación genética) y extrínsecos (factores ambientales) (Fisher, 1997). En el caso de los PN, las neuronas y las células gliales proveen señales neurotróficas para que puedan sobrevivir y diferenciarse (Gomes *et al*, 1999).

Los PN *in vitro* forman complejos multicelulares flotantes denominados “neuroesferas” (Temple, 2001), y son capaces de responder en un inicio al factor de crecimiento fibroblástico básico-2 (FGFb-2), y este a su vez induce que respondan al factor de crecimiento epidermal (EGF). Ambos factores de crecimiento estimulan la división celular tanto de precursores neurales de origen embrionario como de adulto (Ciccolini & Svendsen, 1998). Por ello, las señales que reciben los PN son vitales para poderlos mantener, ya sea en estado indiferenciado o para dirigir su diferenciación. Por lo tanto, la presencia de factores de crecimiento, la concentración en la que se encuentren y su sinergia es la que establecerá cual será la respuesta por parte de los PN (Carrillo, 2006).

#### 1.4.3.1 Glía envolvente o aldainoglia

Recientemente se ha encontrado otra posible alternativa para la reparación de nervios periféricos lesionados: los precursores neurales diferenciados al fenotipo aldainoglia (PNA) (Rojas *et al* 2008; Doncel *et al*, 2009). La aldainoglia (del griego αλθαίνω [aldaino], hacer crecer), es una glía envolvente que está implicada en la regeneración axonal que ocurre espontáneamente en el adulto, como por ejemplo, en la renovación continua de las neuronas olfatorias y de los receptores sensoriales (Carrillo, 2006). Esta glía envolvente expresa varios marcadores inmunológicos, tales como la nestina (Nest) y la proteína S-100 (S-100) (Doncel *et al*, 2009; Gudiño & Nieto, 2000, Heizmann, 1999), y posee la ventaja de que no expresa los antígenos de transplante del complejo mayor de histocompatibilidad clases I y II (Doncel *et al*, 2009; Nieto & Doncel, 2011), por lo que el riesgo de rechazos por parte del receptor del transplante es mínimo.

Los PNA son capaces de favorecer el crecimiento neurítico y la remielinización ya que tienen la característica de ser una macroglía similar a las CS, con capacidad de promover la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico en el SNC (Gudiño & Nieto, 2000). Este efecto ha sido directamente relacionado con la

producción de varios factores de crecimiento tales como NGF, BDNF, GDNF y CNTF (Lipson *et al*, 2003). Doncel y colaboradores (2009) diferenciaron PN provenientes de embrión de rata de 14 días a aldainoglia parecida a glía de Schwann y probaron *in vitro* su interacción con neuronas del ganglio de la raíz dorsal. Por lo tanto es necesario hacer estudios donde se pruebe la función *in vivo* de los PNA, ya que dadas sus características es probable que estas células puedan tener un efecto positivo sobre la promoción de la regeneración axonal y la recuperación de la función motora y sensitiva de nervios periféricos.

#### *1.4.4 Otras alternativas*

Otros procedimientos utilizados para propiciar la regeneración axonal son la utilización de injertos nerviosos autólogos (Maeda *et al*, 1999), tubos de silicón (Lundborg, 1982) o de colágena (Krarup, 2002). En estos trabajos la regeneración axonal ha sido poco satisfactoria, ya que la tensión provocada por las suturas entre los segmentos del nervio reparado, la separación tan amplia entre los mismos o la compresión generada por parte de los tubos utilizados para reparar el nervio, evitan que se lleve a cabo este proceso regenerativo de manera adecuada.

## 2. Justificación

Desafortunadamente, a pesar de muchos años de investigación en la regeneración de los nervios periféricos, no se han presentado avances terapéuticos significativos en esta área de investigación (Höke, 2006) o los que se han ido generando tienen limitaciones o presentan resultados parciales (Pabari *et al*, 2011; Daly *et al*, 2012), por lo que los principales problemas que siguen siendo la formación de neuomas, la regeneración aberrante, la producción de alodinia y la pobre recuperación motriz por parte de los músculos afectados no han podido ser resueltos por completo.

Los métodos de reparación de lesiones en el nervio periférico combinados con el trasplante de glía envolvente, podrían facilitar los procesos regenerativos al aportar una fuente de factores neurotróficos para los axones dañados, ayudarlos a atravesar la zona de la lesión y contribuir con la remielinización (Dombrowski *et al*, 2006; Radtke *et al*, 2009), por lo que en este trabajo se estudió su efecto sobre la regeneración axonal del nervio ciático transectado de rata adulta incorporados en la matriz biocompatible Tissucol<sup>®</sup>.

### **3. Hipótesis**

La utilización de los PNA, en conjunto con la aplicación de Tissucol® mejorarán la sensibilidad, función motora y la morfología del nervio ciático de ratas adultas después de ser transectado.

### **4. Objetivo general**

Determinar el efecto de los PNA incorporados al Tissucol® sobre la regeneración nerviosa, función motora y la sensibilidad en el nervio ciático después de ser transectado.

#### *4.1 Objetivos específicos*

- Realizar una transección en el nervio ciático derecho de rata adulta y aplicar los diferentes tratamientos: Tissucol®, Tissucol® y PNA y sin tratamiento.
- Determinar el umbral de sensibilidad (tiempo y fuerza) de las ratas de los diferentes grupos con el estimulador de contacto del aestesiómetro para poder determinar si existen diferencias en los registros tomados antes y después de la lesión.
- Valorar los cambios sufridos en el nervio ciático de las ratas de todos los grupos por medio de microscopía óptica, electrónica e inmunofluorescencia, tanto en ratas a las que se les aplicó el tratamiento como a las que no.
- Determinar el grado de recuperación de la función motora de las ratas de todos los grupos a partir del uso de la escala Basso, Beattie y Bresnahan (BBB), después de cuatro meses de haber realizado la lesión al nervio ciático y su tratamiento.

## 5. Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Subcomité de Investigación de Posgrado, Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE), de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM – 062 – ZOO – 1999.

### 5.1 Diseño experimental y animales

El diseño que se utilizó en este estudio fue el denominado Completamente Aleatorizado (DCA) con mediciones repetidas y las unidades experimentales fueron ratas hembras adultas de la estirpe Wistar (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, D.F.) de aproximadamente 250 gr (Ducoing, 2009).

Debido a las restricciones de espacio, animales y a lo agresivo de la lesión, solo se autorizó el uso de 18 animales, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente para formar tres grupos. Los tratamientos aplicados fueron: Grupo TISSUCOL: transección y aplicación de Tissucol® para reparar la lesión (n = 6), Grupo TRANSPLANTE: transección y aplicación de Tissucol® más glía envolvente (fenotipo aldainoglía) para reparar la lesión (n = 6), y Grupo TESTIGO: únicamente transección (n = 6). Los animales fueron mantenidos en cajas de acrílico en donde el agua y el alimento se proporcionaron *ad libitum*. Se colocaron tres animales por caja pero después de la cirugía se colocó una sola rata por caja hasta que la herida sanara por completo. Se usó un ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas y la temperatura promedio del cuarto fue de 23 °C.

Para este experimento se utilizó una estructura factorial 3X2 (tabla 1), siendo el primer factor el método de reparación quirúrgica del nervio transectado y el segundo factor el lado donde se realizó la lesión.

**Tabla 1. Estructura factorial del experimento.**

Lateralidad	Grupos y método de reparación		
	TISSUCOL	TRANSPLANTE	TESTIGO
MPD	+	+	+*
MPI	-	-	-

+ = transección y reparación. +\* = transección sin reparación. - = sin lesión

## 5.2 Preparación del Tissucol®

El Tissucol está compuesto por un concentrado protéico adhesivo liofilizado, para disolverse en una solución de aprotinina y trombina liofilizada para reconstituirse con una solución de cloruro de calcio (Atrah, 1994) (tabla 2).

**Tabla 2. Composición del Tissucol®.**

a)	Proteína coagulable	75-1155 mg
	1) Fibrinógeno	70-110 mg
	2) Plasmafibronectina	2-9 mg
b)	Factor XIII	10-50 U.I. <sup>1</sup>
c)	Plasminógeno	40-120 mg
	<b>Solución de aprotinina</b>	3,000 U.I.K/ml <sup>2</sup>
	<b>Trombina 4 U/ml</b>	
	1 ml de la solución reconstituida	
	contiene	4 U.I. <sup>3</sup>
	<b>Trombina 500 U/ml</b>	
	1 ml de la solución reconstituida	
	contiene	500 U.I. <sup>3</sup>
	<b>Solución de cloruro de calcio</b>	40 mmol/l

<sup>1</sup>Una unidad corresponde a la cantidad de Factor XIII contenida en 1 ml de plasma normal fresco.

<sup>2</sup>3,000 unidades de inactivador de kalidínogenasa (U.I.K.).

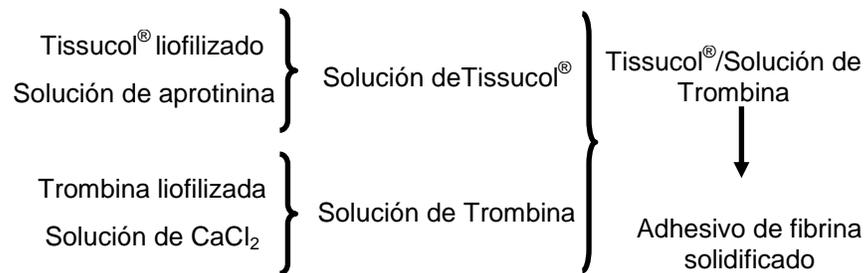
<sup>3</sup>Una unidad internacional (U.I.) de trombina está definida como la actividad contenida en 0.0853 mg del primer estándar internacional de trombina humana.

El Tissucol® (polvo liofilizado; figura 7) se reconstituyó con la solución de aprotinina para obtener el primer componente, y la trombina liofilizada se reconstituyó con la solución de cloruro de calcio para obtener el segundo componente (figura 8). Ya reconstituido, cada componente del Tissucol® fue

colocado en viales, agregando 5 µl de cada uno de ellos para después ser congelado a -70 °C hasta el momento de su utilización.



**Figura 7. Presentación comercial del Tissucol®.**



**Figura 8. Método de preparación del Tissucol®.**

### 5.3 Glía envolvente (fenotipo aldainoglía)

Los PNA que se utilizaron fueron cultivados en colaboración con el Laboratorio de Desarrollo y Regeneración del Sistema Nervioso, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, para lo cual se siguieron los siguientes pasos.

#### 5.3.1 Medio basal de cultivo celular

Se utilizó una mezcla de DMEM (Sigma cat: D5648) y DMEM/F12 (Sigma cat: D8900) en proporción 1:1, suplementado con glucosa (3 gr/L), glutamina (2 mM), penicilina (100U/ml)/estreptomina (0.1 mg/ml) (Sigma cat: P4333) y gentamicina

(40 µg/ml). Este medio se utilizó como base para preparar los medios de cultivo utilizados, tanto los suplementados con suero como el medio definido B27.

- *Medio suplementado con suero.* El medio DMEM/DMEM-F12 se suplementó con Suero Fetal Bovino (Sigma cat: F2442) al 10% (DF-10S).
- *Medio definido B27.* Al medio basal de cultivo celular se le agregó suplemento B27 (Gibco cat: 17504-044) en dilución 1:100 (DefB27).

### 5.3.2 Medio condicionado de cultivo de glía envolvente

Para el cultivo de glía envolvente se utilizaron ratas machos de entre ocho y 10 semanas de edad, a los que se les extrajeron los bulbos olfatorios bajo condiciones de esterilidad. Los bulbos se colocaron en una caja de Petri con solución de Hanks con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (Sigma cat: H6136), se les retiraron las meninges y posteriormente se separó y eliminó la sustancia blanca. La capa de fibras nerviosas y glomerular disecada se pasó a otra caja de Petri con solución de Hanks sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , y después se colocó en un tubo de 50 ml y se incubó durante 20 minutos a 37 °C en una solución de 2.5 mg/ml de tripsina en solución de Hanks sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , para después disociar con una pipeta Pasteur. Luego se resuspendió en DF-10S y se realizaron dos lavados y una centrifugación a 1200 rpm durante 7 minutos, y después las células se filtraron en una malla estéril de 45 µm para retener al tejido no disociado y se sembraron en DF-10S en frascos de cultivo de plástico de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (Nalgene) a una densidad aproximada de 2 a 5 X10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Los frascos fueron tratados previamente con una solución de 10 µg/ml de PLL (Sigma cat: P6282) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la solución de PLL se hizo en buffer borato sódico 15 mM pH=8.4. Por último los frascos se lavaron tres veces con agua bidestilada y se dejaron secar antes de ser utilizados.

Para descartar células diferentes a la glía envolvente en el cultivo se realizó un preplaqueo, el cual consiste en poner a las células del cultivo primario directamente en un frasco de cultivo sin PLL, mantenerlas en una incubadora durante 5 minutos y después se vaciaron en otro frasco tratado con PLL y en el frasco donde se realizó el preplaqueo se añadió DF-10S.

### 5.3.3 PNA

1. Se utilizaron ratas hembras en estadio de gestación de 14 días.
2. Las ratas se sacrificaron dentro de una cámara de CO<sub>2</sub> y para obtener los embriones se realizó una cesárea.
3. Los embriones fueron extraídos bajo condiciones de esterilidad, haciendo una incisión en las paredes uterinas en la porción dorsal de los discos placentarios y se rompió el saco vitelino para su expulsión. Los embriones se mantuvieron en solución de Hanks (HBSS) con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> fría sobre una caja de Petri de 96 mm. Los embriones se decapitaron y las cabezas se colocaron en otra caja de Petri en HBSS con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>.
4. El ectodermo del cráneo se separó con tijeras y pinzas finas y los huesos del cráneo se cortaron para exponer los hemisferios cerebrales. Se hizo un corte en la unión de los hemisferios cerebrales y se retiraron las meninges.
5. En la parte interior de cada hemisferio se localiza el cuerpo estriado, que es una estructura lobulada en forma de “corazón” que presenta varios puntos de irrigación. Estas estructuras se cortaron y se retiraron los restos de tejido conectivo, conservando los cuerpos estriados en un ml de HBSS sin Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> en un tubo de centrífuga de 15 ml y se pusieron a incubar en baño María a 37 °C durante 30 minutos.
6. Posteriormente, se disgregaron mecánicamente con una pipeta de un ml (p1000) de 20 a 30 veces y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos. El precipitado celular se diluyó en 500 µl de medio DefB27 y se disgregaron nuevamente con una p1000. Esta suspensión celular se diluyó en 16 ml de

medio DefB27 más los factores de crecimiento EGF y FGF a una concentración de 20 ng/ml y se sembraron (cuatro a seis cuerpos estriados por caja) en cuatro frascos de plástico de 25 cm<sup>3</sup> sin Poli-L-Lisina (PLL) y se mantuvieron durante 96 horas en incubación a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 96 horas se expandieron las neuroesferas primarias (primer pase).

7. Las neuroesferas se colocaron en un tubo FALCON de 50 ml por decantación desde la placa de plástico. La suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante cinco minutos. El medio sobrenadante se decantó en otro tubo, se añadió un ml de medio condicionado de glía envolvente y medio DefB27 (1:1) para diferenciar los PNA, y el precipitado celular se disgregó mecánicamente con una p1000 20 veces sin hacer burbujas hasta disgregar las esferas más grandes. La suspensión celular se diluyó en el doble del volumen que se utilizó inicialmente (de cada frasco se obtienen dos frascos más) y se sembraron en ocho frascos de plástico de 25 cm<sup>3</sup>. A los primeros frascos también se les añadió medio condicionado de aldainoglia y medio DefB27 (1:1) y se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.
8. Pasado este tiempo, las neuroesferas secundarias se recogieron en un tubo de 50 ml mediante decantación, se disgregaron suavemente con una p1000 en medio DMEM/DF12 sin suero y fueron pasadas por una malla de 20 µm y se realizó un recuento celular.
9. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas y posteriormente fueron congeladas y mantenidas en este estado con medio de congelación a -70 °C hasta su utilización.

#### 5.3.4 Criopreservación de células

Los PNA se resuspendieron en medio DF-10S con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) y 0.1% de metilcelulosa (Sigma), a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mililitro, que se congelaron a  $-80$  °C hasta que fueron utilizadas.

#### 5.3.5 Descongelación de las células

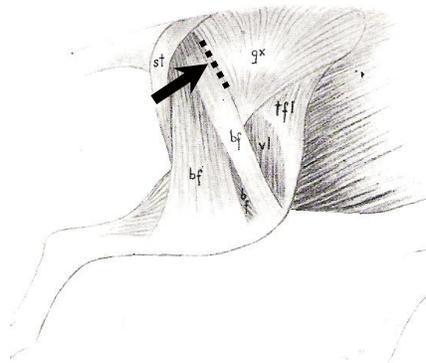
Las células contenidas en el criotubo se descongelaron en baño María a 37 °C durante dos minutos y luego se añadió un ml de DF-10S y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Luego se sacó el criotubo de la centrífuga y se eliminó el sobrenadante con una pipeta de un ml, para posteriormente resuspender el pellet de células con un ml de DF-10S. El criotubo con células se volvió a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet de células con 50  $\mu$ l de medio DMEM suplementado.

#### 5.4 Procedimiento quirúrgico

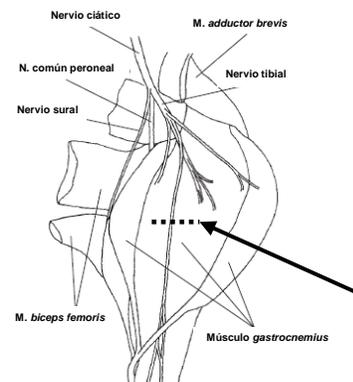
Las cirugías fueron realizadas utilizando un microscopio estereoscópico para microcirugía (Carl Zeiss OPMI 19-FC, West Germany). Todos los animales de cada grupo fueron anestesiados con una combinación de ketamina-xilacina (Anesket y Procin, Laboratorios PISA, Guadalajara, Jalisco) vía intraperitoneal a una dosis de 87 mg/kg y 13 mg/kg respectivamente (Plumb, 2002). Una vez anestesiada, cada rata fue colocada en decúbito lateral izquierdo y la pierna derecha se elevó ligeramente e inmovilizó, rasuró y embrocó con una solución de yodo al 2%. Luego se hizo una incisión vertical sobre la piel de la superficie lateral externa de la pierna derecha de aproximadamente tres centímetros, teniendo como referencia al fémur, y se incidió la *fascia latae* para identificar a los músculos *gluteus maximus* y *biceps femoris* (figura 9) para así poder separarlos y exponer al nervio ciático (Chace, 1963; Lee *et al*, 2000; Fossum, 2007). Una vez expuesto, al

nervio se le colocaron cuatro puntos de sutura laterales sobre el epineuro con nylon 9-0 (Jubran & Widenfalk, 2007), los cuales sirvieron como “puente” para posteriormente hacer la transección con tijeras para microcirugía justo por debajo de los puntos de sutura, misma que se realizó aproximadamente 1 cm proximal a la trifurcación del nervio ciático (figura 10) (Lee *et al*, 2000). Posteriormente, y sin dejar espacio alguno entre ellos, los muñones resultantes se afrontaron con las mismas suturas utilizadas para llevar a cabo la transección y así facilitar la reparación del nervio.

En todos los animales las fascias musculares se suturaron con vycryl 5-0 y la piel con nylon 5-0, y a las 18 ratas se les hizo exactamente el mismo procedimiento de exposición y transección del nervio ciático



**Figura 9.** Sitio de la incisión (flecha y línea punteada) y posición del músculo *bíceps femoris* (*bf*) y *gluteus maximus* (*gx*).



**Figura 10.** Localización del nervio ciático y lugar de la transección (línea punteada y flecha).

Después de la cirugía a todos los animales se les administró 2.5 mg/kg de flunixin de meglumina como analgésico cada 24 horas por cinco días (Plumb, 2002) y se observó la posible presencia de disnea, coloración de mucosas, frecuencia respiratoria y frecuencia cardiaca. Asimismo, en la herida quirúrgica se evaluó la presencia de sangrado, hematoma o infección durante 15 días posteriores a la cirugía.

## *5.5 Morfología*

La morfología se evaluó de manera macro y microscópica. La evaluación microscópica se basó en la observación y de la detección de diferentes tipos celulares, de la mielinización axonal, de la orientación de las fibras de colágena y de la formación de cicatriz, y para ello se utilizaron técnicas de microscopía óptica, electrónica de transmisión (MET) e inmunofluorescencia (IF).

### *5.5.1 Evaluación macroscópica*

Macroscópicamente se revisó la cantidad de adherencias formadas por el nervio hacia los tejidos aledaños y estado general de la anastomosis nerviosa (Castellanos, 2008).

En el caso de presencia de adherencias, su evaluación se realizó de acuerdo con la escala subjetiva descrita por Olmos y colaboradores (2001), la cual se basa en la severidad de éstas y tiene una graduación de cero a cuatro: 0 = sin adherencias, 1 = adherencias mínimas fácilmente despegables, 2 = adherencia completa de fácil despegamiento, 3 = adherencia completa de difícil despegamiento.

### *5.5.2 Microscopía óptica*

Para obtener los nervios ciáticos derecho (con tratamiento) e izquierdo (sin tratamiento), los animales fueron sacrificados inyectándoles 150 mg/kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal.

Una vez montadas y teñidas las laminillas, se analizó la totalidad del nervio y se observó el grado de inflamación y presencia de fibrosis. A cada parámetro evaluado se le asignó una escala semicuantitativa en la cual le fue asignado un

porcentaje de acuerdo con la intensidad de los cambios histopatológicos presentes: 0-10 % ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado y del 51-100% severo (Castellanos, 2008).

La organización de las fibras de colágena se realizó mediante una escala subjetiva descrita por el Dr. Miguel Gaxiola (INER, comunicación personal), 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 y 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.

Las técnicas histológicas que se utilizaron para teñir los cortes de nervio y así poder observarlos al microscopio fueron realizadas en colaboración con el Laboratorio de Técnicas Histológicas, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, mismas que se describen a continuación (Prophet *et al*, 1995; Carson, 1997).

#### *5.5.2.1 Tricrómica de Masson*

La tinción tricrómica de Masson, al igual que otros colorantes tricrómicos, es una tinción especial que permite visualizar claramente las fibras de colágena y diferenciarlas de las fibras musculares. Para ello, se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágena. La preparación de la muestra se realizó de acuerdo con los siguientes pasos:

1. El tejido se fijó en formalina neutra al 10% estabilizada.
2. Se incluyó en parafina fundida.
3. Se hicieron cortes del cubo de parafina de seis micrones.

4. Se desparafinó e hidrató hasta llegar a agua destilada y el corte se trató en solución de Bouin por toda una noche a temperatura ambiente.
5. Se lavó con agua corriente hasta que las secciones se aclararon. Luego se enjuagó con agua destilada.
6. Se tiñó con solución de hematoxilina de hierro de Weigert (colorante aniónico) durante 10 minutos, la cual sirvió como mordente.
7. Se lavó en alcohol ácido para diferenciar de la tinción nuclear.
8. Se lavó con agua corriente durante 10 minutos y se enjuagó con agua destilada.
9. Se tiñó con solución de fuscina ácida-escarlata de Biebrich (colorante aniónico) durante 15 minutos y se enjuagó con agua destilada.
10. Se diferenció con solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (colorante aniónico) durante 10 minutos. Esto sirvió para sacar el exceso de colorante e hizo que la fuscina ácida-escarlata de Biebrich difundiera hacia el colágeno para que funcionara como mordente del azul de anilina.
11. Se contrastó con la solución de azul de anilina (colorante catiónico) durante 10 minutos y se enjuagó con agua destilada.
12. Se diferenció con solución de ácido acético por cinco minutos.
13. Se deshidrató y aclaró a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, dos cambios cada uno, dos minutos cada uno.
14. Se montó con resina sintética.

Como resultado de esta tinción, lo que se puede observar es:

- Núcleos: negro.
- Músculo, citoplasma, queratina: rojo.
- Colágeno: azul o verde.

### 5.5.2.2 Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E)

Es la técnica más utilizada como herramienta de diagnóstico, y es capaz de teñir todas las estructuras tisulares. La hematoxilina es un colorante alcalino que se une a estructuras de naturaleza ácida y las tiñe de color azul, mientras que la eosina (colorante ácido) se une y tiñe estructuras alcalinas o cargadas negativamente (proteínas) de color rosa. La preparación de la muestra se realizó de acuerdo con los siguientes pasos:

1. El tejido se fijó en formalina neutra al 10% estabilizada.
2. Se incluyó en parafina fundida.
3. Se hicieron cortes del cubo de parafina de seis micrones.
4. Se desparafinó e hidrató hasta llegar al agua destilada.
5. Se tiñó en la solución de hematoxilina de Harris por 15 minutos.
6. Se lavó en agua corriente por cinco minutos.
7. Se diferenció en alcohol ácido al 1%, dos lavados.
8. Se lavó en agua corriente por 10 minutos.
9. Se colocó la laminilla en una solución saturada de carbonato de litio hasta que se tornaron hacia un color azul brillante.
10. Se colocó en etanol al 80% por dos minutos.
11. Se contrastó en solución de eosina – floxina por dos minutos.
12. Se montó con resina sintética.

Como resultado de esta tinción, lo que se puede observar es:

- Núcleos: azul.
- Citoplasma: de rosado a rojo.
- La mayoría de los tejidos: de rosado a rojo.

### 5.5.3 MET

La MET es una técnica en donde se hace pasar un rayo de electrones a través de un corte ultradelgado de una muestra. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra, la cual es reflejada en una pantalla fluorescente o capturada en una película fotográfica (Cross & Mercer, 1993; Bozzola & Russell, 1999).

Para obtener las muestras de nervio y poder procesarlas para MET, las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina-xilacina (Anesket y Procin, Laboratorios PISA, Guadalajara, Jalisco) vía intraperitoneal a una dosis de 87 mg/kg y 13 mg/kg respectivamente (Plumb, 2002). Una vez anestesiada, se hizo un corte sobre la piel de la cavidad abdominal que se extendió lateralmente por ambos lados, cortando las costillas hasta llegar a la cavidad torácica, se localizó el corazón y se abrió el pericardio para exponer al órgano. Después se realizó un corte sobre el ápice y se introdujo una cánula por el ventrículo izquierdo hasta la aorta, se fijó y se administraron 250 ml de solución salina fisiológica al 0.09% para eliminar toda la sangre del cuerpo de la rata. Hecho esto, se administraron 250 ml de glutaraldehído al 2.5% 0.1 M en buffer de cacodilatos (pH= 7.4) para la fijación de los tejidos. Una vez fijados, se disecaron los nervios ciáticos derecho e izquierdo y se mantuvieron durante 2 horas en una solución con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH=7.4). Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH=7.4) a 4 °C (12 horas por cada lavado) y luego se hicieron cortes transversales del área de estudio de 2 a 3 mm<sup>3</sup> y se posfijaron con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 0.1% por dos horas. Las muestras se deshidrataron con una serie ascendente de etanoles (30% 15 minutos, 50% 15 minutos, 70% 15 minutos y 95% 3 X 15 minutos), se infiltraron en óxido de propileno al 100% 3 X 15 minutos y se incluyeron en una mezcla de EPON 812 y óxido de propileno (1:1) durante 3 días y después en EPON 812 puro

durante 2 horas. Para que la resina polimerizara adecuadamente las muestras se colocaron dentro de una estufa a 60 °C durante tres días. Una vez procesadas las muestras, se realizaron cortes finos de 70 nm, contrastándose con acetato de uranilo (30 minutos) y citrato de plomo (15 minutos) para después ser observados en un microscopio electrónico de transmisión.

#### 5.5.4 IF

El uso de antígenos específicos para tipificar células es una herramienta que ha servido para identificarlas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos antígenos han sido utilizados para observar cómo se lleva a cabo la diferenciación celular (Stemberger *et al*, 1978), para diagnosticar tumores (Eng & Rubinstein, 1978) y para determinar el origen celular en lesiones patológicas (Stefansson & Wollmann, 1980).

Las ratas fueron perfundidas con paraformaldehído al 4%, y una vez obtenidos los nervios, estos fueron colocados en una solución de sacarosa al 30% durante tres días. Pasado este tiempo los nervios fueron sumergidos en 2-metilbutano para congelarlos con hielo seco, y después se colocaron en Tissue-Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japón) para hacer los cortes en un criostato (Leika Microsystems 1550s, Nussloch, Alemania) el cual se encontraba a una temperatura de -20 °C.

Posteriormente los cortes se rehidrataron en buffer de fosfatos (PBS, pH=7.3) y después se bloquearon por 30 minutos en PBS con suero normal de cabra al 2% (1:200) y se hicieron tres lavados. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron: Proteína Básica de la Mielina (BMP), Proteína S-100 (S-100), Nestina (Nes) y Neurofilamento (Neur) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA). Estos anticuerpos se aplicaron a una concentración 1:200 y se dejaron incubar por 48 horas en una cámara húmeda a 4°C. Después se hicieron tres lavados con

PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios Alexa 488 (Invitrogen, California, USA) policlonal cabra/anticonejo (color verde) y Alexa 546 (Invitrogen, California, USA) cabra/antiratón (color rojo) en PBS, los cuales se incubaron a temperatura ambiente por 4 horas y luego se hicieron tres lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para contrastar los núcleos celulares se utilizó Yoduro de Propidio (YP). Posteriormente se colocó una gota de Vectashield (Vector Labs, Inc. USA), se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

### *5.6 Aestesiómetro*

El aestesiómetro (del griego αισθησις [*aisthesis*], sensación; μέτρον [*metron*], medida) se utilizó para establecer el umbral de sensibilidad de los miembros pélvicos derechos (MPD) e izquierdos (MPI) de cada rata de los tres grupos experimentales antes de la lesión y se determinó si la sensibilidad era normal o estaba alterada luego de hacerles la lesión (alodinia mecánica) (Mizushima *et al*, 2005).

Para la realización de esta prueba, las ratas fueron colocadas en jaulas de acrílico durante 15 minutos para que se aclimataran a estar dentro de ella. Las jaulas estaban sobre una reja elevada de metal y por debajo de ella el estimulador de contacto del aestesiómetro plantar (modelo 37400 Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italia; figura 11), el cual tiene un filamento de metal con borde redondeado de 0.5 mm de diámetro. Al accionar el estimulador, el filamento tocó el centro de la superficie plantar de la rata y ejerció una presión por debajo del umbral de sensación. Posteriormente la fuerza de presión fue incrementando a razón de 2.5 g/s y en ese momento el aestesiómetro midió el tiempo de reacción y la fuerza aplicada para que el animal retirara su extremidad posterior. En cada animal se realizaron tres mediciones con un lapso de 15

minutos entre cada una de ellas y posteriormente se obtuvo el promedio de esos tres valores, mismo que se le consideró como valor umbral.



**Figura 11. Aestesiómetro plantar.**

#### *5.6.1 Mediciones pre-tratamiento*

Para conocer cuál era el umbral de sensibilidad de los MPD y MPI de cada rata, a todas ellas se les hicieron cinco mediciones previas a la cirugía (de acuerdo con la metodología descrita anteriormente) con la intención de tener valores basales de la fuerza aplicada y el tiempo de reacción, y así poder compararlos con los obtenidos después de hacerles la transección del nervio ciático derecho.

#### *5.6.2 Mediciones post-tratamiento*

A partir del séptimo día posterior a la cirugía, a todos los animales se les hicieron 18 mediciones en un lapso de cuatro meses (Menovsky & Beek, 2001). Se determinó este lapso debido a que se ha observado que una vez pasado este tiempo no existe una mejoría de la función motora (Huang *et al*, 1992; Menovsky & Beek, 2001).

### 5.7 Calificación BBB

Los procesos que se llevan a cabo durante la evolución de las lesiones y la influencia de los diversos tratamientos en ellas son muy difíciles de evaluar. Sin embargo, lo que sí se puede estudiar es el resultado de los procesos de recuperación motriz y funcional en las ratas. Existe una escala cualitativa para medir el movimiento voluntario de las articulaciones de las extremidades posteriores de roedores en la que se evalúan y califican los movimientos de tobillo, rodilla y cadera. A esta escala se le conoce como BBB por las iniciales de los apellidos de sus creadores, Basso, Beattie y Bresnahan (Basso *et al*, 1995). El desplazamiento de las ratas fue grabado con una cámara digital (Fujifilm FinePix J10) y la evaluación de las ratas fue realizada por una persona ajena al experimento pero con una amplia experiencia en la realización de esta evaluación y se hicieron dos evaluaciones: la primera siete días después de haber realizado la lesión y la segunda hasta después de haber pasado cuatro meses (fin del estudio).

## 6. Análisis estadístico

### 6.1 Aestesiómetro

Los valores pre-tratamiento para fuerza aplicada y tiempo de reacción tanto del MPD como del MPI se compararon entre sí, a modo de establecer la técnica experimental y una posible diferencia entre ambos miembros de todas las ratas. Para ello se realizó una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el paquete computacional GraphPad Prism (Prism 5 for Macintosh OS X, v5.0a, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) y un nivel de significancia de 0.05.

Pasados siete días de realizada la lesión, se hicieron 18 mediciones a todas las ratas de los tres grupos en tiempos igualmente espaciados. Para detectar el efecto de los tratamientos, en cada medición se obtuvo la diferencia entre el valor post-tratamiento y pre-tratamiento (tiempo cero) de las variables fuerza aplicada y tiempo de reacción. Los perfiles obtenidos de los tres tratamientos y de los MPD y MPI fueron analizados como una estructura factorial sin interacción mediante la técnica Análisis de Perfiles, con lo que se buscó determinar si estos perfiles eran paralelos o no (diferentes) entre si (Morrison, 1967). El procesamiento de la información para este análisis se realizó utilizando el procedimiento análisis de varianza multivariado (MANDEVA) con mediciones repetidas del paquete computacional JMP<sup>®</sup> (Statistical Discovery Software for Macintosh, v5.0.1a, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA), con un nivel de significancia de 0.05.

### 6.2 Morfología y calificación BBB

Para las evaluaciones macroscópicas, histológicas y para la calificación BBB se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, utilizando el paquete computacional GraphPad Prism (Prism 5 for Macintosh OS X, v5.0a, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) y un nivel de significancia de 0.05.

## 7. Resultados

Dos animales del grupo TESTIGO, uno del grupo TISSUCOL y uno del grupo TRANSPLANTE, murieron durante el estudio.

En los grupos TESTIGO (25%) y TISSUCOL (20%) solo hubo una rata que presentó autotomía, en cambio en el grupo TRANSPLANTE cuatro ratas (80%) presentaron este comportamiento.

En todos los grupos de estudio, ningún animal (0%) mostró signos clínicos de infección de la herida quirúrgica, disnea o alteraciones en las constantes fisiológicas, mismas que siempre se encontraron dentro de los parámetros normales ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis)

### 7.1 PNA

#### 7.1.1 Descongelado de las células y conteo celular

Inmediatamente después de descongelar las células se realizó un conteo celular y una prueba de viabilidad. Para ambas pruebas se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro (figura 12), la cual es una rejilla graduada en la que se cuenta cada célula que esté adherida a la placa; cada cuadrado de la cámara representa un volumen total de  $0.1 \text{ mm}^3$ .

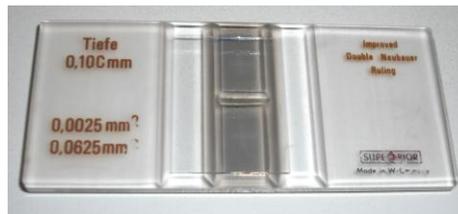


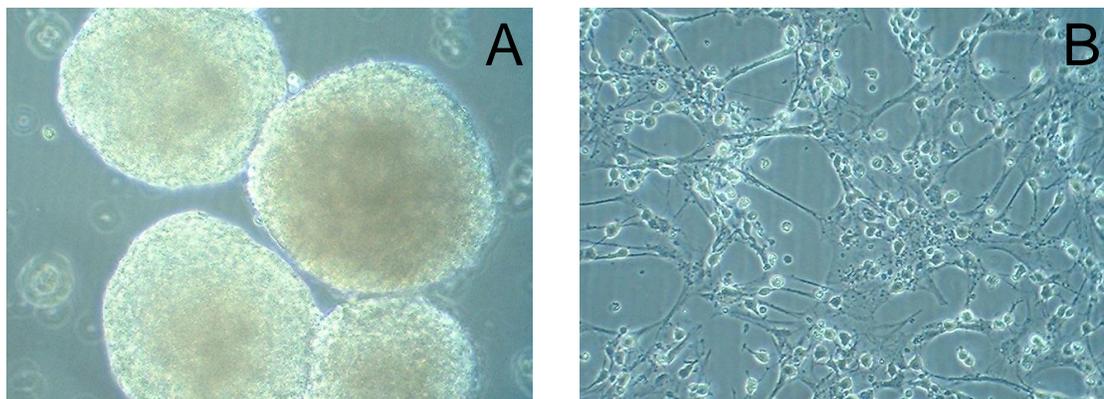
Figura 12 . Cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Para la prueba de viabilidad se mezclaron 4.5  $\mu$ l de SSF al 0.9%, 0.5  $\mu$ l de Azul de Trypan y 0.5  $\mu$ l de DMEM con células. Una vez hecha la solución, se colocó una gota en la cámara de Neubauer y únicamente se contaron las células teñidas de azul en los 4 cuadrantes externos, dando como resultado 34 células totales.

De acuerdo a la fórmula para conocer la cantidad de células totales (# células contadas\*Factor de dilución\*Factor de la cámara/cuadrantes contados) el resultado obtenido fue que había aproximadamente 850, 000 células diluidas en 50  $\mu$ l de DMEM con Suero Fetal bovino al 10%.

### 7.1.2 PNA

Los PN embrionarios *in vitro* presentaron una morfología redonda y brillante (birrefringente), con un tamaño aproximado de 10 – 20  $\mu$ m. Se formaron neuroesferas de 30 a 50 células (figura 13A) y su proliferación se observó a los dos días *in vitro* (figura 13B), en donde se observó que las células que se disociaron de las neuroesferas tenían un aspecto elipsoidal con abundantes procesos citoplasmáticos, de manera muy similar al de la glía envolvente o aldainoglia (Gudiño & Nieto, 2000).



**Figura 13. Precursores neurales de cuerpo estriado de ratas de 14 días de gestación.**

**A:** Neuroesferas.

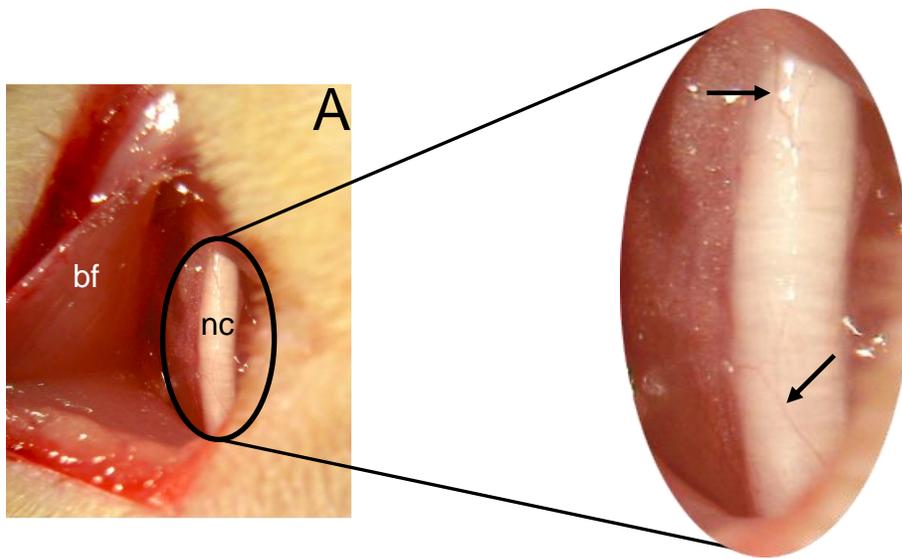
**B:** Las células tienen una forma elipsoidal con procesos celulares alargados, con forma similar a aldainoglia.

## *7.2 Procedimiento quirúrgico*

Luego de la transección, los segmentos se afrontaron utilizando las suturas colocadas sobre el epineuro y se realizaron dos protocolos de reparación del nervio ciático. A las ratas del grupo TISSUCOL únicamente se les aplicó Tissucol<sup>®</sup> y a las ratas del grupo TRANSPLANTE, la glía envolvente fue incorporada al Tissucol<sup>®</sup> a modo de que permaneciera en el lugar de la lesión y no se desplazara a otro sitio.

Para ello, el Tissucol<sup>®</sup> fue descongelado a temperatura ambiente y a todas las ratas del Grupo TISSUCOL se les aplicaron 5  $\mu$ l de cada componente del Tissucol<sup>®</sup> (5  $\mu$ l por vial, 10  $\mu$ l totales) (figura 14C), y en las ratas del grupo TRANSPLANTE se les aplicó un vial de cada componente del Tissucol<sup>®</sup> más 5  $\mu$ l de DMEM con PNA (aproximadamente 85,000 células por rata) (figura 14D).

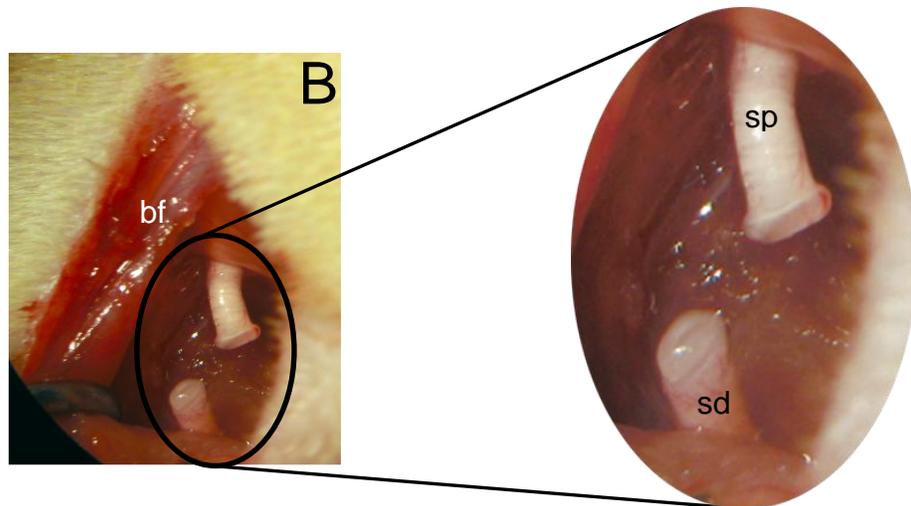
Después de la aplicación del Tissucol<sup>®</sup> los segmentos permanecieron afrontados hasta que se formara el coágulo y estos quedarán completamente unidos, momento en el cual las suturas de nylon se retiraron.



**Figura 14A. Disección de nervio ciático.**

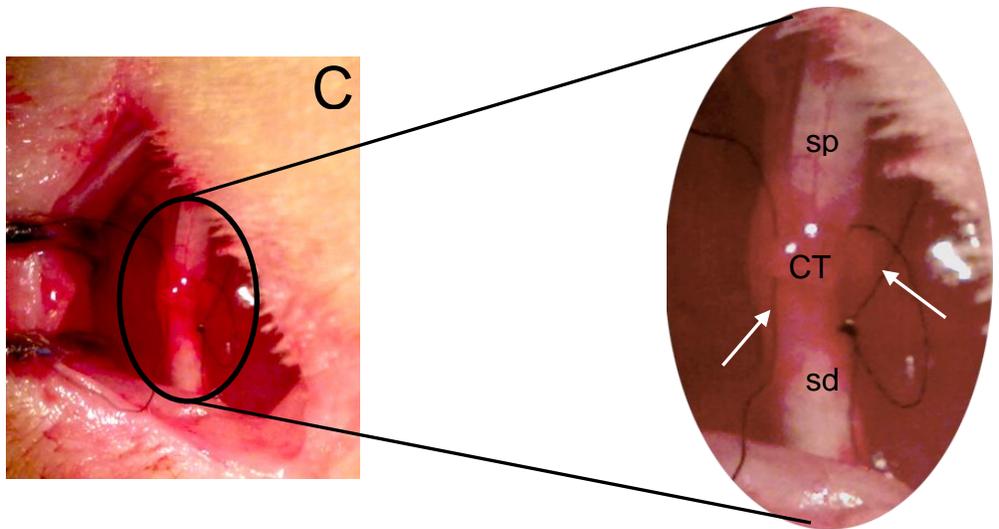
Se observa un nervio sano sin transección, el epineuro que lo recubre y algunos vasos sanguíneos (flechas).

nc: nervio ciático; bf: *biceps femoris*.

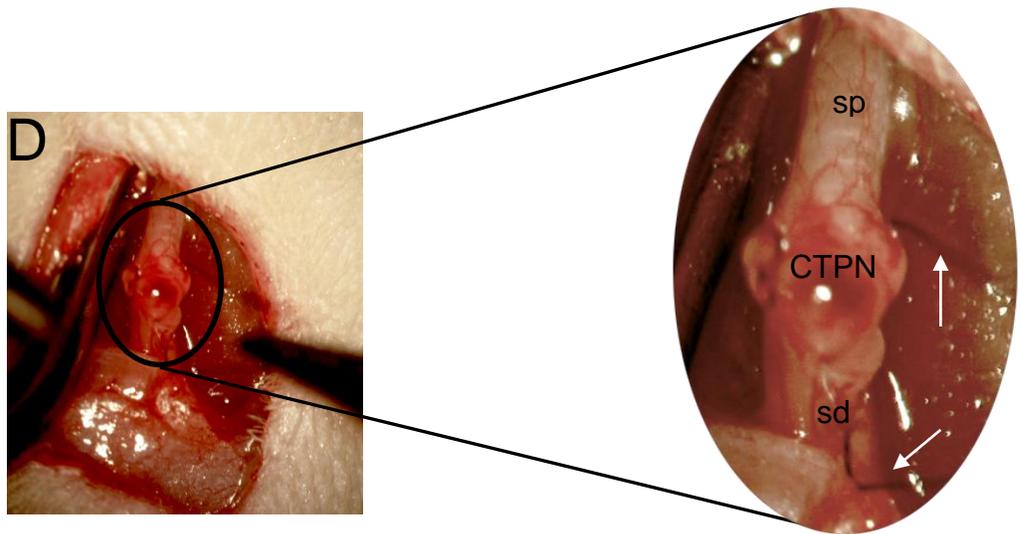


**Figura 14B. Transección del nervio ciático.**

bf: *biceps femoris*; sp: segmento proximal del nervio ciático; sd: segmento distal del nervio ciático.



**Figura 14C. Afrontamiento de los segmentos distal y proximal y reparación con Tissucol®.**  
 CT: coágulo de Tissucol®; sp: segmento proximal del nervio ciático; sd: segmento distal del nervio ciático; flechas: sutura nylon 9-0.



**Figura 14D. Afrontamiento de los segmentos distal y proximal y reparación con glía envolvente (fenotipo aldainoglia) incorporados al Tissucol®.**  
 CTPN: coágulo de Tissucol® con PN incorporados a esta matriz; sp: segmento proximal del nervio ciático; sd: segmento distal del nervio ciático; flechas: sutura nylon 9-0

### 7.3 Hallazgos macroscópicos

Transcurridos cuatro meses, las ratas de los tres grupos fueron sacrificadas para obtener los nervios ciáticos derechos e izquierdos y ser distribuidos para procesarlos para histología, MET e IF (tabla 3).

**Tabla 3. Distribución de los animales para las diferentes técnicas de análisis morfológico.**

Grupos	Histología	MET	IF
TESTIGO (n=4)	1	2	1
TISSUCOL (n=5)	2	2	1
TRANSPLANTE (n=5)	2	2	1

A la evaluación macroscópica, las anastomosis de todos los nervios tratados (100%) se observaron sin dehiscencia, a pesar del movimiento de las ratas para desplazarse, levantarse o sostenerse sobre sus extremidades posteriores

#### 7.3.1 Formación de adherencias

Con respecto a la cantidad de adherencias formadas por el nervio hacia los tejidos aledaños (tabla 4), se observó que en el grupo TESTIGO dos animales (50%) desarrollaron una adherencia mínima fácilmente despegable y dos una adherencia completa de fácil despegamiento. En el grupo TISSUCOL, un individuo (20%) presentó adherencia mínima fácilmente despegable, tres (60%) desarrollaron adherencia completa de fácil despegamiento y uno (20%) presentó una adherencia completa de difícil despegamiento. Cuatro individuos (80%) del grupo TRANSPLANTE desarrollaron adherencias mínimas de fácil despegamiento y uno (20%) presentó adherencia completa de fácil despegamiento.

Tabla 4. Grado de adherencias formada en cada grupo de estudio, a las 16 semanas postcirugía.

Cuantificación de adherencias			
Grado	Grupos		
	TESTIGO	TISSUCOL	TRANSPLANTE
<b>0</b> Sin adherencia	0	0	0
<b>1</b> Mínima fácilmente despegable	2	1	4
<b>2</b> Completa despegable	2	2	1
<b>3</b> Completa, firme y de difícil despegamiento	0	2	0

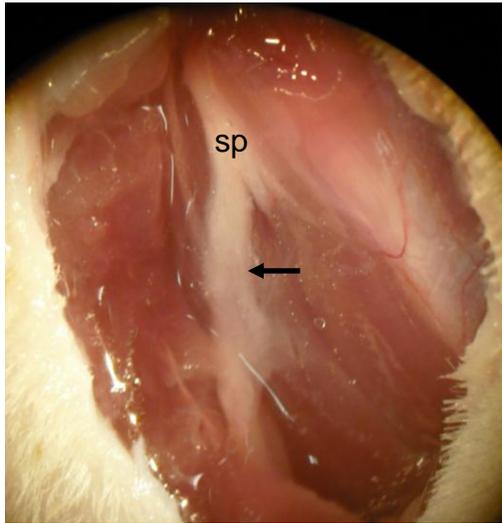
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el desarrollo de adherencias dentro de cada grupo ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis)

### 7.3.2 Reparación de la transección

En las ratas del grupo TESTIGO se observó que el segmento distal del nervio ciático transectado sufrió una degeneración completa (figura 15); incluso solo se pudo apreciar al segmento proximal que aparentemente se encontraba en proceso de regeneración.

En dos ratas del grupo TISSUCOL, la cicatrización del nervio se presentó de manera exacerbada (figura 16A); incluso el sitio en donde se realizó la lesión no se alcanzó a distinguir de manera clara. Además de esto, hubo una gran cantidad de vasos sanguíneos que se formaron y que se podían apreciar sobre la parte externa del tejido de cicatrización y se extendieron a lo largo de todo el nervio (tanto en dirección distal como proximal) y al momento de retirarlo de la pata este se encontraba duro y rígido. Por otra parte, en el resto de los animales del grupo la reparación de los segmentos proximal y distal con Tissucol® provocó que se formara una gran cantidad de tejido conjuntivo alrededor del sitio de la lesión, que también se extendió a lo largo del nervio (figura 16B).

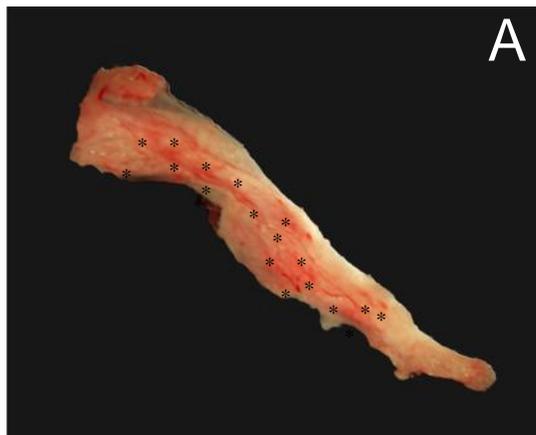
Todas las ratas del grupo TRANSPLANTE tuvieron una cicatrización aparentemente más organizada que las ratas de los grupos TESTIGO y TISSUCOL, ya que el tejido conjuntivo se delimitó únicamente en la zona de la lesión y no se extendió por todo el nervio (figura 17 A y B). Además de esto y a diferencia de los otros dos grupos, algunos vasos sanguíneos comenzaron a crecer a lo largo del nervio de manera más ordenada y la degeneración en el segmento distal parece ser que no fue tan marcada.



**Figura 15. Nervio ciático derecho de ratas del grupo TESTIGO, cuatro meses después de realizada la transección.**

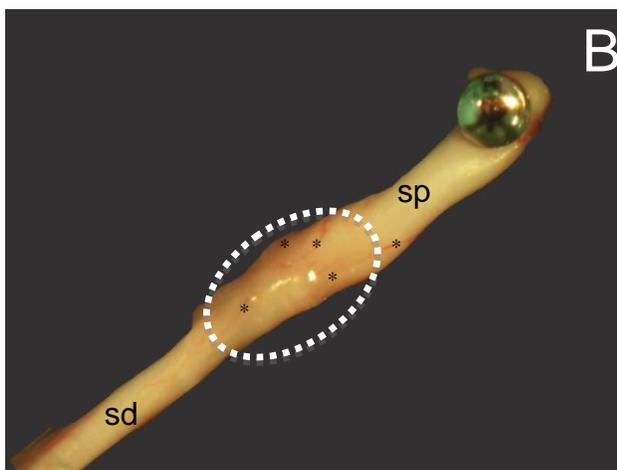
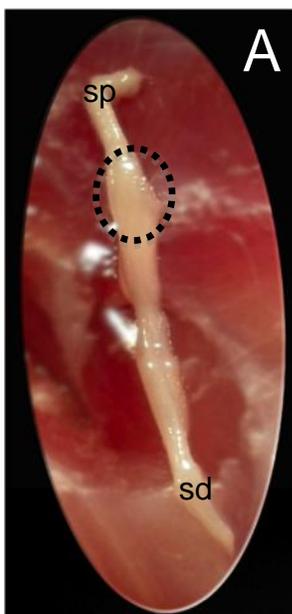
El segmento distal no se alcanza a distinguir, pero se puede apreciar como el segmento proximal aparentemente trata de alcanzar al músculo desnervado.

sp: segmento proximal; flecha negra: segmento proximal aparentemente regenerando.



**Figura 16. Nervio ciático derecho de ratas del grupo TISSUCOL, cuatro meses después de realizada la transección y la reparación.**

La cicatrización se extendió a lo largo del nervio y no se puede ubicar claramente el sitio de la lesión. **A:** Nótese la gran cantidad de vasos sanguíneos (asteriscos). **B:** A lo largo del nervio se formó una gran cantidad de tejido conjuntivo.



**Figura 17. Nervio ciático derecho de ratas del grupo TRANSPLANTE.**

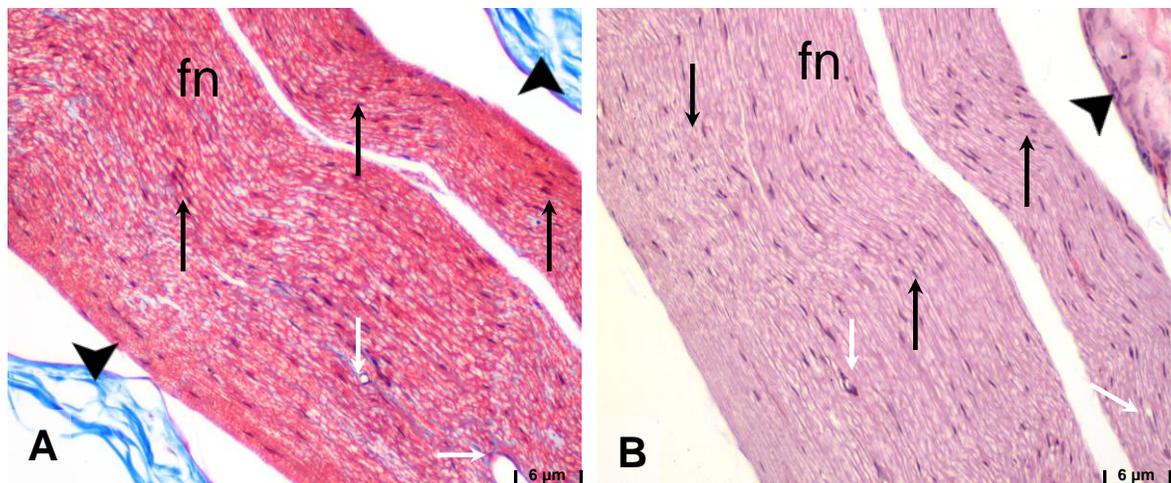
**A y B:** En la zona de la lesión (óvalo punteado), la cicatrización se delimitó solo en esta zona y, a diferencia del grupo TISSUCOL, no se extendió a lo largo del nervio. En el segmento distal (sd) aparentemente la degeneración no fue tan marcada como en los otros grupos (especialmente comparado con el grupo TESTIGO). La formación de vasos sanguíneos fue más ordenada y en menor proporción comparada con la que se presentó en las ratas del grupo TISSUCOL.

## 7.4 Microscopía óptica

Se realizaron cortes histológicos de los nervios ciáticos izquierdos (sin tratamiento) y derechos (con tratamiento) de los grupos TISSUCOL, TRANSPLANTE y TESTIGO. Estas muestras se procesaron con dos técnicas histológicas de tinción para su observación: tricrómica de Masson y H-E.

### 7.4.1 Nervio sano (control)

En las laminillas del nervio ciático izquierdo de rata, lo que se puede observar es como las fibras nerviosas y de colágena (que forman parte del epineuro y perineuro) se encuentran completamente alineadas (figura 18). También se alcanzan a distinguir núcleos de las CS que se encuentran dispersos a lo largo de las fibras nerviosas y algunos vasos sanguíneos (figura 18 A y B). Al ser este un nervio sin lesión no se observan cambios o alteraciones morfológicas aparentes.



**Figura 18. Fotomicrografía de nervio ciático sano y sin transección de rata.**

En esta imagen el nervio no presenta alteraciones morfológicas aparentes, por lo que se pueden apreciar claramente las estructuras que lo conforman: fibras nerviosas (fn), fibras de colágena (puntas de flecha), núcleos de CS (flechas negras) y vasos sanguíneos (flechas blancas).

**A: Tricrómica de Masson, B: H-E.**

## *7.4.2 Tratamientos*

### *7.4.2.1 Inflamación perineural*

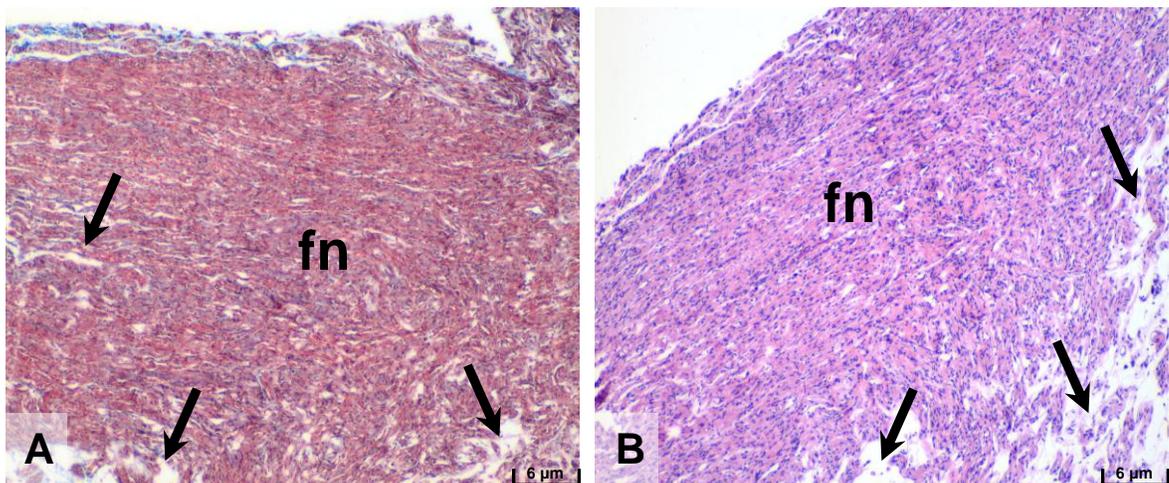
En los tres tratamientos, el grado de inflamación fue leve, y las células inflamatorias que se encontraron entre las fibras nerviosas fueron algunos linfocitos y células polimorfonucleares. El número de CS aumentó considerablemente, pero en el grupo TRANSPLANTE hubo una menor proliferación de estas últimas células.

### *7.4.2.2 Grado de lesión: Segmento proximal*

En los cortes histológicos de nervio ciático derecho de las ratas del grupo TESTIGO (figura 19), lo que se observó en el segmento proximal fue un grado de lesión severo, en el que hubieron grandes espacios en blanco (sin tejido), algunas vacuolas y también se pudo apreciar como la alineación de las fibras nerviosas se perdió por completo, formando una masa de CS, capilares, fibroblastos, MQ y fibras de colágena totalmente desorganizada. En el nervio ciático derecho reparado con Tissucol<sup>®</sup> (figura 20), lo que se pudo apreciar en el segmento proximal es un grado de lesión moderado, en el que hubo menos espacios sin tejido pero el número de vacuolas fue mayor. Además de esto hubo una mejor alineación de las fibras nerviosas y un arreglo más ordenado de las de colágena en comparación con lo sucedido en el grupo TESTIGO. En el nervio ciático derecho reparado con glía envolvente incorporada al Tissucol<sup>®</sup> (figura 21), presentó un grado de lesión leve, y de los tres grupos fue el que presentó la menor cantidad de vacuolas y también una mejor alineación de las fibras nerviosas y un arreglo de las de colágena más ordenado.

#### 7.4.2.3 Fibrosis y colágena: Segmento proximal

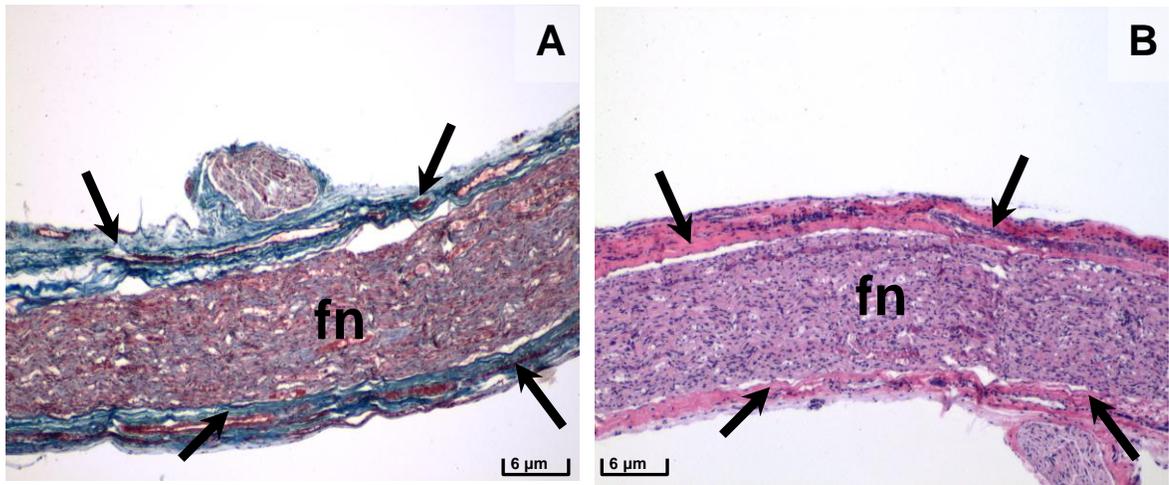
La fibrosis en el grupo TESTIGO fue moderada, en donde aumentó la cantidad de fibras de colágena que se formaron entre las fibras nerviosas y no tuvieron una dirección definida. En el grupo TISSUCOL la fibrosis presentada fue severa, en donde la proliferación de las fibras de colágena que se formaron en la periferia del nervio fue excesiva con un alineamiento paralelo al plano del borde del nervio. El grupo TRANSPLANTE tuvo una fibrosis leve, en donde las fibras de colágena que se formaron tuvieron un alineamiento paralelo al plano del borde del nervio, y las que se encontraron entre las fibras nerviosas también se alinearon paralelamente a ellas.



**Figura 19. Fotomicrografías del segmento proximal de nervio ciático de rata del grupo TESTIGO, cuatro meses después de la transección.**

La citoarquitectura del nervio se ha perdido por completo y la alineación de las fibras nerviosas (fn) ha desaparecido. Las fibras de colágena y las CS aumentaron considerablemente (puntos morados en B). Además de esto también hubo grandes espacios sin tejido (flechas).

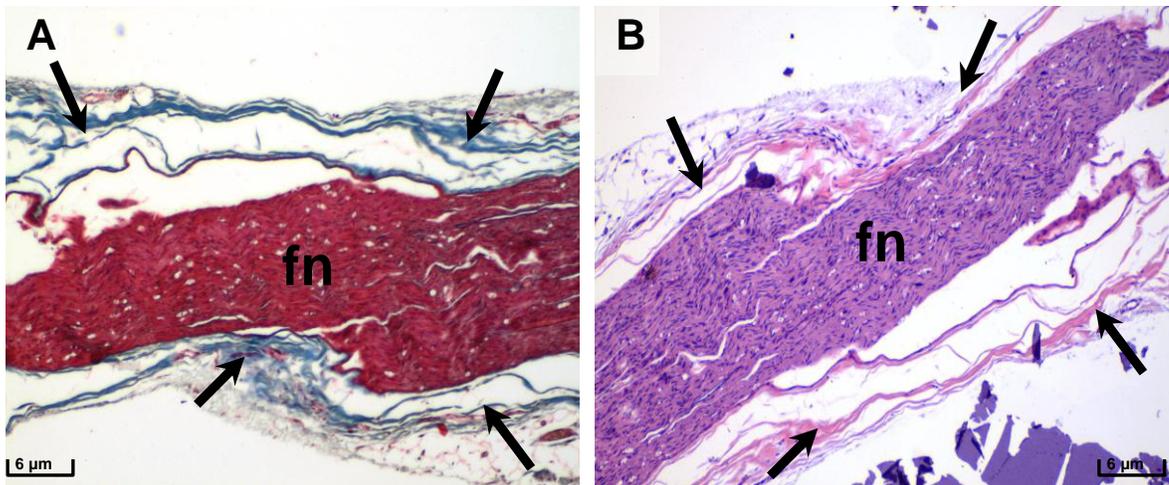
**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**



**Figura 20. Fotomicrografías del segmento proximal de nervio ciático de rata del grupo TISSUCOL, cuatro meses después de la transección.**

Las fibras nerviosas (fn) conservaron cierta alineación, disminuyeron los espacios sin tejido pero aumentó la cantidad de vacuolas entre ellas. Las fibras de colágena (flechas) se acumularon y se alinearon en la periferia del nervio. Las CS aumentaron considerablemente y hubo algunas células inflamatorias.

**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**



**Figura 21. Fotomicrografías del segmento proximal de nervio ciático de rata del grupo TRANSPLANTE, cuatro meses después de la transección.**

Las fibras nerviosas (fn) tuvieron la mejor alineación de todos los grupos experimentales, y la cantidad de vacuolas entre ellas fueron menores en comparación con los otros dos grupos. Las fibras de colágena (flechas) se alinearon en la periferia del nervio, muy parecido a como lo hicieron en el nervio sano. Las CS aumentaron en menor proporción y hubo algunas células inflamatorias.

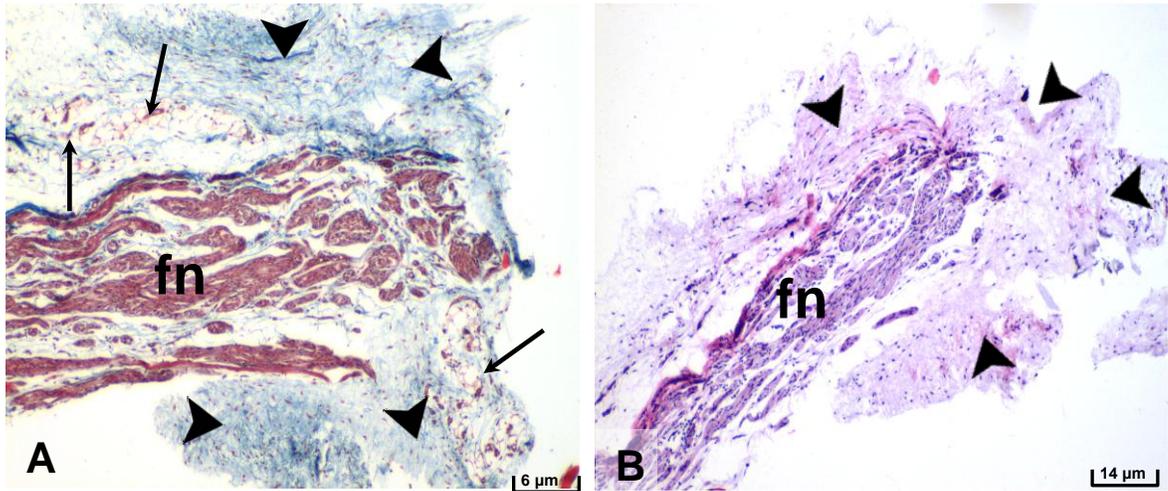
**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**

#### *7.4.2.4 Grado de lesión: Zona de la transección*

En el grupo TESTIGO (figura 22) el grado de lesión observado fue severo, en donde la cantidad de fibras nerviosas, así como su diámetro disminuyeron. Los espacios sin tejido aumentaron en comparación con la porción anterior del segmento y el nervio se fue haciendo más delgado conforme se acercaba al sitio de la transección. El grupo TISSUCOL (figura 23) presentó un grado de lesión moderado, en donde los dos segmentos permanecieron unidos y no modificaron su tamaño. En la zona de la reparación del grupo TRANSPLANTE (figura 24), lo que se observó fue que los dos segmentos permanecieron unidos pero no pudieron establecer contacto uno con otro. A pesar de esto el grado de lesión que presentó fue moderado.

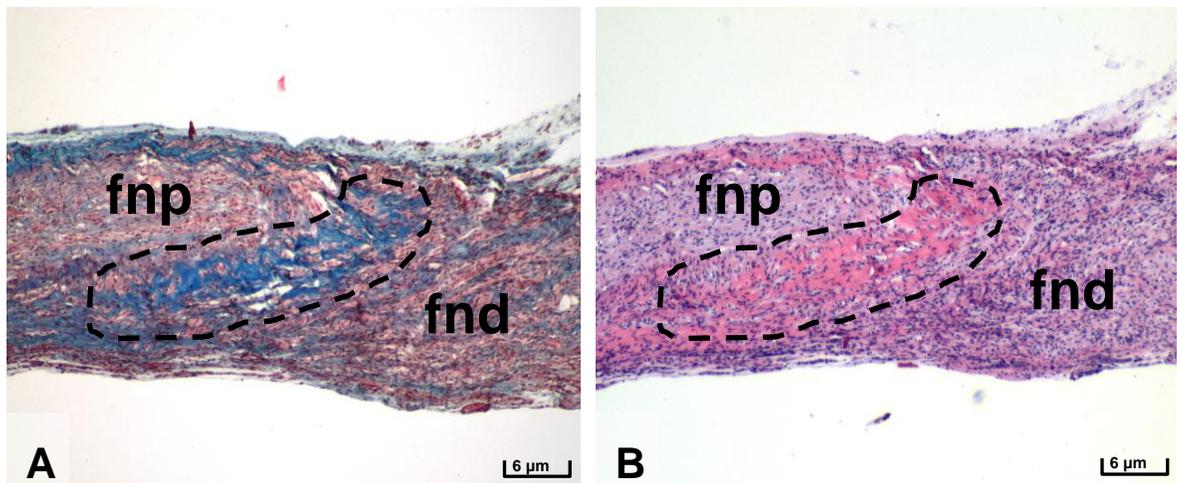
#### *7.4.2.5 Fibrosis y colágena: Zona de la transección*

La fibrosis en el grupo TESTIGO fue severa, ya que hubo una proliferación excesiva de las fibras de colágena con alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión que se acumularon en la parte final del segmento, y la cantidad de fibroblastos presentes entre estas fibras fue mayor que en otras partes del nervio. En el grupo TISSUCOL la fibrosis fue severa debido a que la proliferación de las fibras de colágena fue excesiva, las cuales presentaron un alineamiento paralelo al plano del borde de la lesión, pero a diferencia del grupo TESTIGO estas se concentraron en la parte central de la zona de la transección. Las fibras nerviosas de ambos segmentos fueron perdiendo alineación conforme se fueron acercando al sitio de la reparación y algunas de ellas lograron atravesar por la orilla de la cicatriz formada entre los dos segmentos por fibras de colágena. La mejor cicatrización se observó en el grupo TRANSPLANTE, en donde la fibrosis fue moderada y las fibras de colágena se alinearon paralelamente al plano del borde de la lesión y de manera más organizada en comparación con los otros dos grupos.



**Figura 22. Fotomicrografías del sitio de la transección de nervio ciático de rata del grupo TESTIGO, cuatro meses después de la transección.**

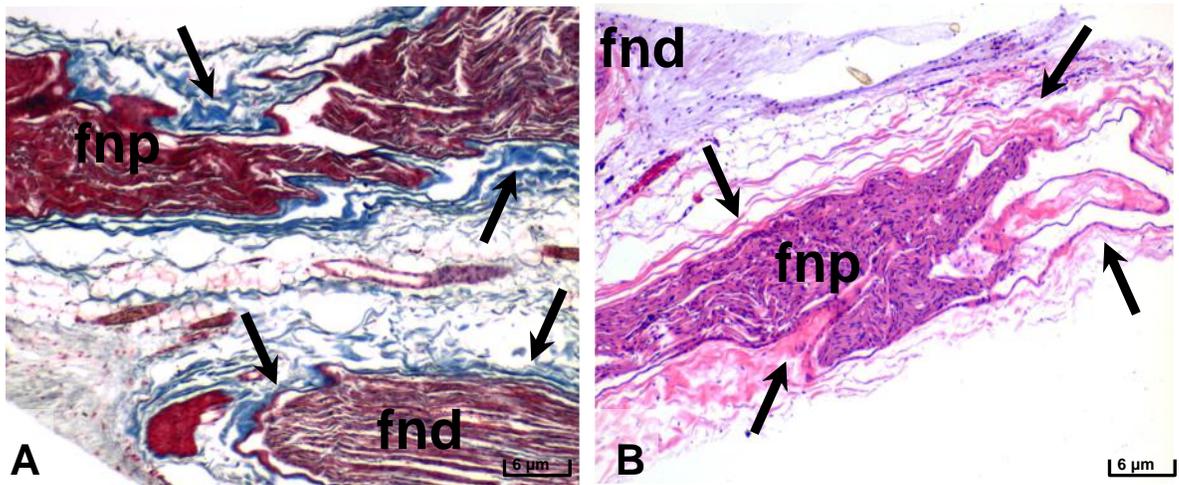
Una gran cantidad de colágena (puntas de flecha) se acumuló en la porción final del nervio transectado, además de que se fue haciendo más delgado conforme se iba acercando a esta zona y los espacios sin tejido fueron más grandes. Algunos vasos sanguíneos comenzaron a crecer entre las fibras de colágena (flechas), y entre ellas hubo una gran cantidad de fibroblastos. **A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**



**Figura 23. Fotomicrografías del sitio de la transección de nervio ciático de rata del grupo TISUCOL, cuatro meses después de la transección.**

Los segmentos están unidos por una gran cantidad de fibras de colágena y algunas fibras nerviosas alcanzaron a atravesar esta cicatriz pero por la periferia de esta. Las fibras nerviosas de los segmentos proximal (fnp) y distal (fnd) perdieron alineación conforme se acercaron a la cicatriz (línea punteada).

**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**



**Figura 24. Fotomicrografías del sitio de la transección de nervio ciático de rata del grupo TRANSPLANTE, cuatro meses después de la transección.**

Los segmentos no lograron mantener contacto entre ellos, pero a pesar de ello las fibras nerviosas de los segmentos proximal (fnp) y distal (fnd) se encuentran alineadas, así como las fibras de colágena (flechas).

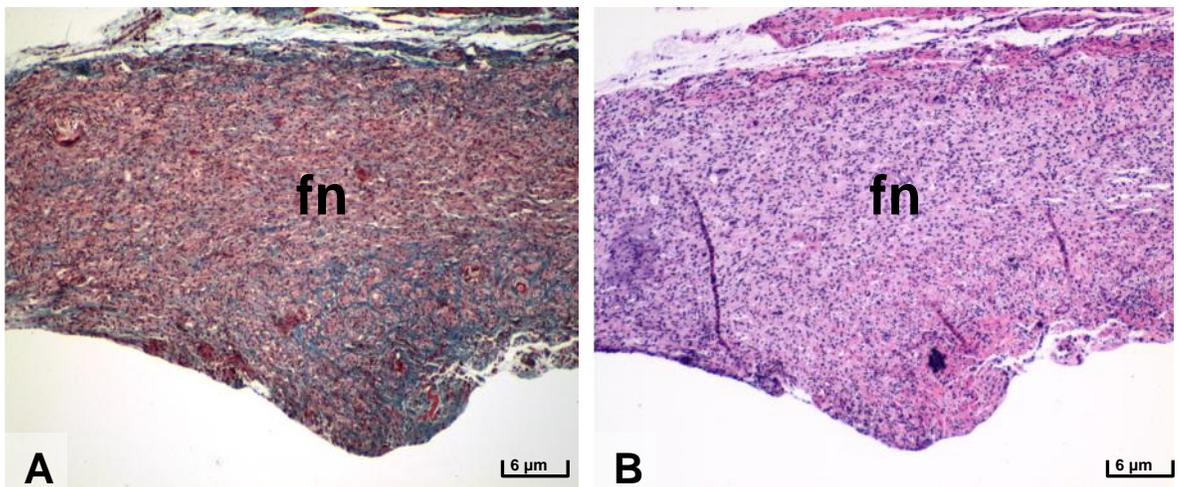
**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**

#### *7.4.2.6 Grado de lesión: Segmento distal*

En las ratas del grupo TESTIGO, el segmento distal no se observó en los cortes histológicos debido a la degeneración que sufrió, por lo que este parámetro no pudo ser evaluado. El grupo TISSUCOL (figura 25) presentó un grado de lesión severo, ya que la alineación de las fibras nerviosas se perdió totalmente pero, a diferencia del segmento proximal del grupo TESTIGO, no hubo grandes espacios sin tejido. En el grupo TRANSPLANTE (figura 26) el grado de lesión fue moderado, ya que la alineación de las fibras nerviosas se conservó a pesar de que los segmentos no tuvieron contacto entre sí. Hubo algunos espacios sin tejido, y las fibras nerviosas son ligeramente más delgadas que las del segmento proximal

#### 7.4.2.7 Fibrosis y colágena: Segmento distal

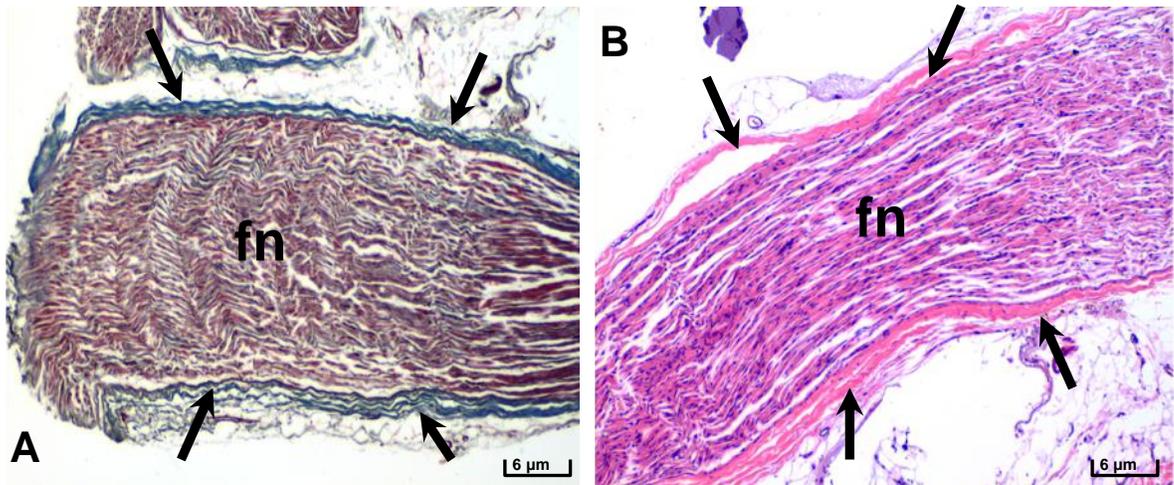
En el grupo TISSUCOL la fibrosis fue severa, pero en el grupo TRANSPLANTE el grado de fibrosis desarrollada fue moderada. En el primero la cantidad de fibras de colágena que se formaron entre las fibras nerviosas aumentó exacerbadamente y no tuvieron una dirección definida, mientras que en el segundo las fibras de colágena que se formaron se alinearon paralelamente al plano del borde del nervio.



**Figura 25. Fotomicrografías del segmento distal de nervio ciático de rata del grupo TISSUCOL, cuatro meses después de la transección.**

Las fibras nerviosas (fn) perdieron la alineación y las fibras de colágena se formaron entre las fibras nerviosas pero sin dirección alguna. Las CS aumentaron considerablemente y hubo algunas células inflamatorias.

**A: Tricrómica de Masson: B: H-E.**



**Figura 26. Fotomicrografías del segmento distal de nervio ciático de rata del grupo TRANSPLANTE, cuatro meses después de la transección.**

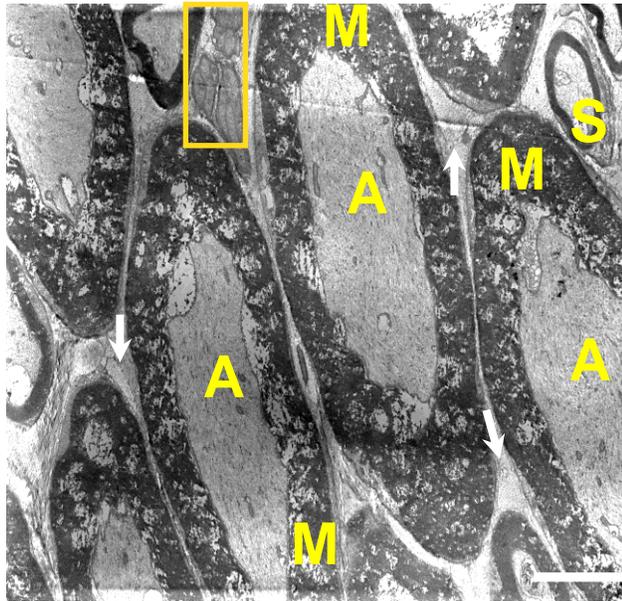
Las fibras nerviosas (fn) y las de colágena (flechas) permanecieron alineadas a pesar de que los segmentos no permanecieron unidos. Las fn tuvieron un aspecto más delgado que las fn del segmento proximal, y entre ellas hubieron algunos espacios sin tejido.

**A: Tricrómica de Masson; B: H-E.**

### 7.5 MET

Al observar las microfotografías de los nervios las capas de mielina que los recubren presentaron muchas vacuolas, probablemente debido a una mala fijación con glutaraldehído al 2.5% o por el procesamiento de montaje de las muestras (Eto *et al*, 2002). A pesar de esto se pueden apreciar la ultraestructura que conforma al nervio.

En el nervio sano (figura 27) se puede observar a la mielina recubriendo a las fibras nerviosas, a los núcleos de las CS y a las fibras de colágena que forman parte del perineuro y endoneuro.



**Figura 27. Electrofotomicrografía de un corte transversal nervio ciático sano de rata.**

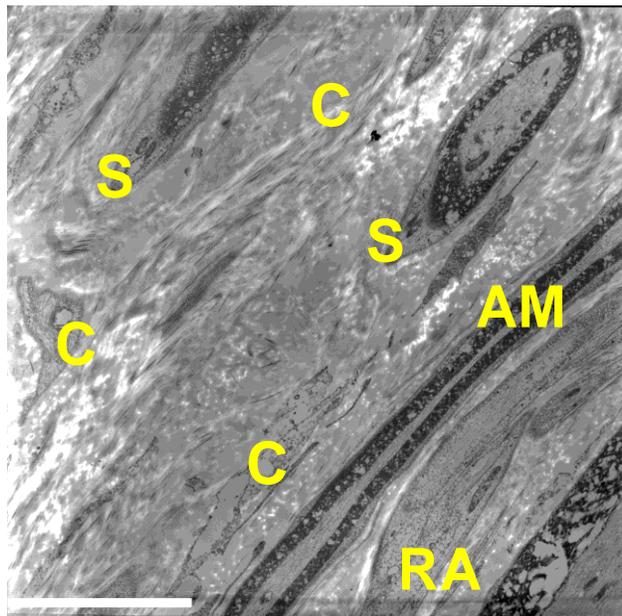
Al ser un nervio sano, se pueden apreciar algunos axones mielinizados (A) y sin mielinizar (recuadro), una célula de Schwann (S), la mielina sintetizada por esta (M) y algunas fibras de colágena (flechas). Los espacios que se observan dentro de la mielina son considerados como artefactos, aunque algunos de ellos también podrían corresponder a incisuras de Schmidt-Lanterman.

Después de la lesión, en el grupo TESTIGO (figura 28) el número de fibras nerviosas disminuyó y la colágena aumentó pero sin guardar orden alguno. Se alcanza a apreciar a un axón mielinizado pero muy delgado y a un lado a un rebrote axonal. Asimismo se observan dos núcleos de CS envolviendo axones pero también son muy delgados.

En el grupo TISSUCOL (figura 29) el panorama es diferente, ya que la cantidad de axones mielinizados es mucho mayor que en el grupo TESTIGO, pero la mielina que los recubre tiene un aspecto bastante irregular. Además de esto también se alcanzan a apreciar varios axones desmielinizados y una gran cantidad de tejido conjuntivo rodeándolos a todos.

De los tres grupos el que tuvo una mejor remielinización y crecimiento axonal fue el TRASNPLANTE (figura 30). Esto es porque en las imágenes se observa una

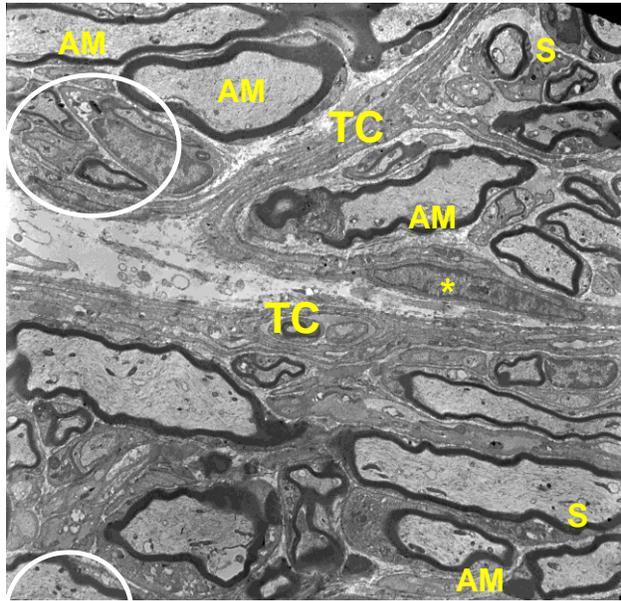
cantidad de axones mielinizados mucho mayor que en el grupo TESTIGO y TISSUCOL, además de que la mielina tiene un aspecto mucho más regular. También se alcanzan a distinguir dos tipos celulares que rodean a los axones: unas presentan un núcleo alargado que se encuentra sobre una lámina basal (morfología muy similar a la que caracteriza a las CS), y en las otras se observa un núcleo más redondo. Las fibras de colágena presentes tienen una alineación más organizada que la de los otros dos grupos.



**Figura 28. Electrofotomicrografía de nervio ciático derecho de rata del grupo TESTIGO, cuatro meses después de la transección.**

Se puede apreciar cómo la estructura anatómica del nervio se ha perdido. La cantidad de colágena (C) ha aumentado considerablemente y se encuentra totalmente desorganizada. También se pueden observar dos núcleos de CS (S), un axón mielinizado (AM) y otro rebrotando (RA).

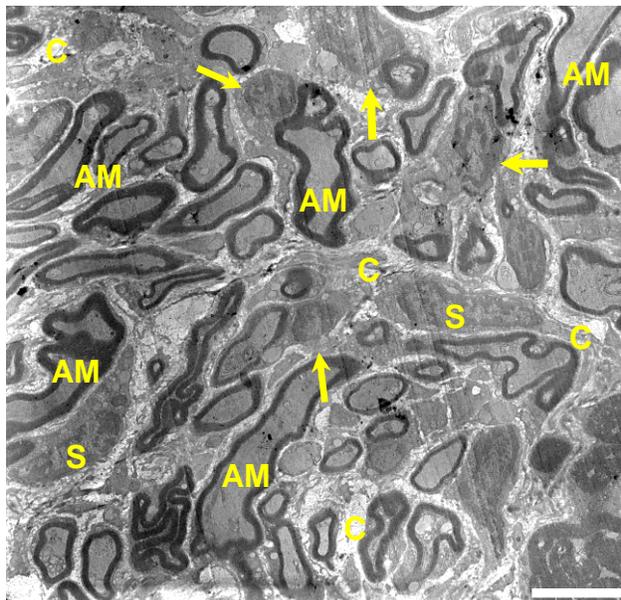
**Barra = 5µm**



**Figura 29. Microfotografía electrónica de nervio ciático derecho de rata del grupo TISSUCOL, cuatro meses después de la transección.**

El número de axones, tanto mielinizados (AM) como sin mielinizar (círculos), aumentó de manera importante comparado con la figura 28. Hay una gran cantidad de tejido conjuntivo (TC). También se puede observar un fibroblasto (asterisco) y dos núcleos de CS (S).

**Barra = 5 $\mu$ m**



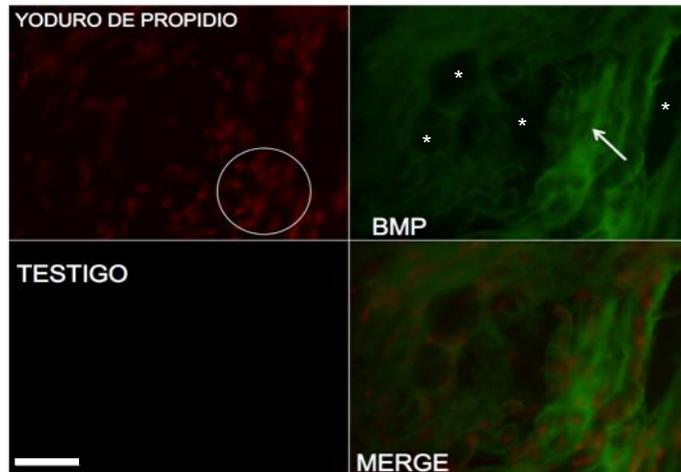
**Figura 30. Microfotografía electrónica de nervio ciático derecho de rata del grupo TRANSPLANTE, cuatro meses después de la transección.**

Se observa una cantidad de axones mielinizados (AM) mucho mayor que en las figuras 28 y 29. Además se pueden distinguir dos tipos celulares: unas tienen núcleo redondo (flechas) y otras núcleo alargado que corresponden a CS (S). Las fibras de colágena (C) tienen una disposición más regular.

**Barra = 5 $\mu$ m**

## 7.6 IF

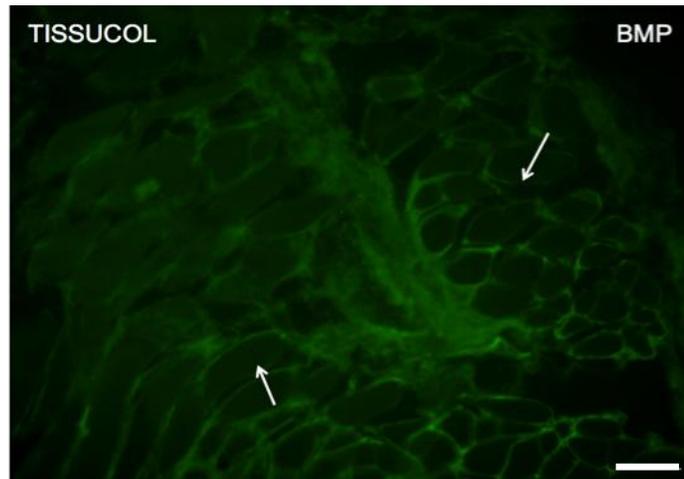
Los cortes de la rata del grupo TESTIGO fueron positivas al inmunomarcaje con BMP (figura 31), y lo que se observó fue que las fibras nerviosas estaban desorganizadas (no alineadas) y también se apreciaron espacios sin tejido, similar a lo observado en los cortes histológicos. Al colocarles YP (figura 31) se tiñó una gran cantidad de núcleos alargados que pudieran corresponder a CS, que también acompañaban a las fibras positivas a BMP.



**Figura 31. Microfotografía de nervio ciático del grupo TESTIGO, cuatro meses después de la transección y marcado con BMP y contrastado con YP.**

Se observan muchos núcleos alargados (círculo) teñidos con YP. Las fibras nerviosas marcadas con BMP (flecha) se encuentran desorganizadas y con espacios sin tejido (asteriscos).

Las laminillas de la rata tratada con Tissucol<sup>®</sup> solo fueron marcadas con BMP (figura 32), y lo que aprecia es como algunos axones comienzan a agruparse y a adquirir una mejor alineación de las fibras nerviosas, disminuyendo los espacios sin tejido.

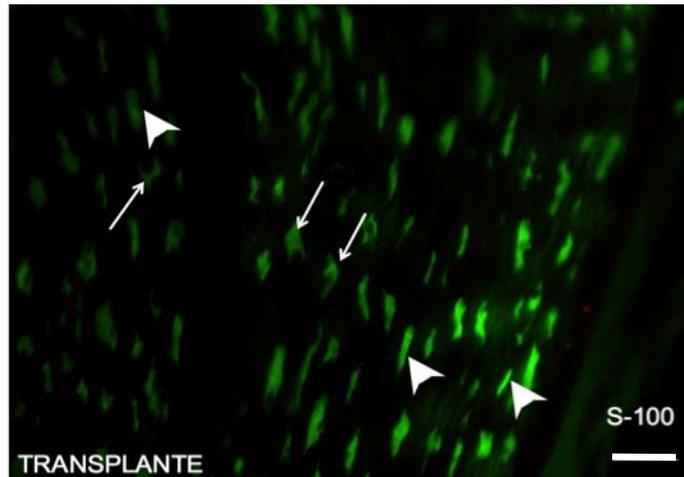


**Figura 32. Microfotografía de nervio ciático del grupo TISSUCOL, cuatro meses después de la reparación y marcado con BMP.**

Las fibras nerviosas (flechas) adquirieron mejor alineación que las del grupo TESTIGO, pero se alcanzan a observar algunos espacios si tejido.

**Barra = 20µm.**

Al marcar con S-100 las laminillas de la rata del grupo TRANSPLANTE (figura 33), se pueden distinguir dos diferentes formas de células. Las primeras son células de forma alargada y regular, mientras que las segundas son células más grandes y de forma irregular. Independientemente de la forma, todas las células se encuentran mejor alineadas en comparación a las que se observaron en las laminillas de los otros dos grupos.



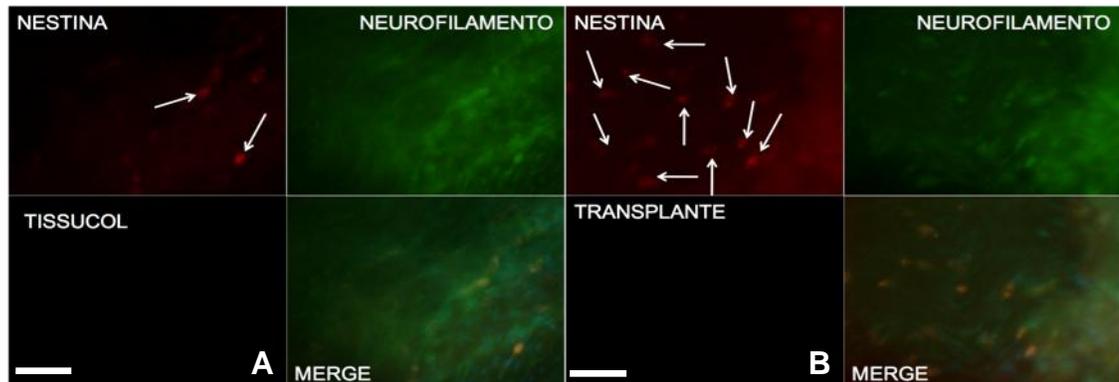
**Figura 33. Microfotografía de nervio ciático del grupo TRANSPLANTE, cuatro meses después de la reparación y marcado con S-100.**

Se alcanzan a distinguir dos formas de células. Las primeras son células alargadas de forma regular (puntas de flecha) y las segundas son células más grandes pero de forma irregular (flechas). Cabe remarcar que todas se encuentran alineadas.

**Barra = 20 $\mu$ m.**

Además de BMP y S-100, las laminillas de las ratas de los grupos TISSUCOL y TRANSPLANTE también se marcaron con Neur y Nest. El Neur mostró que la alineación de las fibras nerviosas de la rata tratada con Tissucol<sup>®</sup> (figura 34A) fue muy parecida a la que mostró al ser marcados con BMP, ya que en ambos casos fue irregular. En las laminillas de la rata del grupo TRANSPLANTE (figura 34B) el Neur mostró que, de los tres grupos, este fue el que presentó la mejor alineación.

En el caso del marcaje con Nest, en el grupo TISSUCOL se observan algunas células que la expresaron, pero en el grupo TRANSPLANTE el número de células marcadas con este anticuerpo fue mayor (figura 34).



**Figura 34. Microfotografías de nervio ciático del grupo TISSUCOL y TRANSPLANTE, cuatro meses después de la reparación y marcados con Nest y Neur.**

**A: TISSUCOL.** Solamente algunas células (flechas) fueron marcadas con Nest, y el Neur mostró una alineación irregular de las fibras nerviosas.

**B: TRANSPLANTE.** La Nest marcó un mayor número de células (flechas) y el Neur mostró que las fibras nerviosas estaban mejor alineadas que las del grupo TISUCOL.

**Barra = 20µm.**

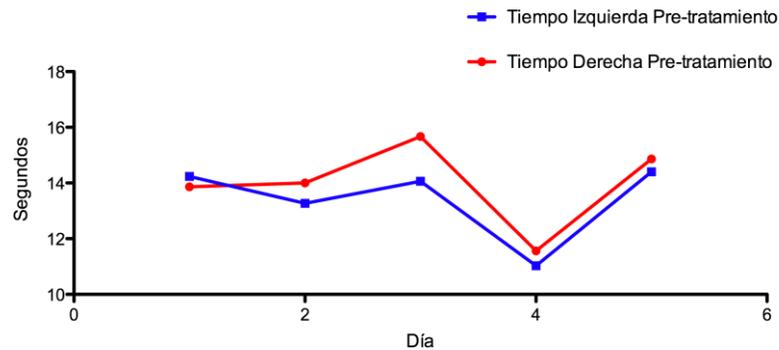
### 7.7 Aestesiómetro

Para conocer cuál era el umbral de sensibilidad del MPD y MPI de cada rata, a los 18 individuos se les hicieron mediciones previas a la cirugía con la intención de conocer si existían diferencias entre los miembros pélvicos de todos ellos, y para tener valores basales que pudieran ser comparados con los obtenidos después de hacerles la transección del nervio ciático derecho.

El valor promedio pre-tratamiento del MPD para fuerza aplicada fue de 34.70 gramos y para tiempo de reacción fue de 13.69 segundos, mientras que en el MPI fueron para fuerza aplicada 33.39 gramos y para tiempo de reacción fue de 13.47 segundos.

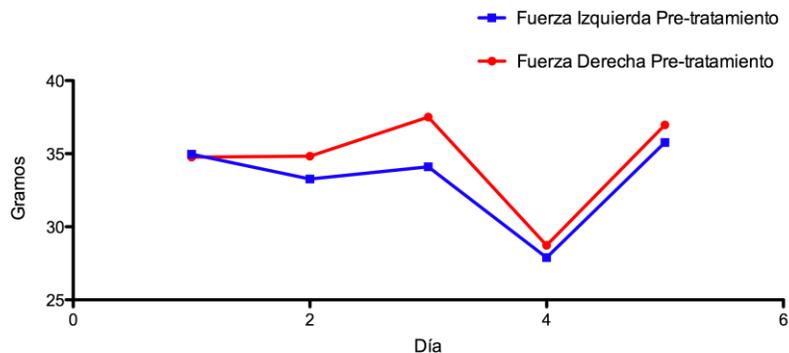
Al comparar los valores basales obtenidos en MPD y MPI de las 18 ratas antes de la cirugía mediante una prueba de ANDEVA, esta determinó que tanto en fuerza aplicada ( $p=0.5404$ ) como en tiempo de reacción ( $p=0.5127$ ) no hubo

diferencia significativa en cuanto a la respuesta obtenida por ambos miembros pélvicos de todas las ratas en todos los grupos (figuras 35 y 36), por lo que se puede decir que existe un paralelismo (sin diferencia) entre los perfiles de ambas patas.



**Figura 35. Perfiles del tiempo de reacción del MPD (n=18) y MPI (n=18) obtenidos antes de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

Lo que se aprecia es como el perfil del MPD y MPI son paralelos entre si ( $p=0.5127$ , ANDEVA), por lo que se puede decir que las respuesta ante el estímulo del aestesiómetro son iguales en ambos miembros pélvicos.



**Figura 36. Perfiles de la fuerza aplicada sobre el MPD (n=18) y MPI (n=18) obtenidos antes de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

Ambos perfiles no muestran diferencias entre si, por lo que puede decir que son paralelos ( $p=0.5404$ , ANDEVA), y que las respuestas ante el estímulo del aestesiómetro son iguales en ambos miembros pélvicos.

Después de que el nervio ciático derecho fue transectado, el tiempo de respuesta ante el estímulo generado por el aestesiómetro y la fuerza aplicada por este sobre el MPD fueron modificados. La transección del nervio provocó que la sensibilidad del MPD quedara alterada, y que el tiempo de respuesta y la fuerza

aplicada sobre él fueran menores en comparación con los valores obtenidos en el MPI (tabla 5).

Los valores post-tratamiento para fuerza aplicada y tiempo de reacción de todos los grupos se muestran en la figura 37, en la cual se puede apreciar una disminución marcada de estas variables en el MPD (con lesión) de los tres grupos comparadas con los datos obtenidos pre-tratamiento. Las respuestas obtenidas en el MPI (sin lesión) no mostraron diferencias significativas en cuanto a la respuesta al estímulo del aestesiómetro, antes y después de realizada la lesión.

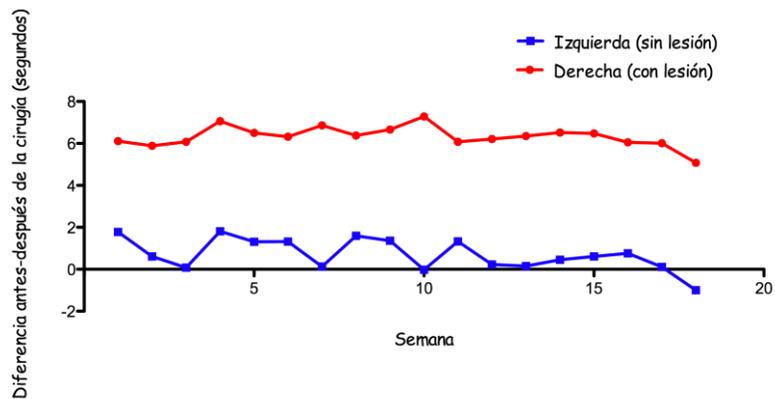
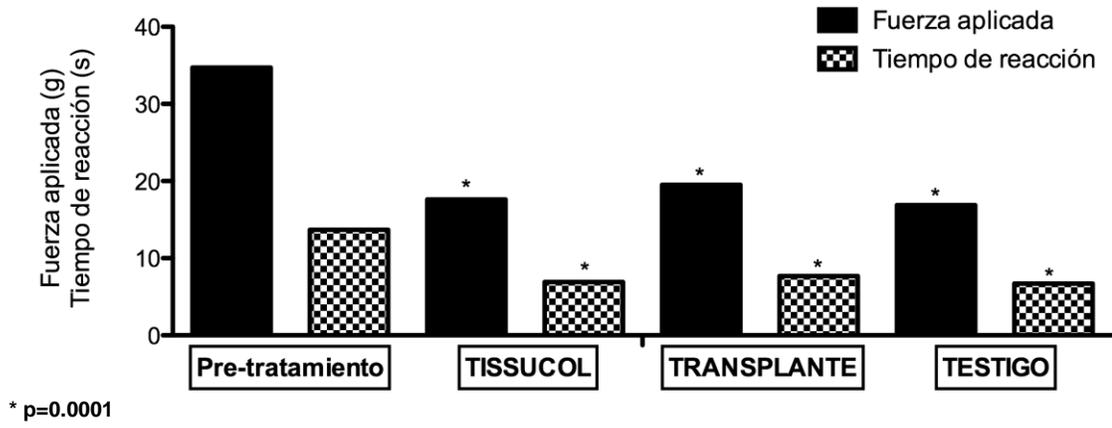
Para determinar si esta diferencia era significativa se realizó una prueba de MANDEVA para mediciones repetidas, en donde el tiempo de respuesta ( $p=0.0001$ ) así como la fuerza aplicada ( $p=0.0001$ ) tuvieron una diferencia altamente significativa entre el MPD y MPI después de realizada la transección del nervio ciático derecho (figuras 38 y 39).

**Tabla 5. Valores para fuerza aplicada (gramos) y tiempo de reacción (segundos) de los tres tratamientos y de las patas derecha e izquierda.**

Lateralidad	Grupos							
	Pre-tratamiento		TISSUCOL		TRANSPLANTE		TESTIGO	
	Fuerza aplicada	Tiempo de reacción						
MPD	34.70	13.69	17.61*	6.92*	19.46*	7.70*	16.90*	6.649*
MPI	33.39	13.47	31.56	12.61	36.42	14.81	31.13	12.40

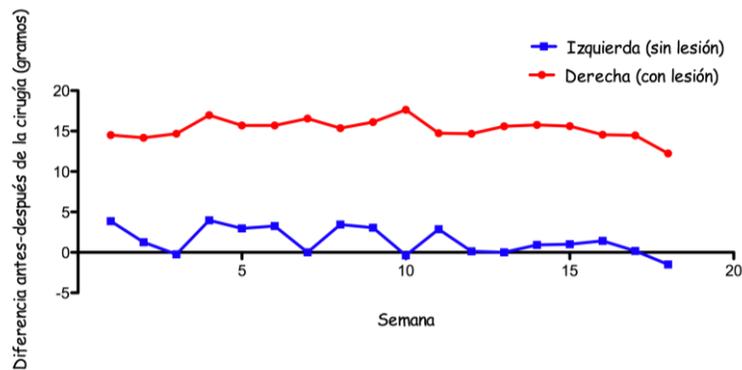
\*  $p=0.0001$

**Figura 37. Valores para fuerza aplicada (gramos) y tiempo de reacción (segundos) de los tres tratamientos y de las patas derecha e izquierda.**



**Figura 38. Perfiles del tiempo de reacción de los MPD (n=14) y MPI (n=14) obtenidos después de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

La gráfica muestra que la diferencia entre antes y después de la cirugía es mucho mayor en el miembro pélvico lesionado que en el miembro pélvico sin lesión ( $p=0.0001$ , MANDEVA).

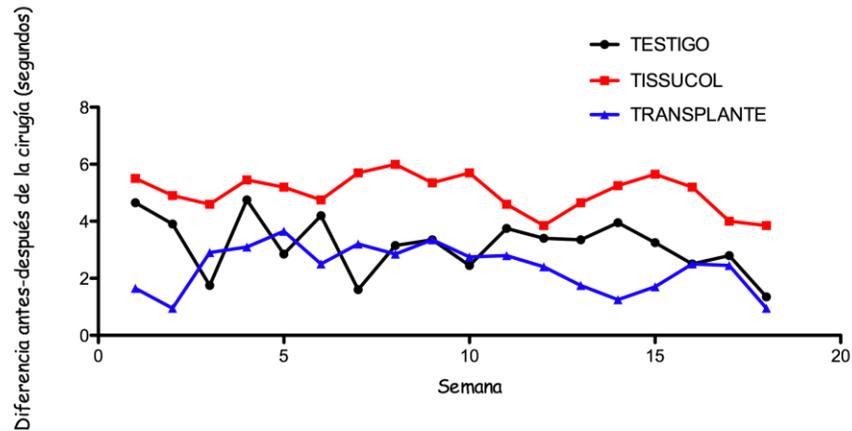


**Figura 39. Perfiles de la fuerza aplicada sobre el MPD (n=14) y MPI (n=14) obtenidos después de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

Al igual que lo que sucedido con el tiempo de reacción, la diferencia fue mayor en el miembro pélvico con lesión ( $p=0.0001$ , MANDEVA) que en el MPI.

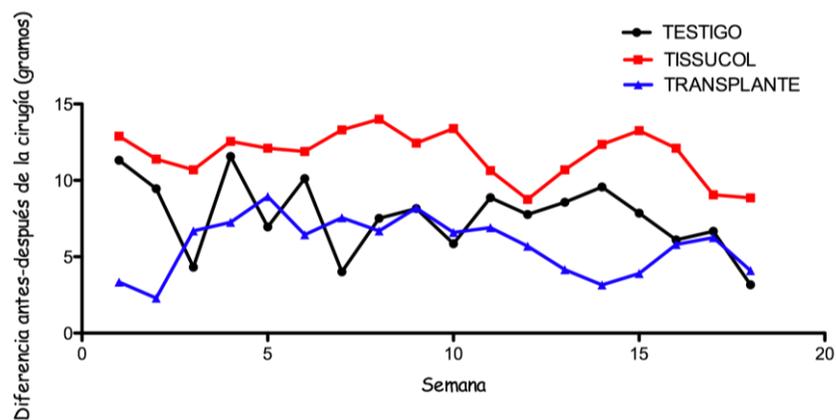
En cuanto a los valores obtenidos en las 18 mediciones después de la transección y aplicación de los tratamientos sobre el nervio ciático derecho en los tres grupos, la misma prueba de MANDEVA para mediciones repetidas determinó que en los tres tratamientos los valores de tiempo de reacción ( $p=0.4565$ ) y de fuerza aplicada ( $p=0.4377$ ) la diferencia no era significativamente diferente entre ellos, desde el inicio hasta el final de las mediciones (figuras 40 y 41).

Es importante señalar que a pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, el que mostró una menor diferencia entre antes y después de la lesión (figuras 40 y 41) fue al que se aplicó la glía envolvente.



**Figura 40. Perfiles del tiempo de reacción sobre el MPD de las ratas de los grupos TESTIGO, TISSUCOL y TRANSPLANTE, obtenidos después de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

El análisis de los perfiles indicó que no existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos ( $p=0.4565$ , MANDEVA).



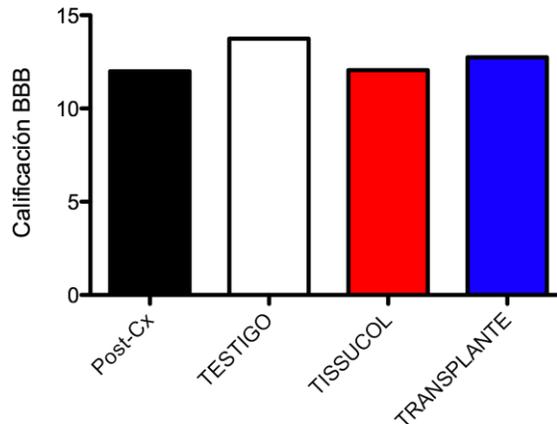
**Figura 24. Perfiles de la fuerza aplicada sobre el MPD de las ratas de los grupos TESTIGO, TISSUCOL y TRANSPLANTE, obtenidos después de realizada la transección del nervio ciático derecho.**

El análisis de los perfiles indicó que no existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos ( $p=0.4565$ , MANDEVA).

### 7.8 Calificación BBB

La calificación basada en la escala BBB de las ratas de los cuatro grupos con lesión en los MPD, se llevó a cabo cuatro meses después de realizada la lesión y los datos se compararon con los obtenidos a los siete días después de haber

hecho la lesión, mismo que en promedio fue de 12. Las diferencias se muestran en la figura 42, en donde se estimaron los promedios obtenidos en la evaluación para cada grupo al final del estudio, los cuales fueron: TESTIGO: 13.7, TISSUCOL: 12, TRANSPLANTE: 12.7. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos al comparar el valor promedio obtenido siete días después de la cirugía y al final del estudio ( $p = 0.2684$ , Kruskal-Wallis).



**Figura 25.** Calificación BBB del MPD de las ratas de los grupos TESTIGO, TISSUCOL y TRANSPLANTE, obtenida cuatro meses después de realizada la transección del nervio ciático derecho.

## 8. Discusión

En el presente trabajo, en el grupo TRANSPLANTE, al cual se le aplicaron PNA incorporados al Tissucol<sup>®</sup>, se observaron los mejores resultados en cuanto a la alineación de las fibras nerviosas, grado de remielinización, disminución de la muerte axonal y recuperación de la sensibilidad, lo cual pudo ser detectado mediante el análisis morfológico en los cortes histológicos, de MET e IF, así como en las pruebas realizadas con el aestesiómetro.

La regeneración axonal después de que un nervio ha sido dañado es un requisito indispensable para la recuperación de la función nerviosa, y muchas de las estrategias que se han utilizado para reparar nervios periféricos dañados comparten el fin común de querer alcanzar una reparación óptima y funcional de esos nervios. Los axones, a pesar de que después de ser dañados, tienen la capacidad de crecer (Ide, 1996) y establecer contacto sináptico con el órgano desnervado, su recuperación generalmente es incompleta (Ramón *et al*, 1998; Gaudet *et al*, 2011), y esta depende de muchos factores, tales como la edad del individuo, del nervio afectado, del sitio y clase de lesión, del tiempo que tarde en llevarse a cabo la reparación quirúrgica, la distancia existente entre un segmento y otro, del número de axones regenerados, de la reinervación de los órganos y del restablecimiento de las propiedades fisiológicas del nervio.

En este trabajo se emplearon dos tratamientos diferentes sobre el sitio de la lesión para promover la regeneración y remielinización axonal de nervios periféricos transectados, y para su aplicación se utilizó una técnica quirúrgica para realizar la transección del nervio ciático derecho en la cual se evitó que los músculos *gluteus maximus* y *biceps femoris* (cercanos al nervio ciático) resultaran lesionados, consiguiendo con esto un sangrado escaso o prácticamente nulo y evitando un proceso inflamatorio adicional, con el fin de favorecer el proceso de reparación y regeneración axonal.

Cuando un nervio es lesionado se pierde de manera parcial o total el funcionamiento motor, sensitivo o autonómico del órgano inervado debido a que las señales que son transmitidas por ese nervio quedan interrumpidas a causa de la pérdida de la continuidad axonal y a la degeneración de las fibras nerviosas distales al sitio de la lesión. Estas deficiencias funcionales pueden ser compensadas por tres mecanismos: reinervación del órgano por regeneración axonal, por colateralización axonal sobre axones sanos vecinos o por remodelación de los circuitos nerviosos involucrados con las funciones afectadas (Navarro *et al*, 2007). Sin embargo, estos mecanismos no son capaces de resolver el problema por sí mismos, especialmente cuando la lesión es demasiado severa.

### *8.1 Inflamación perineural*

En este trabajo en las ratas de los tres grupos se observaron tanto MQ como linfocitos los cuales están presentes de forma característica durante una inflamación crónica (Moalem *et al*, 2004), por lo que este resultado podría indicar que los PNA no fueron un factor que pudiera haber aumentado este proceso inflamatorio, ya que como se mencionó anteriormente una de las características de este tipo celular es que poseen una baja o nula antigenicidad al no expresar los antígenos de transplante del complejo mayor de histocompatibilidad clases I y II (Doncel *et al*, 2009; Nieto & Doncel, 2011). Tal y como sucede con otros tejidos, cuando un nervio llega a sufrir algún tipo de lesión la respuesta inflamatoria no se hace esperar. Un nervio lesionado provoca una gran infiltración y reclutamiento de MQ y una elevada expresión de citocinas proinflamatorias, tales como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) (Marie *et al*, 1996), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Murphy *et al*, 1995, Kiefer *et al*, 1993) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (NTF- $\alpha$ ) (Stoll *et al*, 2002; Misawa *et al*, 2001), las cuales son las responsables de contribuir al daño axonal (Scholz & Woolf, 2007).

## 8.2 Microscopía óptica, MET e IF

La capacidad de regeneración y reinervación de los nervios periféricos se conoce desde hace muchos años, y el tiempo en que inicie la regeneración depende del daño que haya sufrido el nervio. Si la lesión sufrida es leve los procesos regenerativos y de reparación comienzan casi inmediatamente, pero si la lesión es grave la regeneración solo puede iniciar hasta que la DW haya tomado su curso (Burnett & Zager, 2004).

La transección de un nervio periférico conlleva a que se presenten una serie de cambios anatómicos y morfológicos (Stoll & Müller, 1999; Kalmar *et al*, 2003), con el objetivo de generar un ambiente adecuado para la regeneración (Guillen *et al*, 1995). Esta regeneración incluye crecimiento axonal, restablecimiento de los contactos axón-SC, rediferenciación de SC, mielinización axonal y reinervación (Schwartz, 1987). Por otra parte en el segmento proximal comienzan a crecer axones nuevos a nivel de los nodos de Ranvier (Ide, 1996; McQuarrie, 1985; Hall, 2005) y lo hacen abarcando una distancia que va de 1 a 3 mm/día (dependiendo de la especie y el tipo de lesión) (Fu & Gordon, 1997; Fenrich & Gordon, 2004), aunque si no se lleva a cabo una buena aproximación quirúrgica los axones pueden tardar demasiado tiempo en atravesar esa zona de reparación (Brushart *et al*, 2002).

La reparación del nervio lesionado, representada por la alineación de las fibras nerviosas, la cantidad de axones remielinizados y el grado de degeneración, se presentó de distinta manera en los tres grupos, lo cual aparentemente va de la mano con el tratamiento aplicado.

### 8.2.1 Grupo TESTIGO

En el caso de este grupo, el segmento proximal comenzó a crecer tratando de alcanzar al segmento distal y al músculo desnervado, pero desafortunadamente no se pudo cumplir este objetivo. Con esto se confirma que cuando hay una transección completa y no se realiza reparación alguna, la regeneración nerviosa que se presenta es deficiente, incompleta o tarda demasiado tiempo en llevarse a cabo. Esto no significa que la regeneración no se haya llevado a cabo, ya que para que este proceso se lleve a cabo de manera natural, espontánea, completa y sin la ayuda de algún método de reparación pueden pasar muchos meses (Salgado *et al*, 1998), por lo que los cuatro meses de duración de los tratamientos no fueron suficientes como para que se pudieran restablecer los contactos originales y las funciones alteradas por la transección. Como se puede apreciar en los cortes histológicos, de MET y de IF, la transección completa causó un daño demasiado severo. La gran cantidad de fibras de colágena formada por el proceso de cicatrización y la pérdida de tejido nervioso a causa de la actividad de los MQ impidieron que las CS pudieran completar la regeneración, por lo que se podría presumir que la recuperación estructural y funcional en esta clase de lesiones generalmente es pobre debido a que no existen suficientes condiciones adecuadas para que este proceso pueda llegar a buen término (Fu & Gordon, 1997) y a la severidad del daño, por lo que es necesario implementar una técnica de reparación que apoye y agilice la regeneración y remielinización axonal.

### 8.2.2 Grupo TISSUCOL

Las ratas del grupo TISSUCOL se caracterizaron por presentar fibrosis, tejido conjuntivo, adherencias y vasos sanguíneos mucho mayor a la que se observó en el grupo TRANSPLANTE. En este trabajo el Tissucol<sup>®</sup> provocó que en dos ratas de este grupo presentaran una fibrosis muy extensa y severa, y en las otras tres hubo una formación de tejido conjuntivo y adherencias también muy extensa. Uno

de los inconvenientes del Tissucol<sup>®</sup> es que puede penetrar ampliamente entre los segmentos reparados y provocar una reacción de tejido conectivo (Suri *et al*, 2002), tal y como sucedió en el presente estudio. A pesar de que Palazzi (1995) observó que el Tissucol<sup>®</sup> es un sellador que una barrera que pudiera impedir la regeneración axonal, en este experimento no sucedió así ya que la fibrosis tan extensa provocó una compresión muy severa sobre los axones que impidió que pudieran llegar del segmento proximal al distal. Esto último pudiera explicar el por qué los axones que se iban acercando a la zona de la lesión y cicatrización (en donde se encontraba la mayor cantidad de fibras de colágena) trataban pasar de un lado a otro rodeando a la cicatriz y no a través de la misma, ya que al intentar atravesarla se los impidió.

Una vez que el coágulo de fibrina del Tissucol<sup>®</sup> ha cumplido con su cometido, la degradación de este por parte de la fibrinolisina (plasmina) da inicio (Sharma & Sharma, 2007). Como producto de esta fibrinólisis se liberan los fibrinopéptidos A y B (Verstraete *et al*, 1997) los cuales actúan como estimulantes de la angiogénesis (Le Guéhennec *et al*, 2004; MedMarket, 2007). Como resultado de la aplicación de Tissucol<sup>®</sup>, además de la fibrosis provocó el crecimiento de una gran cantidad de vasos sanguíneos a lo largo de todo el nervio, debido a que los productos de la degradación del coágulo de fibrina actúan como promotores de la angiogénesis. Para que la reparación de cualquier tejido se lleve a cabo es necesario un aporte correcto de sangre, pero en estas ratas los vasos sanguíneos que crecieron no tuvieron ninguna clase de ordenamiento ni alineación, pero a diferencia de lo sucedido en el grupo TESTIGO estuvieron presentes en mayor cantidad. Esto podría explicar de alguna manera el por qué las fibras nerviosas, además de poder pasar de un segmento a otro con la ayuda de algunos factores neurotróficos, tuvieron un grado de degeneración menor y la organización de estas fibras fue mejor que el grupo TESTIGO, ya que el riego sanguíneo les proporcionó los nutrimentos necesarios para que esto sucediera de esta manera.

Uno de los efectos del TNF- $\alpha$  y del TGF- $\beta$  generados por la inflamación es el de atraer fibroblastos al sitio de la lesión (Cerezal, 2009), que en conjunto con los efectos propios del Tissucol<sup>®</sup> (angiogénesis y proliferación de fibroblastos; Le Guéhenec *et al*, 2004) pudieron ser los responsables que en este grupo la cantidad de tejido fibroso y conjuntivo fuera superior al de los otros grupos. Existen reportes en donde se menciona que el Tissucol<sup>®</sup> no es capaz de generar efectos adversos (adherencias, fibrosis o reacción a cuerpo extraño) (Jackson, 2001; Júnior *et al*, 2004), y hay otros en donde se ha observado que sucede todo lo contrario (Becker *et al*, 1984, Alving *et al*, 1995, Dunn & Goa, 1999). A pesar de que la utilización de Tissucol<sup>®</sup> para reparar nervios periféricos ha demostrado ser una alternativa ante la aplicación de suturas epineurales (Suri *et al*, 2002) por su capacidad para promover la regeneración axonal (Lucchesi *et al*, 2007; Menovsky & Beek, 2001), un inconveniente de la aplicación de este producto pudiera ser que al no haber algo que controle el crecimiento de las fibras de colágena, fibroblastos y de los vasos sanguíneos, la regeneración axonal pudiera realizarse de manera deficiente, ya que la gran cantidad de vasos sanguíneos podría propiciar el crecimiento en exceso de más fibras colágena y con ello, como se mencionó anteriormente, generar una compresión excesiva sobre los axones que les impida crecer a lo largo de los tubos endoneurales.

### 8.2.3 Grupo TRANSPLANTE

En este trabajo, la combinación de estas células con el Tissucol<sup>®</sup> provocó que los axones conservaran una mejor alineación y que mostraran una tendencia hacia un mayor reordenamiento, así como un mayor crecimiento de las fibras nerviosas y una mejor remielinización en comparación con los otros grupos. Además de tener un efecto claro sobre la regeneración, remielinización y alineación de las fibras nerviosas, los PNA pareciera ser que también tuvieron cierta injerencia para controlar y organizar la angiogénesis y la cicatrización, ya que los individuos tratados con estas células fueron los que presentaron los mejores resultados en

estos rubros. Esto indicaría que los efectos del Tissucol<sup>®</sup> y los PNA fueron complementarios y aditivos, a modo de promover una regeneración axonal más completa y una recuperación funcional en aquellos individuos a los que se les transectó el nervio ciático.

La glía envolvente o aldainoglía (Gudiño & Nieto, 2000), por sus características inmunofenotípicas como la expresión del receptor de baja afinidad para NGF p75 (Gomez *et al*, 1987) y la gran facilidad para ser cultivadas a pesar de provenir del tejido de un individuo adulto (Ramón & Nieto, 1992), tienen la capacidad para dividirse y envolver axones (Ramón *et al*, 1993) y promover la regeneración axonal (Gudiño & Nieto, 1999; Gudiño & Nieto 2000) por lo que se asemejan más a las CS no mielinizantes (Assouline & Pantazis, 1989). Por lo tanto, la combinación Tissucol<sup>®</sup> y PNA parece ser que es una buena alternativa para promover la regeneración axonal de nervios periféricos. Bento y Miniti (1993) reportaron haber observado evidencias electrofisiológicas de regeneración axonal después de haber reparado nervios faciales con un pegamento hecho a base de fibrina; Lucchesi y colaboradores (2007) utilizaron Tissucol<sup>®</sup> para reparar nervios faciales transectados y después de 120 días encontraron un aumento ligero en la cantidad de axones regenerados. Asimismo la utilización de glía envolvente ha demostrado ofrecer buenos resultados cuando son utilizados para reparar, además de lesiones medulares, lesiones de nervio periférico en donde incluso hasta un 50% de los individuos tratados mostraron regeneración axonal (Verdú *et al*, 1999; Radtke *et al*, 2009, Guérout *et al*, 2011), misma que tiene que ver con la capacidad de esta glía de envolver axones y secretar factores neurotróficos, tales como NGF, BDNF, GDNF y CNTF (Lipson *et al*, 2003).

La capacidad de la aldainoglía para envolver axones y promover su regeneración (Gudiño & Nieto, 1999; Gudiño & Nieto, 2000; Ramón & Nieto, 1994, Pascual *et al*, 2002) ha permitido su uso en transplantes a nivel experimental, con el fin de promover su regeneración en lesiones de médula espinal (Polentes *et al*,

2004; Lu *et al*, 2002; Navarro *et al*, 1999; Verdú *et al*, 2001; Li *et al*, 2004b; Caballero *et al*, 2007) y en nervio periférico (Verdú *et al*, 1999; Radtke *et al*, 2009; Guérout *et al*, 2011) en los que se han observado muy buenos resultados, razón por la cual esta práctica tiene un alto potencial para el tratamiento de lesiones nerviosas (Ramón & Nieto, 1994; Navarro *et al*, 1999; López *et al*, 2007; Martino & Pluchino, 2006).

La glía envolvente puede ser reconocida por la expresión de varios marcadores inmunológicos, tales como la Nest y la S-100 (Doncel *et al*, 2009; Gudiño & Nieto, 2000, Heizmann, 1999), y para identificar a las células utilizadas en las ratas del grupo TRANSPLANTE, se utilizaron inmunomarcadores precisamente para S-100 y Nest. Lo que se observó en las laminillas fue que algunas células fueron positivas a estos dos marcadores, lo cual es indicativo de que la glía envolvente fue capaz de sobrevivir durante los cuatro meses que duró el tratamiento y que no provocaron rechazo por parte de los individuos transplantados. En las imágenes de MET también se aprecian células que poseen un núcleo alargado y otras que lo tienen más redondeado. Las primeras corresponden al núcleo de las CS (Mi *et al*, 1995, Aluclu *et al*, 2009) y las otras, por la forma del núcleo, muy probablemente correspondan a células de la glía envolvente transplantada, lo cual se podría confirmar con lo observado en la IF, en donde se observó que una gran cantidad de células expresaron tanto S-100 como Nest.

Además de mantenerse vivas, las células de la glía envolvente adquirieron una alineación que colocalizó con la expresión de BMP, la cual demuestra que las fibras nerviosas mantuvieron una mejor alineación en este grupo, lo cual concuerda con lo observado en la histología y MET, en donde además de esto se observó que la remielinización fue mucho mejor. A pesar de que los segmentos no alcanzaron a unirse, tal parece que los factores neurotróficos y la capacidad de envolver axones, de migrar y atravesar la cicatriz glial por parte de la glía envolvente (Radtke *et al*, 2009) fueron capaces de mantener a las fibras nerviosas

alineadas y favorecer su supervivencia, ya que a diferencia del grupo TISSUCOL, en el que la fibrosis fue severa, parece ser que estas células también fueron las responsables de controlar la fibrosis y el crecimiento de los vasos sanguíneos, con lo que la citoarquitectura del nervio mantuvo un mejor aspecto en comparación con los otros dos grupos.

En el presente trabajo el efecto de los PNA no pudieron ser tan evidentes, tal vez por el hecho de haber realizado la anastomosis de ambos segmentos del nervio (proximal y distal) sin dejar un pequeño espacio entre ellos, tal y como se ha hecho en otros trabajos en los que se ha realizado esta misma clase de lesión (Lloyd *et al*, 2007; Tirelioğlu *et al*, 2006; Verdú *et al*, 1999), ya que de acuerdo con la Teoría de la regeneración nerviosa selectiva cuando existe una lesión en un nervio y existe un pequeño espacio entre ambos segmentos del mismo, las fibras nerviosas motoras y sensitivas encontrarán su contraparte de manera selectiva en el segmento distal (Jiang *et al*, 2006, Jiang *et al*, 2010), con lo que la regeneración de las fibras nerviosas se podría llevarse a cabo de una mejor manera. Quizá si se hubiera utilizado un modelo en donde la transección fuera menos severa (transección parcial o compresión), los efectos de los PNA pudieran haber sido mucho más evidentes sobre la regeneración axonal.

### *8.3 Aestesiómetro*

En el presente trabajo se realizaron mediciones pre-tratamiento con el aestesiómetro plantar para determinar la respuesta basal al estímulo táctil de las patas derecha e izquierda de las ratas. El valor promedio pre-tratamiento del MPD para fuerza aplicada fue de 34.70 gramos y para tiempo de reacción fue de 13.69 segundos, mientras que en el MPI fue de 33.39 gramos para fuerza aplicada y 13.47 segundos para tiempo de reacción. Al analizarlos se demostró que no existió una diferencia significativa en la fuerza aplicada ( $p=0.5404$ , ANDEVA) y en el tiempo de respuesta ( $p=0.5127$ , ANDEVA), tanto entre MPD y MPI de cada una

de las ratas, así como entre todos los individuos de cada grupo. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en trabajos realizados anteriormente, en los que se utilizó el mismo modelo de aestesiómetro y se realizó el mismo procedimiento de medición (Katsura *et al*, 2006; Abdin *et al*, 2006; Gibbs *et al*, 2006). Con estos datos se confirma que los resultados obtenidos después de la transección del nervio ciático derecho pueden ser atribuidos a los cambios generados en el nervio por la lesión, ya que las respuestas tanto en el MPD como en el MPI fueron muy similares antes de la realización de la transección, y solo fueron diferentes hasta después de que se realizó la lesión en el MPD.

Inmediatamente después de la transección del nervio ciático derecho de los animales de los tres grupos, los valores de tiempo de respuesta y de fuerza aplicada fueron menores en el MPD de los tres grupos en comparación con los valores pre-tratamiento, así como con los del MPI pre-tratamiento y post-tratamiento de cada animal, siendo esta una diferencia altamente significativa ( $p=0.0001$ , MANDEVA) para los tres tratamientos. Resultados similares fueron observados por Murata y colaboradores (2005), quienes demostraron que las lesiones en el sistema nervioso periférico son capaces de generar alodinia de tipo mecánico y que esta puede ser medida utilizando un aestesiómetro plantar, ya que al igual que en este trabajo, la respuesta en fuerza aplicada y tiempo de reacción fueron menores al ser comparadas con los valores pre-tratamiento y con los de la pata sin lesión.

Después de una lesión en nervios periféricos, la cuantificación de la respuesta ante un estímulo mecánico puede ofrecer una idea de cuán dañado se encuentran, pero los exámenes estándares tienen el inconveniente de que no proveen una medida confiable de la sensibilidad y dependen en gran medida de la técnica utilizada por el examinador, por lo que tienden a ser subjetivos (Holewski *et al*, 1988). Es por ello que durante los últimos años, la evaluación de la sensibilidad táctil (aesthesimetría) mediante el uso de un aestesiómetro plantar ha

cochado gran auge debido a los buenos resultados obtenidos, pero principalmente se debe a que estos son mucho más exactos y queda de lado el problema de la subjetividad (Villetti *et al*, 2003; Arévalo *et al*, 2003; Ramer *et al*, 2004)

Cuando un nervio es transectado se forma un neuroma, el cual se caracteriza por provocar hipersensibilidad ante estímulos táctiles ligeros, alodinia y dolor espontáneo (Bennett & Xie, 1988). Esto puede explicarse porque se ha observado que cuando un nervio ha sido lesionado algunas fibras aferentes permanecen inervando la piel, y los factores liberados por ellas inducen a las fibras eferentes simpáticas a crecer y a extenderse sobre diferentes áreas de la piel (Yen *et al*, 2006). También estos factores son capaces de promover en los nociceptores la expresión de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, lo que podría generar que la liberación de noradrenalina por parte de las terminales simpáticas activen estos nociceptores y que pueda llegar a haber sensaciones de dolor. Junto con estas alteraciones, se ha observado además que posteriormente a una lesión se desencadena una serie de cambios, tales como un incremento en la actividad espontánea de las fibras sensoriales mielinizadas (principalmente en nervios con DW) (Boucher *et al*, 2000) y una disminución en el umbral de sensibilidad (Laird & Bennett, 1993).

Aunado a esto existe una alteración en la expresión de canales dependientes de voltaje para sodio (England *et al*, 1998; Campbell, 2006; Pitcher & Henry, 2000; Boucher *et al*, 2000) potasio y calcio, así como de su función (Navarro *et al*, 2007; Li *et al*, 2004a) por lo que estas neuronas podrían volverse hiperexcitables, generar despolarizaciones ectópicas y desarrollar alodinia (Devor, 2006; Black, 1999; Newton *et al*, 2001). Además, el incremento de citocinas proinflamatorias puede provocar hiperexcitabilidad en la zona afectada al estimular directamente a las terminales nociceptivas (Zhuo *et al*, 2011; Marchand *et al*, 2005).

Con respecto a los valores de sensibilidad obtenidos a lo largo de los cuatro meses de duración de los tratamientos, se observó que en los valores de tiempo

de reacción ( $p=0.4565$ , MANDEVA) y fuerza aplicada ( $p=0.4377$ , MANDEVA) no se detectaron diferencias significativas entre los tres tratamientos. Sin embargo, a pesar de que existe variación en los valores de sensibilidad, se alcanza a distinguir una ligera tendencia hacia la recuperación de la sensibilidad por parte del grupo TRANSPLANTE, la cual es presentada en las gráficas y concuerda con los hallazgos macro y microscópicos de los nervios. Las ratas de este grupo presentaron una menor diferencia entre los valores de sensibilidad antes y después de la lesión, es decir, los resultados indican que la sensibilidad del MPD se acercó más a los valores presentados antes de la lesión, lo cual implica que quizá se comenzaba a dar la recuperación de la sensibilidad. Al observar la conformación del nervio de manera macroscópica este tenía un aspecto muy similar al del nervio sano, y microscópicamente se observó que el grado de degeneración que presentó fue menos marcada en comparación con los otros dos grupos. Aunque se ha observado en modelos de lesión de médula espinal un incremento en la sensibilidad táctil al transplantarles glía envolvente de bulbo olfatorio medida con un aestesiómetro (Verdú *et al*, 2003; López *et al*, 2004), no se encontraron en la literatura trabajos en los que se haya medido la sensibilidad de manera similar a la realizada en este trabajo ni con esta clase de modelo experimental. Basado en esto, se podría pensar que los resultados de sensibilidad del grupo tratado con PNA tienen una ligera tendencia hacia la recuperación de la sensibilidad con respecto a los otros dos grupos y que, después del tratamiento, la estructura, sensibilidad y función se acercaran a los obtenidos antes de la transección.

Esta situación probablemente se presentó de esta manera debido a que el número de repeticiones no fue lo suficientemente representativo para poder hacer a las pruebas más sensibles, y que de esta manera pudieran detectar las posibles diferencias entre los tres tratamientos. El total de animales utilizados en este trabajo fue de 14 animales, mientras que el método de Tang (Kuehl, 2001; Gill, 1978) sugiere que, con un nivel de significancia de 0.05, se utilice un mínimo de

20 animales por grupo. Por ejemplo, en un estudio para probar el funcionamiento del nervio ciático después de haber sido lesionado (Baptista *et al*, 2007) utilizó un total de 63 (tres grupos de 21 animales cada uno) a los cuales se seccionó una porción del nervio. En otro trabajo en donde se observaron los desórdenes provocados por una neuropatía (Bennet & Xie, 1988) utilizaron 148 ratas para este estudio, a las que se les hizo una ligadura en el nervio ciático. Por último, Lee y colaboradores (2000) utilizaron 51 ratas para estudiar la alodinia provocada sobre ramas del nervio ciático.

Existen otro tipo de pruebas para determinar los cambios funcionales en el modelo de transección de nervio ciático, como es la impresión plantar descrita por Medinaceli y colaboradores (1982) y Radtke y colaboradores (2009), la cual a través de la determinación del Índice funcional ciático puede dar una idea de la recuperación funcional del miembro afectado después de lesionar el nervio. La utilización de pruebas complementarias podría contribuir a la interpretación de los cambios funcionales debidos al tratamiento.

#### *8.4 Calificación BBB*

La calificación BBB hecha a los siete días post-cirugía fue de 13 para todos los animales, mientras que los obtenidos al final del estudio mostraron tener una gran variación en cuanto a la valoración de la funcionalidad motora, es decir, independientemente del tipo de tratamiento que se les aplicó no se observó tendencia alguna hacia una recuperación o un empeoramiento en el desplazamiento y movimiento del MPD. Pero es importante señalar que los individuos del grupo TESTIGO y TISUCCOL tuvieron una menor incidencia de autotomía (20%), mientras que en los del grupo TRANSPLANTE el 80% de ellos presentaron autotomía. A pesar de que el análisis estadístico no mostró diferencias en el grado de sensibilidad, estos resultados podrían indicar una tendencia hacia la recuperación de la sensibilidad y estar relacionados con el

grado de regeneración axonal, ya que hubo más individuos que presentaron autotomía en el grupo tratado con PNA.

La presencia de autotomía ha sido relacionada a la presencia de neuromas que generan actividad espontánea del nervio e incrementan la sensibilidad táctil, creando sensaciones dolorosas en los individuos (Seltzer *et al*, 1989). En los modelos murinos diseñados para conocer las consecuencias de la axotomía, se ha propuesto que la presentación de autotomía es un comportamiento que tiene como objetivo eliminar los estímulos dolorosos presentes en el miembro afectado (Wall *et al*, 1979a), por lo que los individuos afectados con esta clase de lesiones tratan de apoyar lo menos posible esa pata al tener incrementada su sensibilidad. Al comparar la calificación BBB de los tres grupos tampoco se encontraron diferencias ( $p=0.2684$ , Kruskal-Wallis).

El NGF, además de favorecer el desarrollo y regeneración de las fibras nerviosas (Lykissas *et al*, 2007), también se le ha asociado con la inflamación y la presencia de dolor (Casals *et al*, 2009; Ji *et al*, 2002; Griffis, 2011; Veronesi & Oortgiesen, 2006; Lindholm *et al*, 1987). El hecho de que después de la transección las CS secreten grandes cantidades de NGF (Fenrich & Gordon, 2004) y que los PNA también lo produzcan (Lipson *et al*, 2003), podría dar una explicación del por qué en los individuos del grupo TRANSPLANTE la autotomía se presentó en un mayor porcentaje, por lo cual este comportamiento podría asociarse con un incremento en la producción de NGF y consecuentemente de la regeneración nerviosa (Casals *et al*, 2009; Minert *et al*, 2007).

## 9. CONCLUSIONES

- En este modelo, la combinación de glía envolvente incorporada al Tissucol® fue la que mejores resultados ofreció en cuanto a alineación de fibras nerviosas, remielinización, recuperación de la sensibilidad y disminución de la muerte axonal.
- Se encontró una tendencia hacia la promoción de la reparación de los nervios periféricos lesionados, mejorando algunos aspectos relacionados con la regeneración de las fibras sensitivas y motoras.
- La combinación de varias técnicas de reparación (grupo TRANSPLANTE) es más eficaz que la utilización de solamente una (grupo TISSUCOL) o que no aplicar nada (grupo TRANSPLANTE).
- En este modelo y por el tiempo de prueba del ensayo, se demostró que el órgano desnervado a pesar de que aparentemente recupere la inervación, no quiere decir que se recuperen las funciones motoras y sensitivas de manera similar a las que tenía antes de la lesión del nervio.
- Actualmente no existe técnica de reparación alguna que ofrezca una recuperación de las funciones sensitivas y motoras normales por lo que es necesario seguir buscando alternativas que ofrezcan una buena recuperación de la función nerviosa.

## 10. Bibliografía.

Aarum J, Sandberg K, Budd S, Persson M. Migration and differentiation of neural precursors cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100:15983-8.

Abdin J, Morioka N, Morita K, Kitayama T, Kitayama S, Nakashima T, Dohi T. Analgesic action of nicotine on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord. *Life Sciences* (2006) 80:9-16.

Acheson A, Barker P, Alderson F, Miller F, Murphy R. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblast and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* (1991) 7:265-75.

Aluclu M, Tuncer M, Guzel A, Aluclu A, Akkus M. The effects of valproic acid on sciatic nerve of fetal rats and protective effects of folic acid and vitamin E. *Int J Morphol* (2009) 27:285-94.

Alvarez A, García J, Tramontin A. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neuro* (2001) 2:287-93.

Alvarez A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* (2002) 57:751-58.

Alving B, Weinstein M, Finlayson J, Menitove J, Fratantoni J. Fibrin sealant: a summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion* (1995) 35:783-90.

Ard M. Comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth. *J Neurocytol* (1987) 16:539-55.

Arévalo M, Escribano E, Calpena A, Domenech J, Queralt J. Thermal hyperalgesia and light touch allodynia after intradermal *Mycobacterium butyricum* administration in rat. *Inflammation* (2003) 27:293-9.

Assouline J & Pantazis N. Detection of a nerve growth factor receptor on fetal human Schwann cell in culture: absence of the receptor on fetal human astrocytes. *Dev Brain Res* (1989) 45:1-14.

Atrah H. Fibrin glue: Topical haemostasis for areas of bleeding large and small. *BMJ* (1994) 308:933-4.

Bain J, Veltri K, Chamberlain D, Fahnestock M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervations. *Neurosci* (2001) 103:503-10.

Baptista A, de Souza J, Texeira J, Moreira S, Vannier M, Blanco A. A new approach to asses function after sciatic nerve lesion in the mouse-adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Methods* (2007) 161:259-64.

Basso D, Beattie M, Bresnahan J. A sensitive and reliable locomotor rating scale for openfield testing in rats. *J Neurotrauma* (1995) 12:1-21.

Beckert C, Gueuning C, Graff G. Sutures of fibrin glue for divided rat nerves. Schwann cell and muscle metabolism. *J Reconstr Microsurg* (1984) 1:139-45.

Belkas J, Shoichet M, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res* (2004) 26:151-60.

Bennett G & Xie Y. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seem in man. *Pain* (1988) 33:87-107.

Bento R & Miniti A. Anastomosis of the intratemporal facial nerve using fibrin tissue adhesive. *Ear Nose Throat J* (1993) 72:663.

Black J, Cummins T, Plumpton C, Chen Y, Hozmurdian W, Clare J, Waxman S. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* (1999) 82:2776-85.

Boucher T, Okuse K, Bennett D, Munson J, Wood J, McMahon S. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science* (2000) 290:124-7.

Bozorg A, Mosnier I, Julien N, El Garem H, Bouccara D, Stekers O. Long-term functional outcome in facial nerve graft by fibrin glue in the temporal bone and cerebellopontine angle. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2005) 262:404-7.

Bozzola J & Russell L. *Electron microscopy: principles and techniques for biologist*, Second Edition. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1999.

Bruns S, Stark Y, Röcker S, Wieland M, Dräger G, Kirschning A, Stahl F, Kasper C, Scheper T. Collagen biomaterial doped with chondroitin sulfate for cell culture applications with regard to peripheral nerve repair. *J Biotechnol* (2007) 131:335-45.

Bruns S, Stark Y, Wieland M, Stahl F, Kasper C, Scheper T. Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering: a model for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A* (2006) 81:736-47.

Brushart T, Hoffman P, Royall M, Murinson B, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* (2002) 22:6631-8.

Burnett M & Zager E. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* (2004) 16:1-7.

Caballero S, Cedillo C, Doncel E, Nieto M. Uso de puentes a base de la matriz biocompatible Tissucol, en modelos de transección completa en médula espinal en rata. Cambios inmunohistoquímicos y ultraestructurales. Memoria científica del IV Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia". León Guanajuato, México, 2007, pag. ISBN 978-969-9241-03-4.

Campbell J, Meyer R. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* (2006) 52:77-92.

Campbell W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* (2008) 119:1951-65.

Carrillo N. Expresión *in vitro* de las isoformas del mRNA de la proteína glial fibrilar ácida durante la diferenciación de precursores neurales a glía (Tesis de Maestría). Guadalajara (Jalisco) México: Universidad de Guadalajara, 2006.

Carson F. Histotechnology: a self-instructional text, Second edition. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, USA. ASCP Press, 1997.

Casals L, Vivó M, Navarro X. Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic models induced by sciatic nerve injury in the rat. *Exp Neurol* (2009) 217:84-95.

Castellanos, R. Efecto de la colágeno polivinil pilorridona y del pegamento de fibrina sobre la reinervación del nervio laríngeo recurrente (Tesis de especialidad) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.

Cerezal L. Valoración histopatológica de la aplicación de sustancias sellantes en lesiones traqueales. Estudio experimental (Tesis de Doctorado). Valladolid (Valladolid) España: Universidad de Valladolid (2009).

Chace E. Anatomy of the rat. Hafner publishing company (1963) New York and London.

Ciccolini F & Svendsen C. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci* (1998) 18:7869-80.

Cross P & Mercer L. Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective, Second Edition. New York Press, 1993.

Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface* (2012) 9:202-21.

Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* (2006) 7:S3-S12.

Dombrowski M, Sasaki M, Lankford K, Kocsis J, Radtke C. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. *Brain Res* (2006) 1125:1-8.

Doncel E, Caballero S, Nieto M. Neurosphere cell differentiation to aldynoglia promoted by olfactory ensheathing cell conditioned medium. *Glia* (2009) 57:1393-1409.

Ducoing A. Introducción a la estadística. 1<sup>er</sup> ed. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2009.

Dubový P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat* (2011) 93:267-75.

Dunn C & Goa K. Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. *Drugs* (1999) 58:863-86.

Edshage S. Peripheral nerve suture. A technique for improved intraneural topography evaluation of some suture materials. *Acta Chir Scand Suppl* (1964) 15:331:1.

Eng L & Rubinstein L. Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* (1978) 26:513-22.

England J, Happel L, Liu Z, Thouron C, Kline D. Abnormal distributions of potassium channels in human neuromas. *Neurosci Lett* (1998) 255:37-40.

Eto K, Tokunaga H, Nagashima K, Takeuchi T. An autopsy case of minamata disease (methylmercury poisoning) - pathological viewpoints of peripheral nerves. *Toxicol Pathol* (2002) 30:714-22.

Fenrich K & Gordon T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous system - Current issues and advances. *Can J Neurol Sci* (2004) 31:142-56.

Fisher L. Neural Precursor Cells: Applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol Dis* (1997) 4:1-22.

Fossum T. Small animal surgery. 3<sup>rd</sup> Edition. St. Louis, Missouri, 2007.

Fried K, Govrin R, Rosenthal F, Ellisman M, Devor M. Ultrastructure of afferent endings of neuroma. *J Neurocytol* (1991) 20:682-701.

Fu S & Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* (1997) 14:67-116.

Galbraith J & Gallant P. Axonal transport of tubulin and actin. *J Neurocytol* (2000) 29:889-911.

Gaudet A, Popovich P, Ramer M. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* (2011) 8:110.

George E, Glass J, Griffin J. Axotomy - induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* (1995) 15:6445-52.

Gibbs J, Flores C, Hargreaves H. Attenuation of capsaicin - evoked mechanical allodynia by peripheral neuropeptide Y Y<sub>1</sub> receptors. *Pain* (2006) 124:167-74.

Giddins G, Birch R. Peripheral nerve injuries. In: Foy M, Fagg P, editors. *Medicolegal reporting in orthopaedic trauma*. London: Churchill Livingstone (2002) 451-69.

Gill J. *Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences*. Iowa: Iowa State University Press, 1978.

Gillingwater T, Ribchester R. Compartmental neurodegeneration and synaptic plasticity in the WLDs mutant mouse. *J Physiol* (2001) 534:627-39.

Glass J, Culver D, Levey A, Nash N. Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Sci* (2002) 196:9-20.

Glass J, Brushart T, George E, Griffin J. Prolonged survival of transected nerve fibers in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J Neurocytol* (1993) 22:311-21.

Gomes F, Paulin D, Moura V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* (1999) 32:619-31.

Gomez F, Cotman C, Nieto M. NGF receptor immunoreactivity in rat brain: topographic distribution and response to entorhinal ablation. *Neurosci Lett* (1987) 82:260-6.

Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus* (2009) 26:E3.

Griffis C. Neuroimmune activation and chronic pain. *AANA J* (2011) 79:31-7.

Gudiño G & Nieto M. Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann cell-like brain microglia. *J Neurobiol* (1999) 40:458-70.

Gudiño G & Nieto M. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia* (2000) 30:49-63.

Guérout N, Paviot A, Bon N, Duclos C, Genty D, Jean L, Boyer O, Marie J. Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion. *PLoS One* (2011) 6:e22816.

Guillen C, Gleichmann M, Spreyer P, Müller H. Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. *J Neurosci Res* (1995) 42:159-71.

Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg* (2005) 87:1309-19.

Hamilton S, Hinkle M, Nicolini J, Rambo L, Rexwinkle A, Rose S, Sabatier M, Backus D, English A. Misdirection of regenerating axons and functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *J Comp Neurol* (2011) 519:21-33.

Heizmann C.  $Ca^{2+}$  - binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res* (1999) 24:1097-1100.

Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* (1987) 104:1623-31.

Höke A. Mechanism of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nature Clinical Practice Neurology* (2006) 2:448-54.

Holewski J, Stess M, Graf P, Grunfeld C. Aesthesiometry: quantification of cutaneous pressure sensation in diabetic peripheral neuropathy. *J Rehabil Res Dev* (1988) 25:1-10.

Hsu S-H, Seng P, Ni HC, Su CH. Fabrication and evaluation of microgrooved polymers as peripheral nerve conduits. *Biomed Microdevices* (2007) 9:655-74.

Huang TC, Blanks RH, Berns MW, et al. Laser vs. suture nerve anastomosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* (1992) 107:14–20.

Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* (1996) 25:101-21.

Jackson M. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg* (2001) 182:1S-7S.

Jensen D. Fisiología de la conducción de impulsos en los nervios y en otros tejidos. In: Jensen D, editor. *Fisiología*. México: Interamericana, 1979:153-160.

Ji R, Samad T, Jin S, Schmoll R, Woolf C. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* (2002) 36:57-68.

Jiang B, Zhang P, Jiang B. Advances in small gap sleeve bridging peripheral nerve injury. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol* (2010) 38:1-4

Jiang B, Zhang P, Zhang D, Fu Z, Yin X, Zhang H. Study on small gap sleeve bridging peripheral nerve injury. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol* (2006) 34:55-74

Jubran M & Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neur* (2003) 181:204-12.

Júnior E, Valmaseda E, Gay C. Fascial nerve repair with epineural suture and anastomosis using fibrin adhesive: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* (2004) 62:1524-29

Kalmar B, Greensmith L, Malcangio M, McMahon S, Csermely P, Burnstock G. The effect of treatment BRX - 220, a co-inducer of heat shock proteins, on sensory fibers of the rat following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* (2003) 184:636-47.

Katsura H, Obata K, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T. Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *J Neurosci* (2006) 26:8680-90.

Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg G. Interleukin - 6 and transforming growth factor - beta 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* (1993) 5:775-81.

Kotulska K, Marcol W, Larysz M, Tendera S, Malinowska I, Ślusarczyk W, Jędrzejowska H, Lewin J. Effect of oblique nerve grafting on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery* (2006) 26:579-84.

Krarup C, Archibald S, Madison R. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol* (2002) 51:69-81.

Kuehl R. *Diseño de experimentos*. México: Thompson Learning, 2001.

Kurek J, Austin L, Cheema S, Bartlett P, Murphy M. Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromusc Disord* (1996) 6:105-14.

Laird J & Bennett G. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* (1993) 69:2072-85.

Landegren T, Risling M, Persson J. Local tissue reactions after nerve repair with ethyl-cyanoacrylate compared with epineural sutures. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* (2007) 41:217-27.

Layden B, Joseph M, Tallman M, Platanius L. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with chronic cyanoacrylate exposure. *Acta Haematol* (2007) 118:242-3.

Leblanc A & Poduslo J. Axonal modulation of myelin gene-expression in the peripheral nerve. *J Neurosci* (1990) 26:317-26.

Lee B, Won R, Baik E, Lee S, Moon C. An animal model of neurophatic pain employing injury of the sciatic nerve branches. *Neuroreport* (2000) 11:657-61.

Lee S & Wolf S. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* (2000) 8:243-52

Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mat* (2004) 8:1-10.

Li C, Song Y, Higuera E, Luo Z. Spinal dorsal horn calcium channel  $\alpha_2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* (2004a) 24:8494-9.

Li C, Carlstedt T, Berthold C, Raisman G. Interaction of transplanted olfactory ensheathing cells and host astrocytic processes provides a bridge for axons to regenerate across the dorsal root entry zone. *Exp Neurol* (2004b) 188:300-8.

Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* (1987) 330:123-32.

Lipson A, Widenfalk J, Lindqvist E, Ebendal T, Olson L. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp Neurol* (2003) 180:167-71.

Liss A, af Ekenstam F, Wiberg M. Loss of neurons in the dorsal root ganglia after transection of a sensory peripheral nerve. An anatomical study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* (1996) 30:1-6.

Liu H, Yang L, Yang Y. Schwann cell properties: 3.C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J Neuropathol* (1995) 54:487-96.

Lloyd B, Luginbuhl R, Brenner M, Rocque B, Tung T, Myckatyn T, Hunter D, Mackinnon S, Borschel G. Use of motor nerve material in peripheral nerve repair with conduits. *Microsurgery* (2007) 27:138-45.

López R, Forés J, Navarro X, Verdú E. Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat. *Glia* (2007) 55:303-11.

López R, García G, Forés J, Navarro X, Verdú E. Increased expression of cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in lesioned spinal cord by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurotrauma* (2004) 21:1031-43.

Lu J, Féron F, Mackay A, Waite P. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* (2002) 125:14-21.

Lucchesi F, Dorado E, Gay C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Rev Bras Otorrinolaringol* (2007) 73:196-201.

Lundborg G. Enhancing post-traumatic nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* (2002) 7:139-40.

Lundborg G. *Nerve injury and repair*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2004.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop Scand* (1987) 58:145-69.

Lundborg G, Longo F, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors *in vivo*. *Brain Res* (1982) 232:157-61.

Lundborg G & Rosén B. Sensory relearning after nerve repair. *Lancet* (2001) 358:809-10.

Lykissas M, Batistatou A, Charalabopoulos K, Beris A. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance and regeneration. *Curr Neurovasc Res* (2007) 4:143-51.

Ma J, Novikov L, Kellerth J, Wiberg M. Early nerve repair after injury to the postganglionic plexus: an experimental study of sensory and motor neuronal survival in adult rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* (2003) 37:1-9.

Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at the site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorraphy: evaluation by walking-track measurement, electrophysiology, histomorphometry and electron probe X-ray microanalysis. *Microsurg* (1999) 19:200-7.

Manthorpe M, Skaper S, Williams L, Varon S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor. *Brain Res* (1986) 367:282-6.

Marchand F, Perreti M, McMahon S. Role of immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* (2005) 6:521-32.

Martino G & Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* (2006) 7:395-406.

Martins R, Siqueira M, Ferreira C, Ortiz B, Pereira J. Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr* (2005) 63:601-4.

Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon J. Regulation by antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGF $\beta$ ) of interleukin-8 production by LPS and/or TNF $\alpha$ -activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm* (1996) 5:334-40.

McQuarrie I. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation at Nodes of Ranvier. *J Comp Neurol* (1985) 231:239-59.

McQuarrie I & Lasek R. Transport of cytoskeletal elements from parents axons into regenerating daughter axons. *J Neurosci* (1989) 9:436-46.

Medinaceli L, Freed W, Wyatt R. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* (1982) 77:634-43.

MedMarket Diligence. Worldwide surgical sealants, glues and wound closure market. Report #S145 (2007).

Menovsky T & Beek J. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg* (2001) 95:694-99.

Merskey H. Pain terms: a supplementary note. *Pain* (1982) 14:205-6.

Mi H, Deerinck T, Ellisman M, Schwarz T. Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells. *J Neurosci* (1995) 15:3761-64.

Minert A, Gabay E, Dominguez E, Wiesenfeld Z, Devor M. Spontaneous pain following spinal nerve injury in mice. *Exp Neurol* (2007) 206:220-30.

Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Hattori T. Serum levels of tumor necrosis factor - alpha in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* (2001) 56:666-69.

Mizushima T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Mashimo T, Noguchi K. Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia. *Pain* (2005) 113:51-60.

Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neurosci* (2004) 129:767-77.

Morrison D. *Multivariate Statistical Methods*, First edition. United States of America: McGraw-Hill, Inc. (1967).

Murata Y, Olmarker K, Takahashi I, Takahashi K, Rydevik B. Effects of selective tumor necrosis factor - alpha inhibition on pain - behavioral changes caused by nucleus

pulposus induced damage to the spinal nerve in rats. *Neurosci Letters* (2005) 382:148-52.

Murrel W, Weitzig A, Donnellan M, Féron F, Burne T, Meedeniya A, Kesby J, Bianco J, Perry C, Silburn P, Mackay A. Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. *Stem Cells* (2008) 26:2183-92.

Murphy P, Grondin J, Altares M, Richardson P. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* (1995) 15:5130-8.

Navarro X, Valero A, Gudiño G, Forés J, Rodríguez F, Verdú E, Pascual R, Cuadras J, Nieto M. Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Anat* (1999) 45:207-15.

Navarro X, Vivó M, Valero A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* (2007) 82:163-201.

Newman W. *Dorland's pocket medical dictionary: abridged from Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.

Newton R, Bingham S, Case P, Sanger G, Lawson S. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Mol Brain Res* (2001) 95:1-8.

Nichols C, Brenner M, Fox I, Tung T, Hunter D, Rickman S, Mackinnon S. Effect of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* (2004) 190:347-55.

Nieke J & Schachner M. Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM and their common carbohydrate epitope L2/HNK-1 during development and after transection of the mouse sciatic nerve. *Differentiation* (1985) 30:141-51.

Nieto M & Doncel E. Glía promotora del crecimiento derivada de células madre neurales: un instrumento de reparación del trauma medular. (2011) En prensa.

Olmos R, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M, Cedillo I, Argote M, Santillan P. Suture line reinforcement with glutaraldehyde preserved bovine pericardium for non-anatomic resection of lung tissue. *J Invest Surg* (2001) 14:161-8.

Pabari A, Yang S, Mosahebi A, Seifalian A. Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers. *J Control Release* (2011) 156:2-10

Palazzi S, Vila J, Lorenzo J. Fibrin glue is a sealant and not a nerve barrier. *J Reconstr Microsurg* (1995) 11:135-9.

Pascual J, Gudiño C, Insausti R, Nieto M. Spinal implants of olfactory ensheathing cells promote axonal regeneration and bladder activity after bilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J Urol* (2002) 167:1522-6.

Perry V, Brown M, Lunn E, Tree P, Gordon S. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is an intrinsic property of the peripheral nerve. *Eur J Neurosci* (1990) 2:802-8.

Petter A, Froetscher W, Krametter R, Lorinson D, Redl H, van Griensven M. The long-term neurocompatibility of human fibrin sealant and equine collagen as biomatrices in experimental spinal cord injury. *Exp Toxicol Pathol* (2007) 58:237-45.

Pitcher G & Henry J. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci* (2000) 12:2006-20.

Plumb D. *Veterinary Drug Handbook, Fourth Edition*. United States of America: Pharma Vet Publishing (2002) 4, 385.

Polentes J, Stamegna J, Nieto M, Gauthier P. Phrenic rehabilitation and diaphragm recovery after cervical injury and transplantation of olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* (2004) 16:638-53.

Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobón L. *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.

Qiu J, Cai D, Filbin M. Glial inhibition of nerve regeneration in mature mammalian CNS. *Glia* (2000) 29:166-74.

Radtke C, Aizer A, Agulian S, Lankford K, Vogt P, Kocsis J. Transplantation of olfactory ensheathing cells enhances peripheral nerve regeneration after microsurgical nerve repair. *Brain Res* (2009) 1254:10-7.

Ramer L, Borisoff J, Ramer M. Rho-kinase inhibition enhances axonal plasticity and attenuates cold hyperalgesia after dorsal rhizotomy. *J Neurosci* (2004) 24:10796-805.

Ramón A & Nieto M. Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* (1992) 47:213-20.

Ramón A, Pérez J, Nieto M. *In vitro* enfolding of olfactory neuritis by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* (1993) 5:1172-80.

Ramón A & Nieto M. Regeneration into the spinal-cord of transected dorsal-root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* (1994) 127:232-44.

Ramón A, Plant G, Avila J, Bunge M. Long-distance axonal regeneration in the transected rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* (1998) 18:3803-15.

Rojas A, Torres N, Ortuño D, Gudiño G. Microarray analysis of striatal embryonic stem cells induced to differentiate by ensheathing cell conditioned media. *Dev Dyn* (2008) 237:979-94.

Rutkowski J, Tuite G, Lincoln P, Boyer P, Tennekoon G, Kunkel S. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* (1999) 101:47-60.

Saijilafu, Nishiura Y, Hara Y, Yoshii Y, Ochiai N. Gradual stretching of the proximal nerve stump induces the growth of regenerating sprouts in rats. *J Orthop Res* (2008) 26:1012-7.

Salgado H, Guizar G, Feria A, Grijalva I, Espitia L, Ibarra A, Madrazo I. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res* (1998) 782:126-35.

Schlaepfer W, Lee C, Lee V, Zimmerman U. An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis. *J Neurochem* (1985) 44:502-9.

Scholz J & Woolf C. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* (2007) 10:1361-8.

Schwartz M. Molecular and cellular aspects of nerve regeneration. *Crit Rev Biochem* (1987) 22:89-110.

Seddon HJ. A classification of nerve injuries. *Br Med J* (1942) 2:237-38.

Seltzer Z, Tal M, Sharav Y. Autotomy behavior in rats following peripheral deafferentation is suppressed by daily injections of amitriptyline, diazepam and saline. *Pain* (1989) 37:245-50.

Sharma C & Sharma M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des* (2007) 13:3568-75.

Stefansson K & Wollmann R. Distribution of glial fibrillary acidic protein in central nervous system lesions of tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* (1980) 52: 135-40.

Stemberger H, Itoyama Y, Kies M, Webster H. Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-former oligodendrocytes of the newborn rat C.N.S. *J Neurocytol* (1978) 7:251-63.

Stoll G, Griffin J, Li C, Trapp B. Wallerian degeneration of the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* (1989) 18:671-83.

Stoll G & Müller H. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* (1999) 9:313-25.

Stoll G, Jander S, Myers R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Wallers' observations to neuroinflammation. *J Periphe Nerv Sys* (2002) 7:13-27.

Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*, Second edition. Edinburgh: Churchill Livingstone (1978).

Suri A, Metha V, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India* (2002) 50:23-26.

Tartaglia L & Wagh A. Co-ordination and control. In: Tartaglia L & Wagh A, editors. *Veterinary Physiology and Applied Anatomy*. Elsevier limited, 2005: 34-53.

Tanaka K, Zhang Q, Webster H. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and effects of macrophage suppression and conditioning lesions. *Exp Neurol* (1992) 118:53-61.

Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* (2001) 414:112-17.

Thompson D & Davis T. The addition of antibiotics to fibrin glue. *South Med J* (1997) 90:681-4.

Tirelioğlu S, Özbek S, Özcan M, Ayberk M, Noyan B. Use of an intact sensory nerve to bridge a motor nerve defect: an experimental study. *J Neurosurg* (2006) 104:804-9.

Trumble T & McCallister W. Repair of peripheral nerve defects in the upper extremity. *Hand Clin* (2000) 16:37-52.

Tsai E, Dalton P, Shoichet M, Tator C. Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transaction. *Biomaterials* (2006) 27:519-33.

Verdú E, García G, Forés J, Gudiño C, Muñetón V, Nieto M, Navarro X. Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *Neuroreport* (2001) 12:2303-9.

Verdú E, García G, Forés J, López R, Navarro X. Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* (2003) 42:275-86.

Verdú E, Navarro X, Gudiño G, Rodríguez F, Ceballos D, Valero A, Nieto M. Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport* (1999) 10:1097-101.

Veronesi B & Oortgiesen M. The TRPV1 receptor: target of toxicants and therapeutics. *Toxicol Sci* (2009) 89:1-3.

Verstraete M, Chesebro J, Fuster Valentín. Terapia antitrombótica. In: Fuster V, Ross R, Topol E, editors. *Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Barcelona: Springer Verlag, 1997:1045-1060.

Villetti G, Bergamaschi M, Bassani F, Bolzoni P, Maiorino M, Pietra C, Rondelli I, Chamiot P, Simonato M, Barbieri M. Antinociceptive activity of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide hydrochloride (CHF3381) in experimental models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) 306:804-14.

Vuorinen V, Siironen J, Røyttä M. Axonal regeneration into chronically denervated distal stump, electron microscope studies. *Acta Neuropathol* (1995) 89:209-18.

Wall P, Devor M, Inbal R, Scadding J, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* (1979a) 7:103-13.

Wall P, Scadding J, Tomkiewicz M. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. *Pain* (1979b) 6:175-82.

Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observation of the alteration produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (1850) 140:423-29.

Waldram M. Peripheral nerve injuries. *Trauma* (2003) 5:79-96.

Webber C & Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol* (2010) 223:51-9.

Widera D, Mikenberg I, Kaus A, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Nuclear factor- $\kappa$ B controls the reaggregation of 3D neurosphere cultures in vitro. *Europ Cells Mat* (2006) 11:76-85

Woerly S, van Diep D, Sosa N, de Vellis J, Espinosa A. Reconstruction of the transected cat spinal cord following Neurogel™ implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Int J Devl Neuroscience* (2001) 19:63-83.

Yen L, Bennett G, Ribeiro A. Sympathetic sproutings and changes in nociceptive sensory innervation in the glabrous skin of the rat hind paw following partial peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* (2006) 495: 679-90.

Ygge J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* (1989) 478:193-5.

Zhuo M, Wu G, Wu L. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain* (2011) 4:2-12.