



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

EFFECTO DE LA SUBMUCOSA DE INTESTINO DE CERDO SOBRE LA FUNCIÓN MOTORA Y LA CICATRIZACIÓN DEL NERVIIO CIÁTICO LESIONADO DE RATA

## **TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

Maestro en Ciencias

**presenta:**

Miguel Angel Gaxiola García

## **TUTOR:**

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
"Manuel Velasco Suárez".

## **COTUTOR:**

Dr. Óscar Hernández Hernández

Laboratorio de Genética y Genómica  
CENIAQ

Instituto Nacional de Rehabilitación, INR.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TABLA DE CONTENIDO

PORTADA .....	1
<b>1 AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2 RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>3 ANTECEDENTES .....</b>	<b>9</b>
3.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	9
3.2 ANATOMÍA DEL NERVIOS PERIFÉRICOS.....	10
3.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	11
3.4 EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO DE LAS LESIONES DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	13
3.5 TÉCNICAS DE REPARACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	14
3.6 MÉTODOS PARA FAVORECER LA REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	15
3.7 SUBMUCOSA DE INTESTINO DE CERDO: CARACTERÍSTICAS.....	16
3.8 SUBMUCOSA DE INTESTINO DE CERDO: EFECTO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DEL NERVIOS PERIFÉRICOS.....	19
3.9 MÉTODOS PARA EVALUAR LA REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES.....	21
3.9.1 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA.....	21
3.9.2 EVALUACIÓN FUNCIONAL.....	22
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>23</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>7. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>8. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
8.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>9. METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
9.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS PARA EL USO DE ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN.....	24
9.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25

9.3 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.....	27
9.3.1 Variables de peso y edad de las ratas.....	27
9.4 TAMAÑO DE MUESTRA.....	27
9.5 DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.....	28
9.5.1 MODELO DE LESIÓN DE NERVIOS CIÁTICOS.....	28
9.5.2 EVALUACIÓN FUNCIONAL DE CAMINATA EN REJILLA (GRID WALKING TEST), ESTABLECIENDO LA FALLA DE PISADA.....	29
9.5.3 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y EXPLANTACIÓN DEL NERVIOS CIÁTICOS.....	31
9.5.4 EVALUACIÓN DE LA ATROFIA MUSCULAR.....	33
9.5.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	34
9.6 CONSIDERACIONES FINANCIERAS.....	35
9.7 LUGAR DONDE SE LLEVÓ A CABO LA INVESTIGACIÓN.....	35
9.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
10.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FUNCIONAL.....	36
10.1.1 Resultados del desempeño funcional evaluado con la prueba de falla de pisada valorada en rejilla (Composite foot fault score) a las 6 semanas.....	36
10.1.2 Resultados del desempeño funcional evaluado con la prueba de falla de pisada valorada en rejilla (Composite foot fault score) a las 14 semanas.....	37
10.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE ATROFIA MUSCULAR.....	39
10.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	41
10.3.1 Análisis histológico del grupo sacrificado a las 6 semanas.....	42
10.3.2 Análisis histológico del grupo sacrificado a las 14 semanas.....	44
<b>11. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
11.1 SESGOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	48
<b>12. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
12.1 ESTUDIOS FUTUROS.....	49
<b>13. ANEXOS.....</b>	<b>50</b>
13.1 ANEXO 1. Técnica de Hematoxilina-Eosina.....	50
13.2 ANEXO 2. Técnica de Tricrómico de Masson.....	51
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## 1 AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de cursar este programa; a todo el personal administrativo en el Posgrado de Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud por su amabilidad y las incontables ocasiones en que recibí orientación.

Agradezco a la Dra. María de los Angeles Araceli Díaz Ruiz por confiar en mí, por guiarme, por su paciencia, por su respeto a mi circunstancia, por hacerme conservar el rumbo y por insistir en la calidad y el rigor que conviene a todo quehacer científico.

Agradezco a la Dra. Marisela Méndez Armenta además de su accesibilidad y paciencia por las múltiples horas a lo largo de los días, semanas y meses que dedicó al procesamiento e interpretación de las muestras tisulares obtenidas durante mi protocolo.

Agradezco al Dr. Oscar Hernández Hernández por sus comentarios y sus ánimos; por haber detectado áreas de oportunidad y por haberlo expresado abiertamente de manera optimista y con propuestas de solución.

Agradezco al Dr. Ignacio Lugo Beltrán por su apoyo invaluable en las cirugías experimentales llevadas a cabo y por permitirme realizar esta maestría de manera simultánea a mi formación como residente en el servicio de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” a su digno cargo.

Agradezco al Dr. Ernesto Martín Menjívar, adscrito a la Clínica de Mano del servicio de Cirugía Plástica Estética y Reconstructiva del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” sin cuyo

apoyo mi proyecto no hubiera siquiera iniciado.

Al personal del Bioterio y Departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”; personajes clave en este proyecto.

A todos mis profesores en las materias cursadas, su ejemplo, entusiasmo y amor por la investigación infundieron inquietud y curiosidad a mi mente.

Agradezco a mis compañeros de residencia Frantz Alexis Rossainz, Elizabeth María Brugés Sánchez, Fernando José Núñez Proulx y Katheryn Michelle Solís Salgado por su empatía durante mis ausencias o mis tiempos limitados en nuestro ajetreado último año de formación.

Agradezco a mis amigos Jesús Francisco Escrivá Machado, Roger Andrés Damián Robles y Carlos Enrique Gamboa Ruiz: su ayuda en lo concreto, en el trabajo pesado, en el trabajo real, hizo posible este trabajo.

Agradezco a mi esposa Beatriz Hatsue Kushida Contreras por mostrarme que siempre hay algo positivo y por lo cual agradecer en los momentos más complicados. Gracias por mostrarme que hay mejores opciones que renunciar.

Agradezco a mi madre, Julieta García, por su amor y su confianza en mí, por estar orgullosa y al pendiente del desarrollo de este proyecto y por sus amorosas palabras de aliento.

Número de proyecto de CONACyT no. 233815.

## 2 RESUMEN

*INTRODUCCIÓN.* Las lesiones de nervio periférico (LNP), principalmente cuando involucran la extremidad superior, tienen consecuencias devastadoras en la calidad de vida de los pacientes que las sufren. A pesar de presentar una incidencia limitada (menos del 2% de traumatismos en la extremidad superior atendidos en primer nivel) la población afectada es en su mayoría económicamente activa, compuesta mayormente por varones jóvenes encargados del ingreso y manutención familiar. Se estima que en Estados Unidos, existe una prevalencia de personas con LNP que se acerca a 20 millones de habitantes, implicando un gasto gubernamental aproximado de 150 mil millones de dólares. Las manifestaciones de esta patología son tan variadas y van desde un déficit motor leve hasta parálisis completa, e incluyen casos con dolor neuropático intratable. Se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas para modular o favorecer la reparación nerviosa y evitar secuelas, la mayoría de estas intervenciones, sin éxito hasta el momento, se han hecho únicamente en contextos experimentales teniendo como objetivo guiar el cono de crecimiento nervioso en sentido distal y modular la cicatrización que podría impedir el tránsito adecuado de los axones hacia el sitio de inervación distal. Por lo anterior resulta pertinente proponer otras alternativas.

*OBJETIVO.* Evaluar el efecto de una matriz acelular compuesta por submucosa de intestino de cerdo (Oasis) sobre función motora y la cicatrización en un modelo experimental de defecto nervioso ciático en ratas.

*MATERIAL Y MÉTODOS.* Se utilizaron 24 ratas Wistar, hembras, con peso de 250 a 300 g. Los animales fueron sometidos a un modelo de lesión traumática de nervio ciático derecho por sección directa en tercio medio del nervio bajo microscopio de operaciones. Inmediatamente después de la lesión se realizó reparación nerviosa con técnica microquirúrgica. Se formaron dos grupos de 12 ratas cada uno: al primer grupo o grupo control no se le realizó otra intervención además de la neurorrafia; al segundo grupo o grupo intervenido además de la neurorrafia realizada se le adicionó

una lámina de submucosa de intestino de cerdo (Oasis) de 5 x 7mm con conformación tubular enrollada sobre el sitio de reparación nerviosa. Las extremidades posteriores izquierdas no se sometieron a ninguna manipulación. La función motora fue evaluada a diferentes tiempos como sigue: antes del procedimiento quirúrgico, 1 semana después del procedimiento e inmediatamente antes del sacrificio a 6 semanas (tiempos cortos) o 14 semanas (tiempos largos) para evaluar el proceso de cicatrización con técnicas histológicas. El tejido fue procesado para su análisis histológico utilizando la técnica de hematoxilina y eosina así como tricrómico de Masson para determinar el grado de fibrosis (contenido de colágena y su distribución), la conformación de las vainas de mielina y distribución de células de Schwann. Se realizaron tinciones con plata de muestras seleccionadas. Se determinaron mediante balanza analítica los pesos de los músculos gastrocnemios y sóleo de cada una de las extremidades intervenidas quirúrgicamente y de las extremidades contralaterales.

*RESULTADOS.* Los resultados de la evaluación funcional mostraron que los animales con y sin tratamiento se recuperan de manera similar a las 6 semanas después del daño, mientras que los animales tratados con submucosa evaluados a largo plazo (14 semanas) presentan una mayor recuperación funcional ( $p < 0.05$ ) al ser comparados con el grupo de animales no tratados (ANOVA de medidas repetidas). Por otra parte, los resultados de la evaluación histológica, mostraron que no hay diferencias significativas entre los grupos a los que se adicionó submucosa (Oasis) comparados con aquellos a los que sólo se les realizó neurorrafia tanto en los animales sacrificados a 6 semanas como en los animales sacrificados a 14 semanas (prueba  $t$  para muestras independientes). Este análisis histológico evidenció, en ambos grupos, infiltrado inflamatorio, fibras de colágena principalmente en la zona del corte del nervio, vainas de mielina con datos de degeneración así como granulomas rodeando los puntos de sutura adyacentes al perineuro.

*CONCLUSIONES.* El uso de submucosa de intestino de cerdo (Oasis) favorece la recuperación motora solamente a tiempos largos (14 semanas), sin embargo no evita la degeneración muscular ya

que no se observan diferencias en músculos de la pantorrilla de la rata Wistar a las que se les realizó neurorrafia simple comparadas con aquellas a las que se adicionó submucosa de cerdo (Oasis) en ninguno de los tiempos de estudio. Finalmente el análisis histológico indica que el grado e intensidad de cicatrización perineural es similar en los grupos tratados y no tratados con submucosa de intestino de cerdo, evaluando esto tanto a las 6 semanas después del daño para tiempos cortos como a las 14 semanas después del daño para tiempos largos.

## 3 ANTECEDENTES

### 3.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE NERVIOS PERIFÉRICOS.

A pesar de contar con una incidencia relativamente baja, constituyendo el 1.64% de las lesiones de extremidad superior atendidas en primer nivel, la población afectada por esta patología es en su mayor parte económicamente activa, ya que el 83% de los afectados son menores de 55 años y de estos el 50% son varones [Taylor, et. al. 2008]. La mayoría de estas lesiones son de origen traumático, siendo consecuencia de accidentes de tránsito menores, accidentes en el hogar o accidentes laborales [Ciaramitaro, et. al. 2010]. Los nervios más comúnmente afectados son el nervio radial en la extremidad superior y el nervio peroneo en la extremidad inferior [Noble, et. al. 1998].

En Estados Unidos, se estima que cada año, aproximadamente 360,000 personas sufren una lesión de nervio periférico siendo esta una causa de discapacidad de por vida [Romero-Ortega, 2015]. Esto ocasiona una prevalencia de personas con LNP que se acerca a 20 millones de habitantes, implicando un gasto gubernamental aproximado de 150 mil millones de dólares. Las manifestaciones de esta patología son tan variadas y van desde un déficit motor leve hasta parálisis completa, e incluyen casos con dolor neuropático intratable [Grinsell, et. al. 2014].

En México no existen informes exactos de la incidencia y la prevalencia de las LNP. Se reporta por Castillo-Galván, et. al. [2014], que en el periodo entre 2008 y 2012, de entre 11,998 pacientes atendidos por traumatismos en un Hospital Universitario de Monterrey se registraron 134 casos (1.12%) de LNP. De estos, 62% correspondían al sexo masculino, con una media de edad de 27 años habiendo sufrido lesión completa al menos en la mitad de los casos (51%) mediante mecanismo punzocortante. Es importante destacar que anatómicamente el sitio más afectado fue el plexo braquial, y de éste el nervio cubital fue el nervio mayormente afectado.

Los antecedentes epidemiológicos señalan claramente que las LNP son un problema con una incidencia cada vez mayor, que tiene repercusiones económicas y sociales muy importantes; sin

embargo, hasta la fecha se cuenta únicamente con tratamientos que brindan efectos terapéuticos limitados. A este respecto, un metaanálisis para valorar la evolución tras el tratamiento de lesiones de nervio periférico estableció que se obtiene un resultado motor satisfactorio sólo en la mitad (51.6%) de los casos y un resultado sensitivo satisfactorio sólo en el 42% de los casos. Los resultados más pobres se observaron en pacientes mayores de 40 años [Ruijs, et. al. 2005].

### **3.2 ANATOMÍA DEL NERVI PERIFÉRICO.**

Los nervios periféricos están constituidos por extensiones axonales que conectan el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) con el resto del cuerpo para mantener la homeostasis, mediar la sensibilidad, el movimiento y la coordinación [Snell. 2009]. Los componentes celulares del nervio periférico incluyen células de Schwann, fibroblastos, células de linaje endotelial y macrófagos [Stewart. 2003]. La unidad funcional más pequeña en el nervio periférico es la fibra nerviosa, la cual puede estar mielinizada o no mielinizada. Las fibras nerviosas no mielinizadas se componen de varios axones los cuales se encuentran envueltos por una sola célula de Schwann; en cambio las fibras nerviosas mielinizadas se componen de un solo axón envuelto de manera individual por una sola célula de Schwann. La membrana de esta célula de Schwann se enrolla alrededor de esta fibra nerviosa para formar una vaina de mielina multilaminada. El axón de las fibras mielinizadas está cubierto en todo su trayecto por múltiples células de Schwann colocadas extremo con extremo. La distancia del axón cubierta por una sola célula de Schwann es llamada internodo. Los pequeños espacios no mielinizados entre los extremos de las células de Schwann son conocidos como nodos de Ranvier [Flores, et. al. 2010]. Los nervios sensitivos y motores en el cuerpo humano forman una estructura en forma de cordón blanquecino, compuesta por estos haces de axones mielínicos y amielínicos embebidos en una matriz colagenosa. Este tejido conectivo local funciona como soporte: el endoneuro compuesto por gruesas fibras de colágena rodeando cada fibra mielínica individual o grupo de fibras amielínicas, a su vez formando fascículos al ser rodeadas por una vaina de tejido conectivo denso y delgado conocido como perineuro [Menorca, et. al. 2013;

Romero-Ortega, 2015]. Cada fascículo individual se encuentra envuelto por lo que se conoce como epineuro interfascicular o interno. El conjunto de fascículos a su vez es rodeado por el epineuro extrafascicular o externo, el cual funciona como la cubierta final del tronco de nervio periférico [Flores, et. al. 2010].

### **3.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE NERVIOS PERIFÉRICOS.**

La comunicación con el medio ambiente se lleva a cabo a través de órganos sensitivos o efectores que llevan señales desde y hacia el sistema nervioso central a través de nervios periféricos. Esta localización hacia la periferia de dichas estructuras especializadas las pone en riesgo de lesionarse. De manera general la etiología principal de LNP son los traumatismos, ocupando frecuencias mucho menores las patologías tumorales, reumatológicas o isquémicas de diversos tipos. Clásicamente la lesión de los nervios periféricos de acuerdo a Seddon [1942] se ha clasificado en: a) neuropraxia (sólo daño a la vaina de mielina sin pérdida de la continuidad axonal), b) axonotmesis (pérdida de la continuidad axonal pero preservación de las capas de tejido conectivo periaxonal) y c) neurotmesis (sección completa del nervio). Sunderland [1951] posteriormente amplió la clasificación: I, II, III, IV, y V; siendo I equivalente a neurapraxia, II correspondiendo a axonotmesis sin daño a endoneuro, perineuro o epineuro, III siendo una axonotmesis con daño a endoneuro, IV axonotmesis con daño a perineuro, y V equivalente a neurotmesis, es decir sección completa del nervio. McKinnon [1989, 1991] agregó otro grado de lesión; la lesión tipo VI correspondiente a lesiones mixtas o distintos grados de lesión nerviosa en un segmento. Cualquier ruptura o defecto de la membrana lipídica bilaminar del axón o de la neurona conduce a una cascada de muerte celular programada, a menos que sea rápidamente reparada. Los cambios en el muñón proximal varían en base a la localización de la lesión en relación al cuerpo neuronal y a la severidad del daño. La lisis del muñón proximal típicamente progresa de manera limitada al primer nodo de Ranvier proximal; sin embargo, si el sitio de lesión es muy próximo al soma neuronal, puede ocurrir apoptosis [Menorca, et. al. 2013].

Después de un evento traumático, la zona de lesión se extiende tanto proximal como distalmente.

**CAMBIOS EN EL CUERPO NEURONAL:** los cuerpos celulares y los axones proximales desconectados entran a un proceso llamado cromatólisis [Bittner, et. al. 2000]. El cuerpo neuronal y el nucléolo aumentan de volumen; el núcleo se coloca de manera excéntrica y se observa disolución de los cuerpos de Nissl [Flores, et. al. 2000]. En este proceso, la maquinaria genética de la célula se altera para enfocarse en la regeneración del fenotipo; las proteínas asociadas con crecimiento sufren regulación a la alza y las proteínas involucradas en el mantenimiento del diámetro neuronal sufren regulación a la baja. Si el axón eventualmente alcanza su órgano blanco y se requiere la maduración neuronal, entonces la expresión génica y el fenotipo de la neurona se revertirán de nuevo desde un estado regenerativo a uno de mantenimiento [Menorca, et. al. 2013]. Algunas horas después de la lesión, los axones muestran múltiples brotes de regeneración; pueden observarse hasta 50-100 brotes (a partir del nodo de Ranvier proximal a la lesión) que al madurar constituyen un cono de crecimiento que se elonga en respuesta a señales provenientes de tejidos locales y de blancos efectores motores y sensitivos (factores neurotróficos y neurotrópicos) [Grinsell, et. al. 2014].

**CAMBIOS EN EL SITIO DE LESIÓN Y DISTALES:** inician casi inmediatamente. Constituyen la mayor diferencia en comparación con otros tejidos. El proceso de degeneración que ocurre desde el sitio de trauma hasta el mecanismo efector (motor o sensitivo) que se encuentra a cierta distancia en sentido distal se conoce como degeneración Walleriana [Waller. 1850]. Inicia 24 a 48 horas después de la lesión. Las células de Schwann proliferan en el sitio de la lesión fagocitando los restos axonales y de mielina hasta que solo permanecen, encontrándose vacíos, los tubos endoneurales de tejido conectivo por donde viajaban los axones [Grinsell, et. al. 2014]. Asimismo, se reclutan macrófagos a la zona los cuales participan en la remoción de restos tisulares, además secretan factores de crecimiento que estimulan a su vez a las células de Schwann y la proliferación de fibroblastos. Las células de Schwann tapizan estos conductos endoneurales y adoptan una conformación paralela al eje mayor del axón conformando las llamadas bandas de Bungner [Menorca, et. al. 2013].

PROCESO DE CICATRIZACIÓN NERVIOSA: Múltiples extensiones axonales se elongan a partir del cono de crecimiento hasta que logran conectarse a un efector distal (placa motora o receptor sensitivo). Si estos conos de crecimiento no alcanzan un efector o logran introducirse en un cono endoneural continuarán creciendo de manera desorganizada produciendo un neuroma, el cual se manifiesta clínicamente por una protuberancia dolorosa en el trayecto del nervio [Siemionow. 2009]. Se ha demostrado que la regeneración axonal se vuelve más desordenada cuanto más severa es la lesión. Esto resulta en menos axones alcanzando su órgano blanco debido a la cicatrización exacerbada y a una regeneración axonal menos efectiva después de la lesión nerviosa [Pan, et. al. 2003].

Aunque pueden existir diferencias de acuerdo al tipo de lesión, desde 1943 [Seddon, et. al. 1943] se estableció que la velocidad de regeneración nerviosa en humanos es de 1mm/día bajo condiciones óptimas. Se acepta que en mamíferos menores la velocidad es mayor. Esta velocidad de regeneración puede traducirse en una recuperación funcional muscular total si la reinervación se lleva a cabo antes de la reabsorción de la placa motora. De manera general, en los principales grupos musculares se habla de una denervación muscular antes de 18 meses. Por lo tanto un segmento proximal de nervio periférico que crezca en sentido distal pero que esté muy alejado del órgano blanco no alcanza la regeneración hacia la placa motora antes de que ésta se haya reabsorbido [Grinsell, et. al. 2014]. Los receptores sensitivos terminales, tales como corpúsculos de Paccini, corpúsculos de Meissner y células de Merkel pueden permanecer hasta 2-3 años sin ser reinervados después de la lesión; de tal manera que la función nerviosa sensitiva puede recuperarse incluso después que la función muscular se ha perdido de manera permanente [Menorca, et. al. 2013].

### **3.4 EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO DE LAS LESIONES DE NERVIIO PERIFÉRICO.**

Si bien las lesiones de nervio periférico no comprometen la vida, sus secuelas pueden disminuir de manera drástica la calidad de vida de los pacientes; esto motiva las investigaciones para modular la

regeneración nerviosa [Kang, et. al. 2011]. La reinervación no es sinónimo de recuperación funcional completa; además la recuperación completa es la excepción de la regla. La presencia de un tubo endoneural intacto implica un resultado más favorable, condición que sólo está presente en los grados más leves de lesión. Las lesiones nerviosas más severas no sólo presentan una ruptura o disrupción brusca del tubo endoneural que hace más difícil la formación de bandas de Bungner apropiadas, sino que también tienen mayor formación de tejido cicatrizal que significa un impedimento considerable para el cono de crecimiento, lo que conduce a una extensión desorganizada del cono axonal [Menorca, et. al. 2013].

A pesar de refinamientos en la técnica quirúrgica y un mayor conocimiento de la topografía interna de los nervios periféricos, el manejo de las lesiones de nervio periférico continúa siendo un desafío clínico. Puesto que los adelantos en técnica microquirúrgica han alcanzado una meseta y los resultados de la reparación nerviosa por lo regular no son totales, especialmente en las reparaciones tardías; las investigaciones se están enfocando en la manipulación de la respuesta fisiopatológica en la lesión y regeneración del nervio periférico para mejorar la evolución clínica [Flores, et. al. 2010].

### **3.5 TÉCNICAS DE REPARACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.**

En la actualidad, las lesiones de nervio periférico continúan siendo un reto mayor para los cirujanos reconstructivos. El conocimiento profundo de la anatomía, la fisiopatología y las técnicas de reconstrucción son un requisito para su manejo adecuado. El procedimiento más sencillo es la reparación primaria o directa de los extremos nerviosos. La aproximación y unión de los extremos se puede llevar a cabo por varias técnicas; la más usada habitualmente es la aproximación con material de sutura sintético [Siemionow. 2009]. Cuando la reparación nerviosa no puede llevarse a cabo sin demasiada tensión, se requieren injertos nerviosos interpuestos o técnicas de tubulización que consisten en la colocación de una estructura tubular entre los extremos del nervio que no lograron aproximarse. El estándar de oro actual para el puenteo de defectos nerviosos es el

autoinjerto nervioso: un segmento de nervio obtenido de otro sitio del mismo paciente y colocado como un puente en la brecha [Siemionow. 2009]. Sin embargo, las desventajas de este abordaje tales como la morbilidad del sitio donador y la cantidad y longitud limitadas de material para injerto ha motivado la búsqueda de medios alternativos para la reconstrucción de defectos nerviosos. El uso de aloinjertos nerviosos, de origen cadavérico humano y requiriendo inmunosupresión sistémica al menos hasta la integración del injerto se ha limitado a lesiones severas y pérdidas extensas de tejido nervioso [Ray, et. al. 2010]. Las técnicas de tubulización (o entubulado) con conductos naturales o artificiales son aplicables como una alternativa para el puenteo de defectos nerviosos cortos de tamaño no crítico, actualmente no mayores de 3cm, sin las morbilidades asociadas a la procuración de injertos nerviosos autólogos [Siemionow. 2009]. El uso de estos conductos en defectos de mayor tamaño produce resultados funcionales muy limitados [Moore, et. al. 2009]. Otra aplicación de estos conductos nerviosos es el servir como protección al sitio de lesión nerviosa envolviéndolo después de haber sido reparado aunque no exista una brecha nerviosa [Ray, et. al. 2010]. Las investigaciones actuales sobre reparación nerviosa se enfocan en el nivel de las ciencias básicas incluyendo inducción de tolerancia y mínima inmunosupresión para los aloinjertos nerviosos, terapias de soporte celular para la reparación y diseño de conductos nerviosos por medio de bioingeniería [Siemionow. 2009].

### **3.6 MÉTODOS PARA FAVORECER LA REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.**

Se han realizado múltiples esfuerzos por modular o favorecer la reparación nerviosa y evitar las secuelas. La mayoría de estas intervenciones se han hecho únicamente en contextos experimentales teniendo como objetivo guiar el cono de crecimiento nervioso en sentido distal y modular la cicatrización que podría impedir el tránsito adecuado de los axones hacia el sitio de inervación distal [Pabari, et. al. 2014]. En la actualidad no existe una modalidad clara para aumentar la velocidad o la calidad con la cual se regenera un nervio. Muchos productos de origen natural y sintético han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos; sin

embargo los estudios clínicos prospectivos aleatorizados son limitados para sustentar mayor seguridad o eficacia de cualquiera de ellos. Es de llamar la atención la dificultad para comparar estas modalidades entre sí debido al enfoque y limitaciones de cada estudio; fundamentalmente la falta de protocolos estandarizados de evaluación [Kehoe, et. al. 2012].

La mayoría de las investigaciones recientes en el campo de regeneración nerviosa periférica han enfatizado el envolver (entubular) los muñones nerviosos distal y proximal (del nervio seccionado) en íntima oposición utilizando un conducto tubular no neural fabricado con materiales naturales o sintéticos. El efecto deseado de la “entubulación” es: incrementar a) el número, b) velocidad y c) longitud de los axones regenerados [Kehoe, et. al. 2012]. La concentración de agentes neurotróficos en el sitio de la reparación se considera crítica para la regeneración nerviosa. El mecanismo por el cual estos factores de crecimiento estimulan la reparación axonal no está claro, ni el tiempo propicio para sus efectos, aunque muchos de estos factores de crecimiento y citocinas son liberados en los tejidos adyacentes después de una lesión nerviosa [Ray, et. al. 2010]. En teoría, una brecha en el sitio de reparación nerviosa debería permitir a los axones identificar al órgano blanco de manera correcta; las investigaciones han mostrado que la reparación nerviosa óptima requiere nervios coaptados en estrecho contacto, sin brechas y con alineación correcta. Finalmente, la habilidad de ciertas glicoproteínas de membrana axonales para atraer de manera preferencial axones motores o sensitivos se ha investigado como una posibilidad para guiar la regeneración nerviosa. El conducto nervioso ideal creado por bioingeniería debe ser capaz de estimular la regeneración, bloquear la invasión de tejido cicatrizal y autodegradarse cuando ya no sea necesario [Kehoe, et. al. 2012; Ray, et. al. 2010].

### **3.7 SUBMUCOSA DE INTESTINO DE CERDO: CARACTERÍSTICAS.**

Se ha estudiado el efecto de envolver un sitio de reparación nerviosa primaria en nervios motores de rata con un conducto nervioso bioabsorbible. Los conductos nerviosos constituidos por colágena no han mostrado mejor función motora comparados con los controles; sin embargo algunos estudios

han mostrado disminución en la formación de tejido cicatrizal perineural. Esto último, teóricamente, podría traducirse en el efecto funcional en el ser humano ya que en este caso la formación de cicatriz es mucho más evidente que en las ratas [Lee, et. al. 2014]. El uso de tejido submucoso de intestino delgado de cerdo (SIS por sus siglas en Inglés: Small Intestinal Submucosa) fue descubierto e identificado en el Centro de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Purdue en el año de 1987. En un principio se había probado el uso de un injerto vascular compuesto de intestino de cerdo, pero éste fracasó a las pocas horas de haberse implantado, porque las enzimas producidas por el material intestinal absorben las suturas. Se removieron gradualmente algunas capas del intestino delgado antes de implantarlas para investigar el espesor óptimo para los injertos. Se encontró que el material compatible injertado era el de una sola capa de intestino delgado, traslúcida y fuerte. Se utilizó submucosa de intestino delgado produciendo un injerto vascularizable que se incorporara a las células huésped por su gran contenido de matriz extracelular. En su forma comercializada, la matriz de colágena derivada de submucosa de intestino de cerdo (OASIS®; Cook Biotech, West Lafayette, Estados Unidos), se propone como una matriz tridimensional de 0.15mm de grosor similar a la dermis en estructura y contenido [Isaac, et. al. 2012]; constituyéndose en su mayor parte (90%) por colágena tipo I y III y siendo biocompatible y no inmunogénica [Shim, et. al. 2015]. Sobre este rubro de biocompatibilidad, existen resultados contradictorios; Petter-Puchner y colaboradores [Petter-Puchner, et. al. 2006] estudiaron el efecto de la submucosa de intestino de cerdo en un modelo de reparación de hernias ventrales en ratas Sprague-Dawley utilizando un producto comercializado (Surgisis Gold, Cook Medical). Los autores concluyen que la submucosa de intestino de cerdo produce abscesos, cápsulas y seromas en todas las muestras; el estudio histológico reveló lesiones necróticas líticas y una respuesta inflamatoria severa en los tejidos adyacentes. Por otro lado, se ha demostrado que la submucosa de intestino de cerdo procesada (OASIS®) contiene componentes de matriz extracelular intactos y activos como glucosaminoglucanos (i.e. ácido hialurónico), proteoglicanos y fibronectinas; y que libera y promueve la liberación de factores de crecimiento tales como factor de crecimiento de fibroblastos

(FGF) y factor de crecimiento transformante beta ( $\beta$ TGF) [Niezgoda, et. al. 2005], teniendo como consecuencia una granulación y epitelización aceleradas cuando se ha utilizado en áreas cruentas o heridas [Isaac, et. al. 2012]. Su uso ha sido tan variado en situaciones tales como perforaciones nasales septales [Ambro, et. al. 2003], reparaciones de hernias en campos quirúrgicos contaminados [Franklin, et. al. 2004], material de refuerzo en cirugía gástrica y gastrointestinal [Kini, et. al. 2001], cirugía reconstructiva urológica [Mantovani, et. al. 2003; Fiala, et. al. 2007], ginecológica [Rutner, et. al. 2003] y en úlceras venosas por insuficiencia vascular [Mostow, et. al. 2005]. Las características físicas de la submucosa de intestino de cerdo procesada se resumen en la Tabla 1 [Shi, et. al. 2013].

**Tabla 1. Características físicas de la submucosa de intestino de cerdo.**

**Adaptado de Shi, et. al. 2013.**

Grosor	0.05 a 0.22mm
Ultraestructura	Poros que varían de 20-30 $\mu$ m
Fuerza mecánica	20.6MPa (seca) 7.2MPa (húmeda)
Retención de sutura	0.5N (seca) 0.7N (húmeda)
Coefficiente de difusión de O <sub>2</sub>	$7 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{s}$
Estructura de las fibras	Única, proyección paralela al eje mayor del intestino

### 3.8 SUBMUCOSA DE INTESTINO DE CERDO: EFECTO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO.

La submucosa de intestino de cerdo procesada es una membrana acelular que actúa como un andamio absorbible rellenando la brecha entre los cabos del nervio y puede funcionar de esta manera como guía nerviosa. Sin embargo no se ha estudiado su efecto en el patrón de cicatrización y sólo se ha demostrado histológicamente un aumento en el número de axones identificables así como un crecimiento en dirección distal del cono nervioso proximal [Smith, et. al. 2004]. Se estudió el efecto de la submucosa de intestino de cerdo sobre la cicatrización nerviosa en un modelo de conejos New Zealand a los que no se les realizó neurotomía; sólo se diseccionó el nervio y se envolvió con la preparación de submucosa tubular con una longitud de 1cm y un diámetro interno de 5mm. Los autores concluyeron que el material de experimentación se encuentra presente aún 6 meses después del procedimiento y que no desencadena una respuesta granulomatosa [Kokkalis, et. al. 2010]. En algunos estudios se ha evaluado el efecto de la submucosa de intestino de cerdo, obtenida y procesada por los investigadores involucrados y comparándola con conductos de silicón y conductos de poli(caprolactona-co-láctido) para brechas de 5mm y 15mm en nervio ciático de ratas Sprague-Dawley encontrando como resultado una mejor respuesta motora y mayor proporción de axones mlielinizados comparado con el grupo control [Yi, et. al. 2013], así como mayor proporción de células de Schwann y expresión de neurofilamento en el grupo al que se le colocó el conducto nervioso constituido por submucosa de intestino de cerdo [Shim, et. al. 2015]. De esta manera los reportes experimentales de la submucosa de intestino de cerdo se han basado en la reparación del nervio a través de una brecha o defecto, determinando entre otros aspectos generación axonal (inmunohistoquímica NF para neurofilamentos) y cobertura por células de Schwann (inmunohistoquímica con anticuerpos S100A1); pero no en las características histomorfológicas de los tejidos cicatrizales endoneurales, epineurales y perineurales.

Estas aplicaciones experimentales de la submucosa de intestino de cerdo se resumen en la Tabla 2.

Es de llamar la atención, asimismo, que esta matriz extracelular se comercializa como un

dispositivo para proteger coaptaciones nerviosas primarias en las que no existe brecha nerviosa; sin embargo, la referencia bibliográfica que se utiliza para sustentar dicha indicación se refiere a un conducto venoso autólogo en un modelo de compresión nerviosa en ratas [Xu, et. al. 2000].

Tabla 2	Año	Origen de la submucosa	Grupo control	Brecha	Modelo animal	Observaciones
Smith et. al.	2004	Procesada por los autores	Vs. Brecha no reparada	10mm	Sprague-Dawley	Aumento en el número de axones identificables
Kokkalis et. al.	2010	Comercializada, Axogen	Autocontrol, contralateral	Sin defecto o brecha	Conejos	Presente a los 6 meses Sin granulomas
Yi et. al.	2013	Procesada por los autores	Vs. Silicón	5mm	Sprague-Dawley	Mejor respuesta motora Axones mielinizados
Shim et. al.	2015	Procesada por los autores	Vs. Silicón Vs. Policapro-lactona	15mm	Sprague-Dawley	Mayor proporción de células de Schwann

## 3.9 MÉTODOS PARA EVALUAR LA REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES.

### 3.9.1 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA.

Para evaluar los cambios histomorfológicos ocasionados por la lesión y reparación nerviosa en nervio periférico se han utilizado tanto microscopía óptica como microscopía electrónica de barrido. En la actualidad, se considera que la sensibilidad de la microscopía electrónica provee una profundidad de campo no lograda con técnicas más convencionales. Algunos autores prefieren el procesamiento de las muestras al incluirlas en resinas epóxicas ya que no se obtienen tan buenos resultados con las tinciones y fijaciones con plata u osmio y la inclusión en parafina [Orgel, et. al. 1980]. A pesar de que desde hace varias décadas se han utilizado técnicas incluso más novedosas que la microscopía electrónica para valorar la regeneración nerviosa, tales como analizadores de partículas, los aspectos fundamentales de la regeneración se pueden establecer con microscopía óptica y tinciones convencionales; por ejemplo, la orientación de las fibras nerviosas en relación al eje longitudinal del nervio [Mackinnon, et. al. 1985]. El patrón morfológico de las LNP se ha caracterizado de manera extensa en modelos de estudio en los que la lesión es por intoxicación; aunque parecen haber cambios correspondientes asimismo a una lesión traumática. En lo que respecta al cuerpo neuronal, los cambios se manifiestan en forma de alteraciones citoplásmicas tales como vacuolización, incremento de los cuerpos densos, agregados de neurofilamentos y cromatólisis. Por lo regular, los cambios son más avanzados distalmente; en microscopía óptica estos cambios se manifiestan como aumento de la tinción axoplásmica, incremento de densidades multifocales, regiones de edema axonal y detritus. Las fibras afectadas, axones y vainas de mielina, son degradadas y fagocitadas por células de Schwann y macrófagos; esto indica un estado avanzado de la degeneración Walleriana. En las etapas últimas (40 días después de una lesión por intoxicación) se aprecian las bandas de Bungner; estas bandas representan columnas organizadas de células de Schwann proliferantes y son un requisito para la regeneración axonal [Jortner. 2000]. De

acuerdo a lo anterior, cuando las diferencias morfológicas son evidentes, existen métodos relativamente sencillos para evaluar los cambios ocurridos en el nervio periférico después de una lesión; por ejemplo la evaluación semicuantitativa cuantificada con cruces (+, leve; ++, moderada; +++, severa) tomando en cuenta la identificación de hematomas internos, células inflamatorias, axones y fibras nerviosas dañadas, células espumosas, vasos sanguíneos endoneurales preservados y cualquier otro evento morfológico visible que pueda ser cuantificado. Por lo regular, el examinador selecciona y digitaliza aquellas imágenes con apariencia más adecuada para el análisis [Mazzer, et. al. 2008].

### **3.9.2 EVALUACIÓN FUNCIONAL.**

Además de las evaluaciones morfológicas, algunos autores han evaluado la reparación nerviosa mediante la determinación de la marcha del animal de experimentación en estudio [De Medinaceli, et. al. 1982]. La prueba se basa en el análisis de las huellas de los especímenes durante la marcha mientras atraviesan un tramo estrecho predeterminado con el extremo distal de las extremidades teñidas. Desafortunadamente, los factores individuales y motivacionales pueden interferir en la determinación de la marcha. En los animales que toleran el peso sólo de manera parcial o con poca aposición plantar, las mediciones de ángulos y zancadas son casi imposibles. Por esta razón el análisis de marcha con registro de huella plantar puede no ser óptimo en ciertas circunstancias [Sedy, et. al. 2008]. Una alternativa a la prueba anterior, es la evaluación de la marcha sobre malla (prueba de fallas de pisada), la cual es muy sensible para evaluar la coordinación sensitiva y motora de las extremidades anteriores y posteriores así como las vías motoras descendentes de las extremidades. Se permite a los animales cruzar un mallado de 1-1.2m de longitud con orificios cuyo diámetro es irregularmente asignado (0.5-5cm de diámetro); la malla se sostiene entre dos barras metálicas y se cuantifica el número de fallas en la pisada cometidas. Puede usarse también malla de cerca de jardinería (3x3 pies) sostenida en un marco de metal. El cruce del mallado requiere que los animales coloquen de manera certera sus extremidades posteriores en las barras. Se ha descrito un

método más sencillo: un mallado de 40x35cm, suspendido entre dos barras a 2cm sobre el suelo y con orificios regulares de 2.5x2.5cm. Se cuantifican las fallas completas y parciales de la pisada (falla parcial: el animal retrae la extremidad al momento de meterla en el orificio). Se obtiene un porcentaje de falla en pisada: las fallas parciales cuentan 0,5 y las completas 1. Se suman y se dividen entre el número total de pisadas, multiplicando el resultado por 100 [Sexton, et al. 2015].

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto de la matriz acelular constituida por submucosa de intestino de cerdo sobre la cicatrización del nervio ciático en la rata?

#### **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta ahora no se cuenta con una estrategia quirúrgica que mejore la función y cicatrización de los nervios periféricos después de una lesión, se ha reportado que el uso de la submucosa de intestino de cerdo (SIS) puede generar un beneficio terapéutico, sin embargo no existe evidencia clara al respecto.

#### **6. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de las técnicas de reparación realizadas de manera meticulosa, las secuelas de trauma a los nervios periféricos son devastadoras para los pacientes. Debido a la escasez en el desarrollo de técnicas quirúrgicas que brinden resultados óptimos, las líneas de investigación se enfocan en la modulación de la respuesta fisiopatológica en la cicatrización del nervio periférico después de una lesión. El conocer las características del tejido cicatrizal que envuelve un cono de reparación nerviosa en cuanto a una tendencia hacia la fibrosis o la regeneración ayudaría a aclarar los mecanismos fisiopatológicos implicados en la reparación nerviosa y establecer posibles líneas de acción terapéuticas para modular estos procesos.

## 7. HIPÓTESIS

Si la submucosa de intestino de cerdo (SIS) procesada favorece los procesos de reparación y regeneración después de una sección del nervio ciático en rata, entonces observaremos mejor desempeño funcional y menores alteraciones histopatológicas al ser comparadas con los animales a los que no se les coloca dicha sustancia.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la submucosa de intestino de cerdo sobre la función motora y la cicatrización del nervio ciático lesionado de rata y compararlo con el del grupo control.

### 8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto de la submucosa de intestino de cerdo sobre el desempeño funcional utilizando la escala de asimetría de falla de pisada y compararlo con el grupo control.
- Evaluar el efecto de la submucosa de intestino de cerdo sobre la cicatrización del nervio ciático de rata utilizando diversas técnicas histológicas.

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS PARA EL USO DE ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN.

Nos regiremos a las estipulaciones de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, [NOM. 1999]. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Asimismo utilizaremos como guías de conducta las Guías ARRIVE (Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments) [Kilkenny, et. al. 2010].

## 9.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se realizó un estudio experimental, aleatorizado y ciego con 24 ratas de la cepa Wistar adultas, hembras, de 250 a 300g con libre acceso al agua y alimento.

Las ratas se dividieron en 4 grupos experimentales de la siguiente manera:

- Grupo 1 Animales con sección y reparación nerviosas, sin colocación de submucosa de cerdo, a los que se les permitieron 6 semanas de evolución. (n=6)
- Grupo 2 Animales con sección y reparación nerviosas, con colocación de submucosa de cerdo, a los que se les permitieron 6 semanas de evolución. (n=6)
- Grupo 3 Animales con sección y reparación nerviosas, sin colocación de submucosa de cerdo, a los que se les permitieron 14 semanas de evolución. (n=6)
- Grupo 4 Animales con sección y reparación nerviosas, con colocación de submucosa de cerdo, a los que se les permitieron 14 semanas de evolución. (n=6)

Los animales fueron evaluados funcionalmente y sacrificados para evaluar el proceso de reparación con técnicas histológicas (ver figura 1).

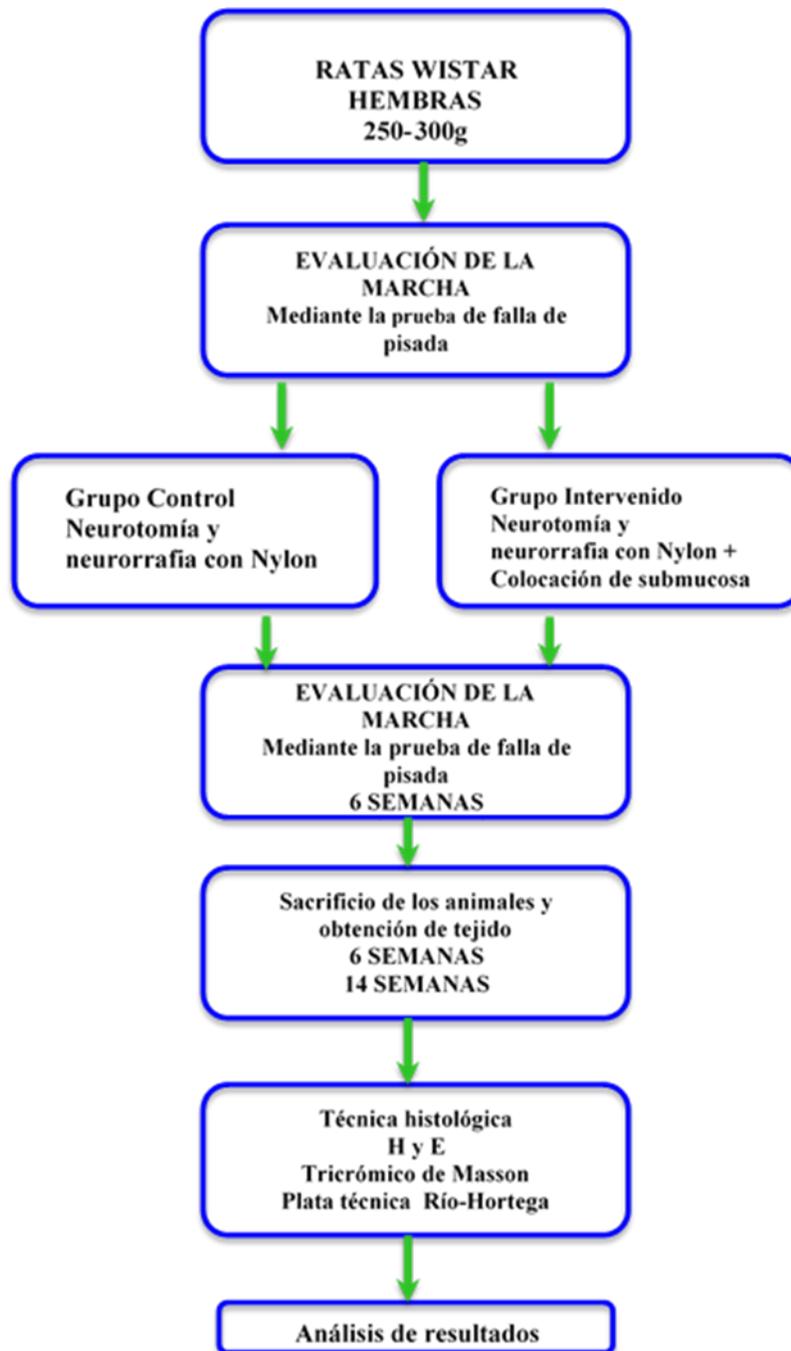


Figura 1.- Representación esquemática del diseño experimental del proyecto de investigación desarrollado.

### 9.3 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.

#### 9.3.1 Variables de peso y edad de las ratas.

Estadística descriptiva del grupo de estudio y estadística inferencial para las determinaciones experimentales en los sujetos de estudio considerando como variables dependientes e independientes:

**9.3.2 Variable Independiente:** Colocación de guía nerviosa (SIS). Categórica dicotómica.

#### 9.3.3 Variables Dependientes:

- a) Función motora (Escala de falla de pisada). Variable cuantitativa discreta: expresada en un rango de 0 a 100.
- b) Cantidad de colágena. Categórica ordinal. Consenso de dos observadores mediante microscopía óptica expresada en cruces (V.gr. +, ++, +++).
- c) Determinación de infiltrado inflamatorio. Categórica ordinal. Consenso de dos observadores mediante microscopía óptica expresada en cruces (V.gr. +, ++, +++).
- d) Peso muscular expresado en gramos. Variable cuantitativa continua. El peso muscular del conjunto de gastrocnemios y sóleo de la extremidad estudiada determinado por balanza electrónica.

### 9.4 TAMAÑO DE MUESTRA.

Debido a que se trata de un estudio exploratorio, y estimado en base a publicaciones de otros investigadores se estableció como tamaño de muestra distribuido de la siguiente manera:

Evaluación a las 6 semanas: 12 ratas.

Grupo control (n = 6); grupo experimental con submucosa de intestino de cerdo (n = 6)

Evaluación a las 12 semanas: 12 ratas.

Grupo control (n = 6); grupo experimental con submucosa de intestino de cerdo (n = 6)

## 9.5 DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.

Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se asignaron de manera aleatoria a uno de los cuatro grupos experimentales y finalmente se transportaron al Laboratorio de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE donde se les realizó la cirugía, la neurotomía y las neurorrafias o reparaciones nerviosas.

### 9.5.1 MODELO DE LESIÓN DE NERVIIO CIÁTICO.

Antes de realizar la cirugía, las ratas se anestesiaron, previa asepsia abdominal utilizando una mezcla de ketamina (77.5mg/kg de peso) y xilocina (12.5mg/kg de peso) por vía intraperitoneal. El sitio quirúrgico para todas las ratas fue la región lateral del muslo derecho. Bajo anestesia general en decúbito prono, previa tricotomía y en condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó una incisión de 30mm en la parte posterior del muslo, perpendicular al eje longitudinal del fémur, realizando disección por planos y divulsión de músculo glúteo superficial separándolo del músculo bíceps femoral para exposición del nervio ciático. Después de aislar el nervio, se utilizaron asas vasculares para ayudar con la elevación desde el fondo del campo quirúrgico. Se utilizó irrigación con solución salina tibia durante todo el procedimiento para mantener las condiciones de humedad. Se determinó el punto de sección nerviosa con regla localizándolo en el tercio medio y señalándolo con marcador quirúrgico permanente o violeta de genciana. Se realizó un corte en los puntos marcados con tijeras microquirúrgicas. Las neurotomías se repararon con sutura microquirúrgica mediante cuatro puntos de sutura epineural con nylon 10-0. En el grupo experimental un segmento rectangular de submucosa de intestino de cerdo previamente recortado con dimensiones de 7x5mm se enrolló sobre el sitio de reparación nerviosa para conformar una estructura tubular cubriendo la reparación. El grupo control correspondió a ratas Wistar en las cuales se provocó una lesión nerviosa por sección y corte en el tercio medio del nervio ciático derecho; esta lesión se reparó de manera primaria bajo el microscopio de operaciones realizando sutura epineural con cuatro puntos

de nylon 10-0 sin colocar la submucosa de intestino de cerdo. Ver Figura 2 paneles A, B y C.

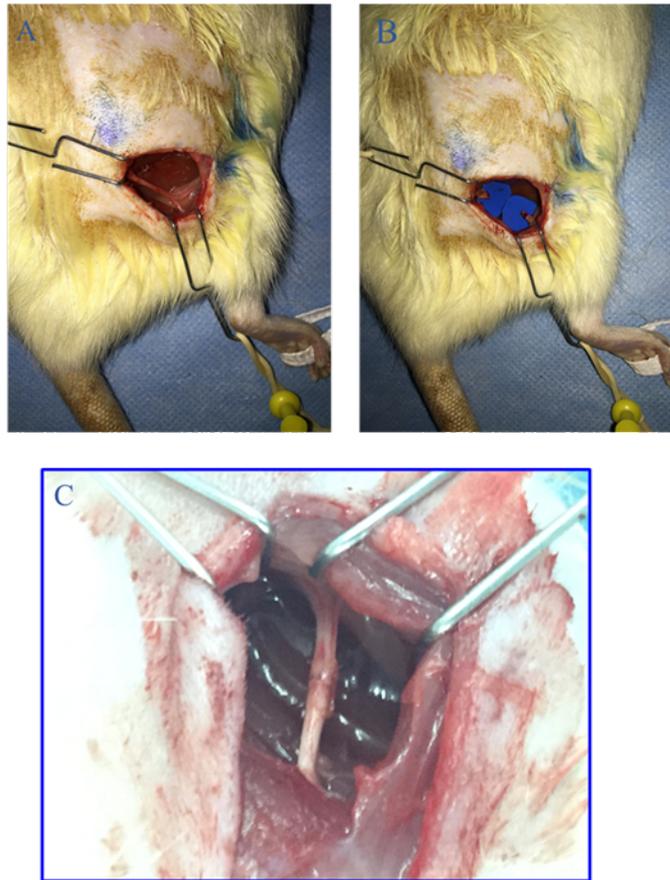


Figura 2. Panel A: Abordaje quirúrgico del nervio ciático en extremidad posterior derecha identificando el sitio donde se realizará la neurotomía y neurorrafia. Panel B: Sección nerviosa en el tercio medio del nervio. Se procede a realizar la neurorrafia con cuatro puntos de sutura Nylon 10-0. Panel C: Neurorrafia; lámina de submucosa de intestino de cerdo alrededor del sitio de reparación.

#### 9.5.2 EVALUACIÓN FUNCIONAL DE CAMINATA EN REJILLA (GRID WALKING TEST), ESTABLECIENDO LA FALLA DE PISADA.

La prueba de caminata en rejilla es muy sensible para evaluar tanto la función motora como la sensitiva. Para realizar esta prueba, se hizo caminar a los animales de experimentación sobre un

mallado suspendido del suelo para valorar las fallas en la pisada de acuerdo a lo publicado por otros autores [Sedy, et. al. 2008]. En este protocolo utilizamos un mallado de 50x50cm, suspendido entre dos barras a 2cm sobre el suelo y con orificios regulares de 2.5x2.5cm. La prueba se lleva a cabo cuantificando 50 pasos de cada una de las ratas. La cuantificación se llevó a cabo por tres observadores cegados al respecto del procedimiento realizado, colocados uno al frente y uno a cada lado del mallado de evaluación. Se cuantificaron las fallas completas y parciales de la pisada. Se define como una falla parcial cuando el animal retrae la extremidad al momento de meterla en el orificio sin tocar el suelo o superficie de sustentación. Se define una falla de pisada completa cuando la extremidad posterior evaluada entra al orificio en la gradilla y toca el piso. Con estos datos se obtiene un porcentaje de falla en pisada mediante la siguiente fórmula:

$$[ (\text{Número de fallas parciales} \times 1) + (\text{Número de fallas completas} \times 2) ] / \text{Número de pisadas} \times 100.$$

Es decir, la suma de fallas parciales multiplicada por 1 más la suma de fallas completas multiplicada por 2; se suman y se dividen entre el número total de pisadas, multiplicando el resultado por 100. Esta valoración funcional se llevó a cabo antes del procedimiento quirúrgico inicial, en el punto medio de la evolución e inmediatamente antes del sacrificio del espécimen (Ver Figura 3), paneles A, B y C.

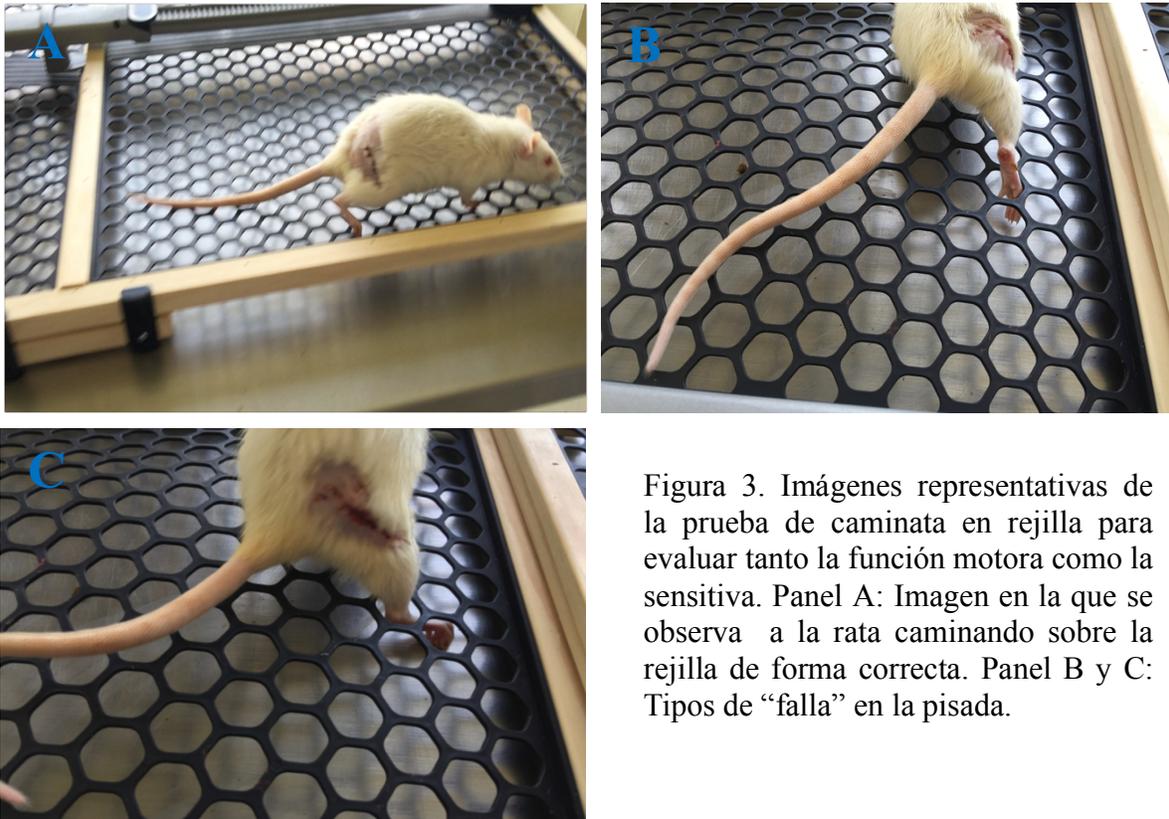


Figura 3. Imágenes representativas de la prueba de caminata en rejilla para evaluar tanto la función motora como la sensitiva. Panel A: Imagen en la que se observa a la rata caminando sobre la rejilla de forma correcta. Panel B y C: Tipos de “falla” en la pisada.

### 9.5.3 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y EXPLANTACIÓN DEL NERVIIO CIÁTICO.

Inmediatamente después de la última determinación funcional (porcentaje en falla de pisada sobre malla), las ratas fueron sacrificadas de manera individual. Bajo anestesia intraperitoneal en plano profundo fueron sometidas a perfusión intracardiaca para fijación tisular. Mediante toracotomía se realizó canulación de ventrículo izquierdo e instilación manual de solución salina para limpiar el lecho vascular; se realizó transección de la aurícula derecha para permitir el drenaje de la sangre hasta permitir un total aclaramiento mediante la solución inyectada. Se procedió a la perfusión intracardiaca de formalina al 10%. [Kasukurthi et. al. 2009; Gage, et. al. 2012]. Se realizó disección quirúrgica cuidadosa de las regiones posteriores del muslo y glúteo derechos mediante lupas de

aumento (4X) y se resecó el segmento de nervio ciático derecho extrayendo asimismo la submucosa de intestino de cerdo en los casos en que se había implantado; realizando al mismo tiempo inspección de la zona y documentación fotográfica. Se procedió de la misma manera en la extremidad posterior izquierda (nervio no intervenido). Los nervios extraídos se colocaron en papel cartoncillo para mantener su orientación longitudinal y evitar su encogimiento y se procedió a su inmersión en formalina al 10% durante 24 horas. Ver Figura 4.



Figura 4.- Imagen representativa en la que se muestra la forma en la cual fueron obtenidos los tejidos que fueron analizados posterior al sacrificio.

#### 9.5.4 EVALUACIÓN DE LA ATROFIA MUSCULAR.

En cada uno de los especímenes, al momento de realizar la explantación del nervio ciático intervenido, se realizó la disección y procuración de los músculos inervados por éste (gastrocnemios y sóleo). Se utilizó como control la masa muscular compuesta por gastrocnemios y sóleo en el lado contralateral (izquierdo) en el que no se realizó ninguna intervención previa. Se determinaron los pesos de los músculos utilizando una balanza analítica y se determinaron las posibles diferencias entre los grupos estudiados. Ver Figura 5.

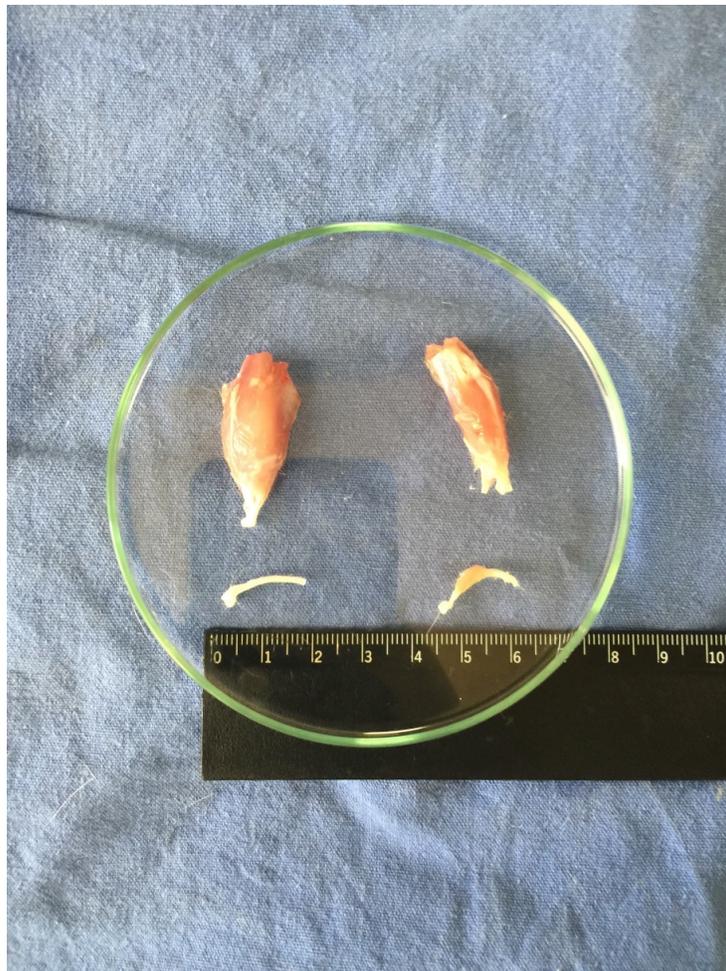


Figura 5.- Se extirpó el nervio ciático intervenido (derecho) y no intervenido (izquierdo) con la masa muscular de gastrocnemios y sóleo correspondiente de cada uno de los especímenes.

### 9.5.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Para el estudio histológico, fragmentos de nervio ciático de 10mm de longitud (con o sin matriz de submucosa de intestino de cerdo) se fijaron en formalina al 10% durante 72 horas. Posteriormente los fragmentos de tejido fueron procesados mediante la técnica histológica; por lo que estos se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales (60°, 70°, 80°, 96°, 96°) seguidas de dos cambios de xilol terminando con 2 baños de parafina, cada paso de 1 hora de duración. Finalmente, los nervios fueron incluidos de manera longitudinal en un bloque de parafina; se realizaron cortes (nervio ciático de 10mm de longitud cada corte) a un espesor de 5µm mediante un microtomo manual. Los cortes fueron adheridos en un baño de flotación a portaobjetos previamente gelatinizados.

Los cortes obtenidos fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) y la técnica Tricrómico de Masson (Anexo 1 y 2); mientras que otro grupo de laminillas fueron procesadas con la técnica de plata específica para tejido nervioso Doble Impregnación de Río-Hortega.

El análisis histopatológico fue realizado por dos observadores (en estudio de tipo ciego) mediante un microscopio Zeiss Axio Lab.1 con software de digitalización de imágenes. Se revisaron 144 cortes de nervio ciático (6 laminillas/animal/grupo) identificando aspectos morfológicos relevantes (Figura 6) que indicaran alteraciones visibles tales como: células de infiltrados inflamatorios (indicador de procesos agudos o crónicos), fibras nerviosas dañadas (degeneración Walleriana), presencia de macrófagos (proceso de inflamación crónica), fibras de colágena (indicador de fibrosis), desmielinización (lesión primaria de mielina) y vasos sanguíneos endoneurales preservados, los cuales fueron reportados de manera semi-cuantitativa e indicados con cruces (+ leve; ++ moderada; +++ severa) [Mazzer, et. al. 2000].

## **9.6 CONSIDERACIONES FINANCIERAS.**

Se utilizaron recursos asignados al Laboratorio del Departamento de Neuroquímica en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y del Laboratorio de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE en la Ciudad de México.

## **9.7 LUGAR DONDE SE LLEVÓ A CABO LA INVESTIGACIÓN.**

Los procedimientos quirúrgicos iniciales, las evaluaciones de función motora y los cuidados de los animales se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional “20 de noviembre” del ISSSTE. El sacrificio de los especímenes, la perfusión intracardiaca, el procedimiento de explantación nerviosa y el análisis histológico de los tejidos se llevó a cabo en el Departamento de Neuroquímica y en el Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” en la Ciudad de México.

## **9.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis estadístico de los datos correspondientes a evaluación funcional (Escala compuesta de falla de pisada) se realizó por medio de una prueba paramétrica ANOVA de medidas repetidas de una vía, siendo contrastada por la prueba de esfericidad de Mauchly, tomando como valor significativo a  $p < 0.05$ . El análisis estadístico de los datos correspondiente a peso muscular (Variable continua expresada en gramos) se realizó por medio de una prueba T de Student para muestras independientes, tomando como valor significativo a  $p < 0.05$ . Lo anterior se realizó después de corroborar que los valores mostraron una homogeneidad de varianzas determinada con la prueba de Levene y una distribución normal aplicando la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el programa de cómputo SPSS versión 22.0.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FUNCIONAL.

#### 10.1.1 Resultados del desempeño funcional evaluado con la prueba de falla de pisada valorada en rejilla (Composite foot fault score) a las 6 semanas.

La evaluación funcional se realizó con la Escala compuesta de falla de pisada (Composite foot fault score). La comparación entre el grupo experimental (n=6) y el grupo control (n=6) en el grupo con la evaluación más temprana, es decir a las 6 semanas se llevó a cabo en 4 tiempos: antes del procedimiento quirúrgico (tiempo 0), 1 semana después del procedimiento quirúrgico, 4 semanas después del procedimiento quirúrgico y 6 semanas después del procedimiento quirúrgico inmediatamente antes del sacrificio del animal.

La aplicación de ANOVA de medidas repetidas para comparar los dos grupos en cada uno de los momentos muestra falta de significancia  $p=0.786$ ; es decir sin diferencia entre los dos grupos.

Las medias y desviaciones estándar se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 3		Media	Desviación estándar	N
Tiempo 0	Experimental	.1667	.40825	6
	Control	.1667	.40825	6
	Total	.1667	.38925	12
Post1Semana	Experimental	7.0000	1.41421	6
	Control	7.1667	1.16905	6
	Total	7.0833	1.24011	12
Post4Semanas	Experimental	5.3333	1.03280	6
	Control	5.0000	.89443	6
	Total	5.1667	.93744	12
Post6Semanas	Experimental	4.3333	1.50555	6
	Control	4.5000	1.37840	6
	Total	4.4167	1.37895	12

Se puede observar una tendencia de menor déficit funcional (Falla de pisada en rejilla) a las 6

semanas en ambos grupos experimentales al ser comparados con el desempeño funcional 1 semana después del evento quirúrgico. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 6.

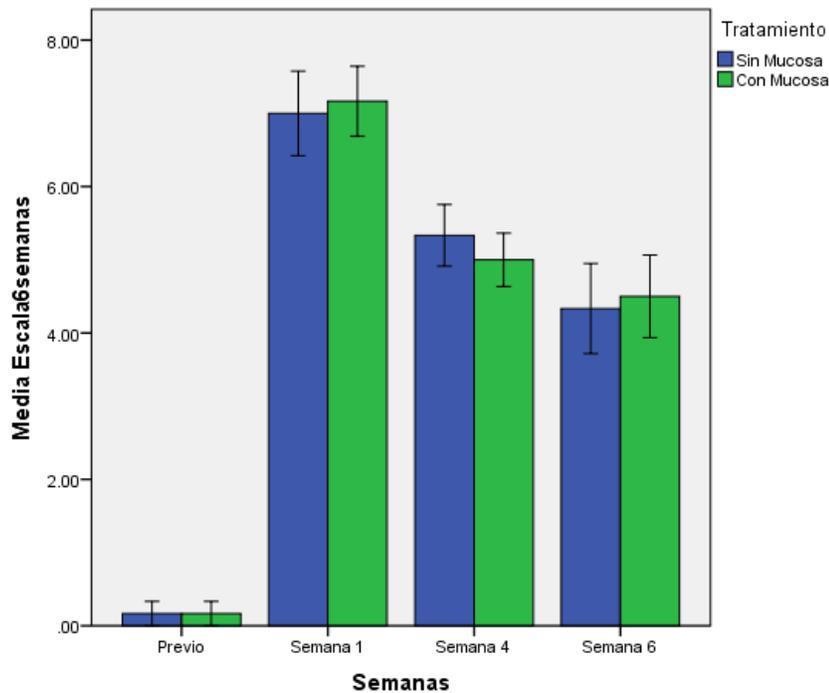


Figura 6. Grafica en la que se muestran los resultados del desempeño funcional de los animales evaluados con la prueba de caminata en rejilla (Grid walking test) previo a la lesión (previo) y a 1, 4 y 6 semanas después del daño en animales control (sin mucosa) comparados con el grupo experimental (con mucosa). Los valores están dados en medias  $\pm$  E.E. ANOVA de medidas repetidas

### 10.1.2 Resultados del desempeño funcional evaluado con la prueba de falla de pisada valorada en rejilla (Composite foot fault score) a las 14 semanas.

La evaluación funcional se realizó con la Escala compuesta de falla de pisada (Composite foot fault score). La comparación entre el grupo experimental (n=6) y el grupo control (n=6) en el grupo con

la evaluación más tardía, es decir a las 14 semanas, se llevó a cabo en 3 tiempos: antes del procedimiento quirúrgico (tiempo 0), 1 semana después del procedimiento quirúrgico y 14 semanas después del procedimiento quirúrgico inmediatamente antes del sacrificio del animal.

La aplicación de ANOVA de medidas repetidas para comparar los dos grupos en cada uno de los momentos no fue significativa al comparar los grupos 1 semana después del procedimiento quirúrgico; sin embargo fue muy significativa en el momento de corte final,  $p < 0.0001$ .

\*Se puede observar una marcada diferencia en las medias (Escala compuesta de falla de pisada) en los dos grupos comparados a las 14 semanas comparado con la similitud de medias a la semana 1 después del procedimiento. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 7.

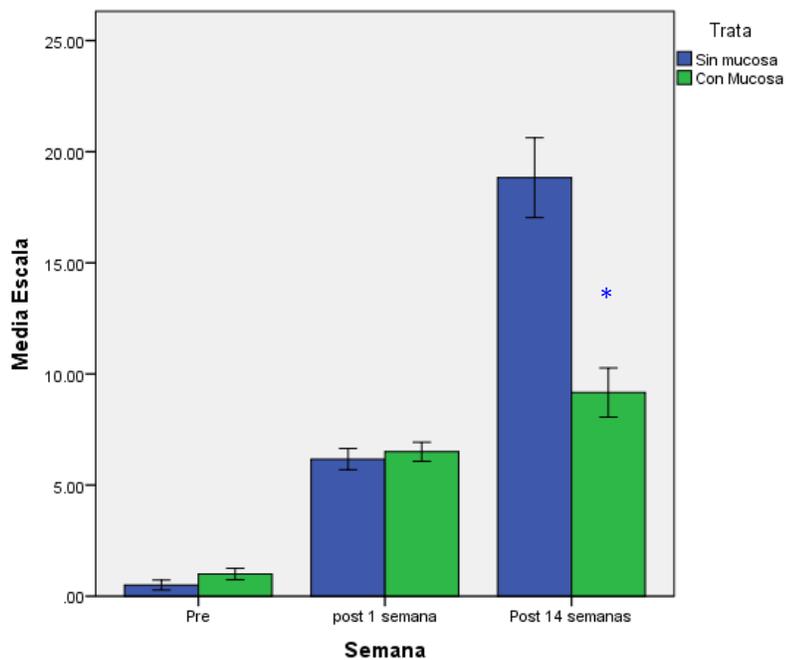


Figura 7. Gráfica en la que se muestran los resultados del desempeño funcional de los animales evaluados con la prueba de caminata en rejilla (Grid walking test) previo a la lesión (previo) y a 1 y 14 semanas después del daño en animales control (sin mucosa) comparados con el grupo experimental (con mucosa). Los valores están dados en medias  $\pm$  E.E. ANOVA de medidas repetidas. \* $p < 0.0001$ .

## 10.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE ATROFIA MUSCULAR.

La evaluación de los pesos musculares del conjunto gastrocnemios y sóleo derechos se realizó tras haber sacrificado cada animal y teniendo como control el conjunto gastrocnemios y sóleo izquierdos. La diferencia expresada en gramos entre los pesos de los músculos ipsilaterales al nervio seccionado y reparado (y por lo tanto atróficos) y su control contralateral constituido por músculo sano fue la que se comparó entre los distintos grupos.

La comparación entre el grupo experimental (n=6) y el grupo control (n=6) en el grupo con la evaluación más temprana, es decir a las 6 semanas no fue significativa tras la prueba T arrojando una  $p=0.516$ . La comparación entre el grupo experimental (n=6) y el grupo control (n=6) en el grupo con la evaluación más tardía, es decir a las 14 semanas no fue significativa tras la prueba T arrojando una  $p=0.141$ .

Puede apreciarse la similitud entre las medias de los grupos a los que se les agregó submucosa de intestino de cerdo sobre el sitio de reparación nerviosa y los grupos en que no se agregó submucosa de intestino de cerdo sobre el sitio de reparación nerviosa.

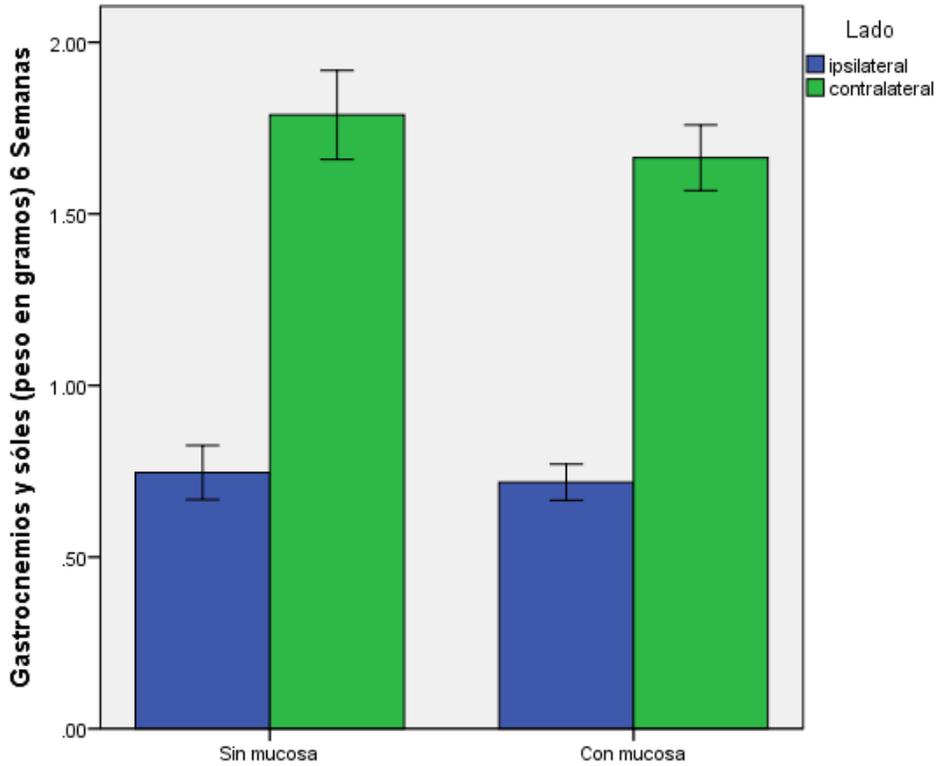


Figura 7. Gráfica en la que se muestran los pesos musculares del conjunto gastrocnemios y sóleo de los animales evaluados a las 6 semanas después del daño. Ratas control (sin mucosa) comparados con el grupo experimental (con mucosa). Los valores están dados en medias  $\pm$  E.E. Prueba de T para medidas independientes.

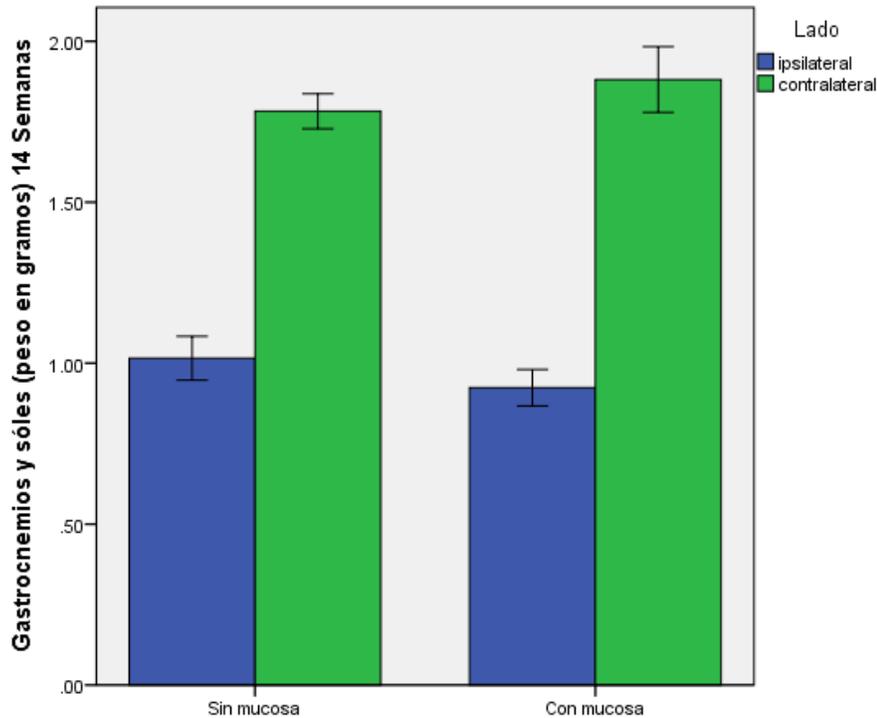


Figura 8. Grafica en la que se muestran los pesos musculares del conjunto gastrocnemios y sóleo de los animales evaluados a las 14 semanas después del daño. Ratas control (sin mucosa) comparados con el grupo experimental (con mucosa). Los valores están dados en medias  $\pm$  E.E. Prueba de T para medidas independientes.

### 10.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Los resultados obtenidos del estudio histopatológico mostraron al nervio ciático del grupo control (6 y 14 semanas de tratamiento) en forma longitudinal con fibras nerviosas rodeadas de mielina, presencia de algunas fibras de colágena, numerosos núcleos de células de Schwann, vasos sanguíneos endoneurales y una cápsula de tejido conectivo formando el epineuro (Fig. 9 A y 10 A).

### 10.3.1 Análisis histológico del grupo sacrificado a las 6 semanas.

En el grupo tratado con submucosa de cerdo a las 6 semanas, se observó un evidente infiltrado inflamatorio con presencia de linfocitos, neutrófilos, macrófagos y numerosos mastocitos (Fig. 9 D), más presencia de fibras de colágena principalmente en la zona del corte del nervio, mostrando así los dos extremos en donde se realizó la neurotomía (Fig. 9; B y C). Las fibras nerviosas con vainas de mielina se observan moderadamente conservadas (Fig. 9; B y C), así como también se encontraron algunos granulomas rodeando los puntos de sutura adyacentes al perineuro. Resultados similares fueron observados en el grupo experimental tratado sin submucosa de intestino de cerdo a las 6 semanas, mostrando procesos inflamatorios (Fig. 9; F y G), fibrosis inicial (Fig. 9 E), fibras nerviosas con mielina de forma conservada y granulomas rodeando los puntos de sutura (Fig. 9; F y G).

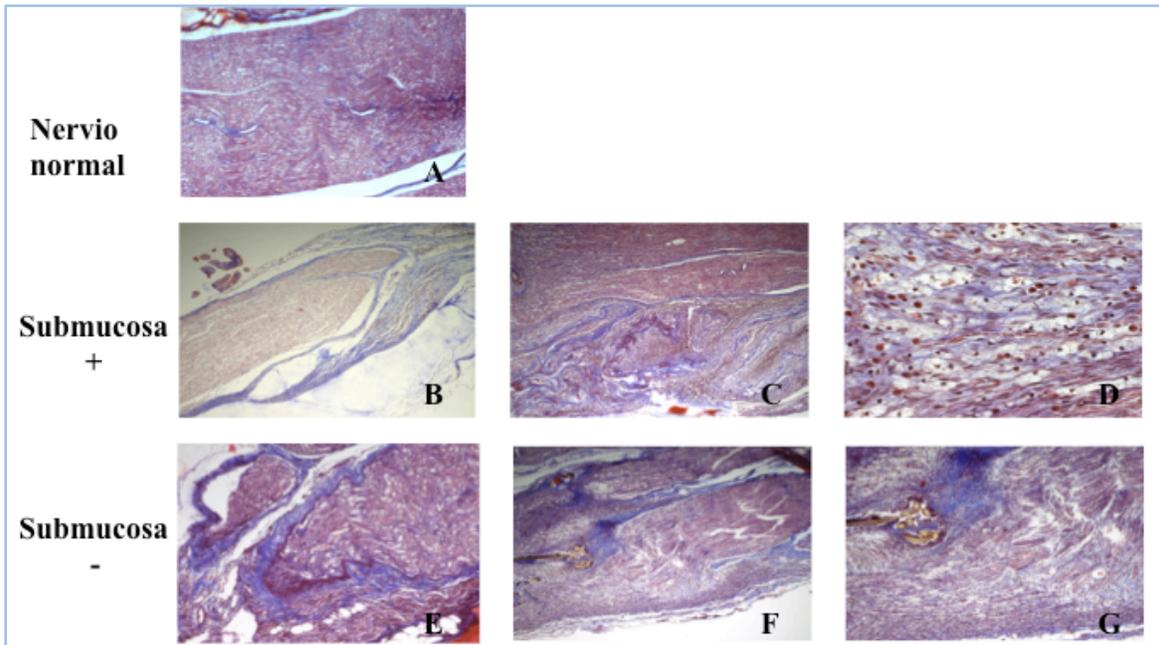


Figura 9. Fotomicrografías representativas de nervio ciático de rata con neurotomía del grupo de 6 semanas de tratamiento; con aplicación de OASIS (B, C y D) y sin aplicación de OASIS (E, F y G). A) Se observa nervio sano normal no lesionado mostrando fibras nerviosas intercaladas con núcleos de células de Schwann y vainas de mielina. B, C y D) muestra nervios seccionados con infiltrado inflamatorio profuso, intercalando fibras de colágena y edema intersticial. E, F y G) se observa el sitio de lesión con restos de sutura con presencia de granulomas, infiltrado inflamatorio y fibras de colágena. Técnica Tricrómico de Masson. 40X (A, C, E y G) 20X (B), 100X (D).

### 10.3.2 Análisis histológico del grupo sacrificado a las 14 semanas.

En los grupos experimentales evaluados a las 14 semanas (con o sin submucosa de cerdo), se observa en el sitio de lesión, una disminución en el infiltrado inflamatorio con presencia de algunos mastocitos (Fig. 10; B y E), existe un evidente daño de las vainas de mielina produciendo procesos de desmielinización (Fig. 10; B, E y F) con significativa presencia de edema (Fig. 10; B y F), incremento en las células de Schwann y destrucción de fibras nerviosas con una marcada presencia de fibras de colágena formando fibrosis (Fig. 10; C, D y E). También se observó la presencia de granulomas en regiones adyacentes a los puntos de sutura. No se observaron diferencias histopatológicas evidentes entre los grupos evaluados a las 14 semanas.

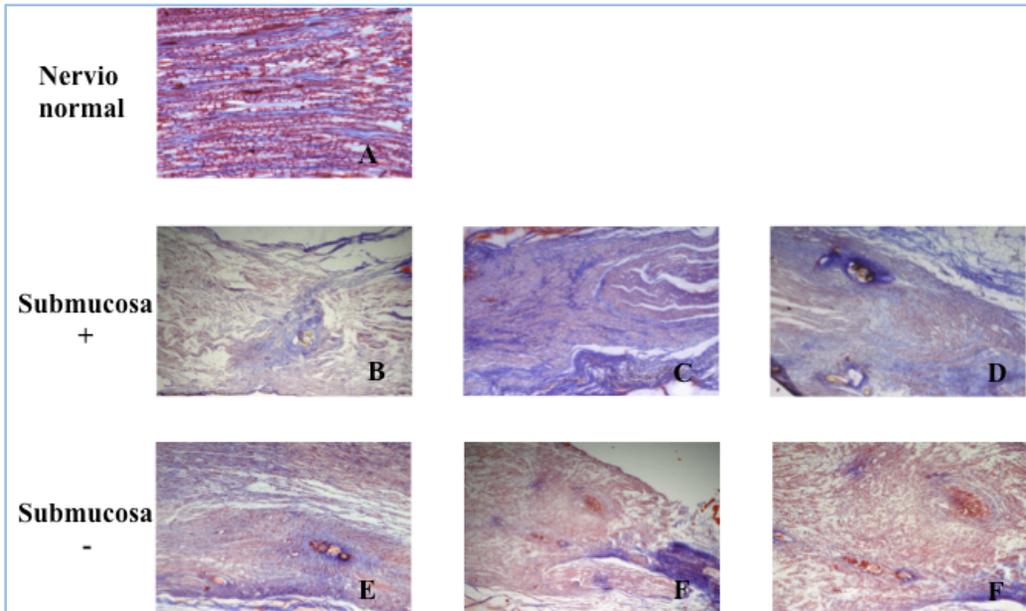


Figura 10. Fotomicrografías representativas de nervio ciático de rata con neurotomía del grupo de 14 semanas de tratamiento; con aplicación de OASIS (B, C y D) y sin aplicación de OASIS (E, F y G). (A) Se observa nervio sano normal no lesionado mostrando fibras nerviosas intercaladas con núcleos de células de Schwann y vainas de mielina. En el grupo tratado con OASIS se observa marcada fibrosis con incremento en las fibras de colágena con restos de sutura intercalada (B, C y D). En el grupo tratado sin OASIS se observa fibrosis con edema intersticial, con restos de infiltrado inflamatorio. Técnica Tricrómico de Masson. 200X (A, B, C, D, E y F) y 400X (G).

Estas observaciones se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 4**

		<b>Infiltrado inflamatorio</b>	<b>Fibrosis</b>	<b>Desmielinización</b>
6 semanas	Nervio normal	--	--	--
	c/OASIS	+++	+	++
	s/OASIS	+++	-	++
14 semanas	Nervio normal	--	--	--
	c/OASIS	+	++++	+++
	s/OASIS	+	++++	+++

Tabla 4. Resultados de la evaluación morfológica semi-cuantitativos de las alteraciones en el nervio ciático de rata en los diferentes grupos tratados.

## 11. DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que las ratas Wistar a las que se les agregó submucosa de intestino de cerdo no muestran una diferencia en el desempeño motor al ser evaluadas a las 6 semanas con la Escala de falla de pisada en gradilla. Es interesante la clara diferencia que pudimos observar entre los grupos cuando se evaluaron a las 14 semanas lo que sería consistente con lo reportado por Yi, et. al. [2013] quienes utilizando submucosa de intestino de cerdo procesada por ellos mismos repararon brechas nerviosas de 5mm obteniendo mejores respuestas motoras comparadas contra reparación por medio de un cilindro de silicón; el mayor número de axones y mayor grado de mielinización al usar la submucosa de intestino de cerdo observado por estos autores no se replicó en nuestro estudio. A este respecto llama la atención que este mejor desempeño motor entre los animales intervenidos en nuestro estudio no corresponda con la masa muscular de la extremidad estudiada, ya que mostraron el mismo grado de atrofia muscular que los controles; y los controles contralaterales estuvieron en medias y rangos de peso esperados para animales similares de acuerdo con lo reportado por Norenberg, et. al. [2004]. Si bien, los pesos de los grupos musculares se mantuvieron con medias muy similares (atróficos en ambos grupos), no podemos asegurar que esta situación se mantuviera en el supuesto de llevar el experimento a etapas más prolongadas cuando la reinervación a la placa motora teóricamente ya se habría llevado a cabo y esto ocasionara una recuperación de masa y volumen al músculo reinervado de manera efectiva. Otra manera de explicar la falta de correlación entre el desempeño motor y el grado de atrofia muscular de los animales al ser evaluados a las 14 semanas sería una reinervación más adecuada y más temprana de los receptores sensitivos en comparación con los efectores motores. Aunque esto pudiera explicar la situación observada, se contrapone a lo reportado previamente en la literatura asignando un peor pronóstico de recuperación a la función sensitiva comparada con la motora [Flores, et. al. 2010]. Por otro lado, esta explicación cobraría mayor validez entre más

avanzado es el proceso de denervación, ya que los receptores sensitivos terminales, tales como corpúsculos de Paccini, corpúsculos de Meissner y células de Merkel pueden permanecer hasta 2-3 años sin ser reinervados después de la lesión; de tal manera que la función nerviosa puede recuperarse incluso después que la función muscular se ha perdido de manera permanente [Menorca, et. al. 2013].

Es al respecto de las características de cicatrización o diferentes patrones de fibrosis entre los distintos grupos donde se hicieron las observaciones más amplias. El motivo principal por el que se llevó a cabo esta investigación fue determinar la influencia de un componente biológico obtenido de tejidos de otra especie sobre la inflamación y la fibrosis que pudieran ocurrir alrededor de un tejido tan delicado como el nervioso. Nuestras observaciones no lograron demostrar en ninguna medida que después de una lesión nerviosa la submucosa de intestino de cerdo modulara la cicatrización. A diferencia de lo reportado por Kokkalis, et. al. [2010], cuyo experimento consistió en la envoltura de nervios ciáticos de conejo sin provocar lesión alguna y que demostró una modulación favorable de la cicatrización catalogada en su estudio como grados de adherencias, mielinización y vascularización, en nuestro estudio la respuesta inflamatoria y profibrótica fue más bien florida y aumentó con el paso del tiempo; sin olvidar que en su modelo no se provocó una solución de continuidad de los tejidos conectivos perineurales. Una posible explicación de la respuesta inflamatoria tan marcada en nuestro experimento sería la incompatibilidad entre las especies (rata y cerdo). Ya se habían llevado a cabo antes consideraciones sobre biocompatibilidad de este tipo de componentes biológicos, e.g. submucosa de intestino de cerdo utilizada para reparar pared abdominal en rata, con resultados poco alentadores, describiendo una respuesta inflamatoria extensa adyacente al tejido implantado [Petter-Puchner, et. al. 2006]. En contraparte, aunque no se había evaluado antes la biocompatibilidad entre submucosa de intestino de cerdo y tejido conectivo perineurial en rata, otros autores ya habían indagado la interacción entre la submucosa de intestino de cerdo y células de Schwann en un modelo in vitro, demostrando que las células de Schwann de rata muestran adecuadas características de adhesión,

migración y proliferación sobre la superficie de un implante constituido por submucosa de intestino de cerdo [Su, et.al. 2007]. Lo anterior nos permitiría suponer que en caso de existir alguna incompatibilidad biológica probablemente ésta sería con los componentes de tejido conectivo que envuelven al axón.

De acuerdo a lo investigado por nuestro grupo, hasta el momento no existía una evaluación del efecto de la submucosa de intestino de cerdo, un componente biológico por lo demás extendido en las áreas de reparación e ingeniería tisular, sobre los componentes de cicatrización en un nervio periférico lesionado, pero sin una brecha o solución de continuidad para valorar su efecto protector o promotor de una cicatrización controlada en los tejidos perineurales. Consideramos que deben llevarse a cabo más estudios para caracterizar de manera más precisa esta cicatrización perineural y las formas de modularla.

### **11.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.**

Consideramos que se utilizó el animal de experimentación más adecuado para este tipo de estudios. Esto de acuerdo a su perfil de bajo costo, manejabilidad, reproducibilidad, perfil inmunológico favorable para aloinjertos y xenoinjertos, factible de ser anestesiado por vía intraperitoneal y por la existencia de modelos similares realizados previamente [Ijkema, et. al. 2004; Vasudevan et. al. 2013]. Asimismo, consideramos que el haber elegido el modelo de sección nerviosa y cierre primario sin la creación de una brecha nerviosa fue suficiente y adecuado para valorar el componente inflamatorio y de fibrosis.

Podemos establecer dos limitantes del estudio. A pesar de que la evaluación motora se realizó en la situación más controlada posible, no se pudo evaluar la función motora mediante pruebas de electromiografía lo que habría aumentado objetividad a las determinaciones. Por otro lado, el no haber realizado determinaciones de la función sensitiva no permite establecer generalizaciones sobre este componente de un nervio mixto, sobre todo cuando se identifican inconsistencias entre el desempeño motor y el grado de atrofia muscular identificado en los diferentes grupos.

## **12. CONCLUSIÓN.**

Los resultados de este trabajo indican que no existen diferencias histomorfológicas entre los patrones de cicatrización perineural entre grupos de ratas Wistar a los que se les realizó neurotomía con reparación primaria y grupos en que además de la reparación primaria se agregó una envoltura constituida por submucosa de intestino de cerdo. Es importante destacar que en términos de función motora sí existe una diferencia clara no relacionada con el volumen muscular preservado después de la lesión. Fundamentalmente podemos concluir que a pesar de que se comercialice un análogo al utilizado en nuestro estudio como un conducto protector de reparaciones nerviosas, al momento no existe evidencia que sustente su uso para tal indicación.

### **12.1 ESTUDIOS FUTUROS.**

Este trabajo constituye un buen acercamiento para entender los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la lesión y reparación del nervio periférico. Se pueden utilizar los datos obtenidos para realizar estudios similares en los que se evalúe la función sensitiva por medios tanto subjetivos como objetivos y de esta manera correlacionar de una manera más adecuada los resultados de las pruebas de función motora.

## 13. ANEXOS

### 13.1 ANEXO 1. Técnica de Hematoxilina-Eosina.

- A. 2 x10 minutos en xileno para desparafinar.
- B. 2 x10 minutos en etanol 100°.
- C. 10 minutos en etanol 96°.
- D. 10 minutos en etanol 80°.
- E. 10 minutos en etanol 50°.
- F. 5 minutos en agua.
- G. 5-10 minutos en Hematoxilina de Harris.
- H. 3 minutos en agua corriente. Diferenciación.
- I. 0.5 a 2 minutos en Eosina al 0.2%.
- J. 3 minutos en agua.
- K. Tiempo variable en 70° para diferenciación.
- L. 5 minutos en etanol 96°.
- M. 2 x10 minutos en etanol 100°.
- N. 2 x10 minutos en xileno.
- O. Montado con medio de montaje.

**Resultados:** Colágeno: rosa pálido. Músculo: rosa fuerte. Queratina: rojo intenso. Citoplasma: rosado. Núcleos: azul oscuro o púrpura (en realidad se tiñe sólo la cromatina). Eritrocitos: color cereza.

### 13.2 ANEXO 2. Técnica de Tricrómico de Masson.

- A. 2 x 10 minutos en xileno para desparafinar.
- B. 2 x 10 minutos en etanol 100°.
- C. 10 minutos en etanol 96°.
- D. 10 minutos en etanol 80°.
- E. 10 minutos en etanol 50°.
- F. 5 minutos en agua destilada.
- G. Sumergir las secciones en solución de Bouin durante 24 horas a temperatura ambiente o 1 hora a 56-60°C.
- H. Lavar en agua corriente.
- I. 3 x 3 minutos en agua destilada.
- J. 5 minutos en Hematoxilina férrica de Weigert.
- K. 5 minutos en agua corriente para diferenciación.
- L. 3 minutos de lavado en agua destilada.
- M. 5 minutos en fucsina-escarlata.
- N. 2 minutos lavado en agua.
- O. 15 minutos en ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada.
- P. 10 minutos en azul de anilina.
- Q. Lavado en agua.
- R. 1 minuto de diferenciación con ácido acético al 1% en agua destilada.
- S. Deshidratado rápido, unos segundos, en etanol de graduación creciente: 80°, 96° y 100°.
- T. 2 x10 minutos en xileno.
- U. Montado con medio de montaje.

**Resultados.** Colágeno: verde azulado. Músculo: rojo, marrón. Citoplasma: rosado. Núcleos: negro.

Citoplasma: rosado.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The Incidence of Peripheral Nerve Injury in Extremity Trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008;87(5):381–385.
2. Ciaramitaro P, Mondelli M, Logullo F, et. al. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2010;15(2):120-127.
3. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1998;45(1):116-122.
4. Romero-Ortega M. Peripheral Nerves, Anatomy and Physiology of. In: Jaeger D, Jung R, eds. *Encyclopedia of Computational Neuroscience.* New York: Springer; 2015:2320-2323.
5. Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-13.
6. Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, De la Garza-Castro O, Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S. Study of peripheral nerve injury in trauma patients. *Gac Méd Méx.* 2014;150(6):527-532.
7. Ruijs AC, Jaquet JB, Kalmijn S, et al. Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(2):484–494.
8. Snell RS, ed. *Clinical Neuroanatomy.* 7th ed. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins; 2009.
9. Stewart JD. Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve.* 2003;28(5):525–541.
10. Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and Physiology of Peripheral Nerve

- Injury and Repair. *Am J Orthop*. 2010;29(3):167-173.
11. Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin*. 2013;29(3):317-330.
  12. Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *BMJ*. 1942, 2(4260):237-239.
  13. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74(4):491-516.
  14. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989;22:257–273.
  15. Mackinnon SE. Double and multiple “crush” syndromes. Double and multiple entrapment neuropathies. *Hand Clin*. 1992;8:369-390.
  16. Bittner GD, Schallert T, Peduzzi JD. Degeneration, trophic interactions, and repair of severed axons: a reconsideration of some common assumptions. *Neuroscientist*. 2000;6(2):88–109.
  17. Waller A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Phil Trans R Soc Lond*. 1850;140:423-429.
  18. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:141-172.
  19. Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci*. 2003;23(36):11479-11488.
  20. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol*. 1943;102(2):191–215.
  21. Kang JR, Zamorano DP, Gupta R. Limb salvage with major nerve injury: current management and future directions. *J Am Acad Orthop Surg*. 2011;19(S1):S28–S34.
  22. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve

- transfers, and end-to-side neuroorrhaphy. *Exp Neurol*. 2010;223(1):77-85.
23. Moore A, Kasukurthi R, Magill CK, Farhadi FH, Borschel GH, Mackinnon SE. Limitations of conduits in peripheral nerve repairs *Hand*. 2009;4(2):180–186.
  24. Pabari A, Lloyd-Hughes H, Seifalian AM, Mosahebi A. Nerve Conduits for Peripheral Nerve Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(6):1420–1430.
  25. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury*. 2012;43(5):553–572.
  26. Lee JY, Parisi TJ, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Does the Addition of a Nerve Wrap to a Motor Nerve Repair Affect Motor Outcomes? *Microsurgery*. 2014;34(7):562–567.
  27. Isaac C, Rego FMP, de-Ladeira PRS, Altram SC, De-Oliveira RC, Aldunate JLCB, et al. Construction of a skin substitute composed of porcine collagen matrix populated with human dermal fibroblasts and keratinocytes: histological evaluation. *Rev Bras Cir Plást*. 2012;27(4):503-508.
  28. Shim SW, Kwon DY, Lee BN, Kwon JS, Park JH, Lee JH, et al. Evaluation of Small Intestine Submucosa and Poly(caprolactone-co-lactide) Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(5):1142-1151.
  29. Petter-Puchner AH, Fortelny RH, Mittermayr R, Walder N, Ohlinger W, Redl H. Adverse effects of porcine small intestine submucosa implants in experimental ventral hernia repair. *Surg Endosc*. 2006;20:942–946.
  30. Niezgoda JA, Van Gils CC, Frykberg RG, Hodde JP. Randomized clinical trial comparing OASIS wound matrix to regranex gel for diabetic ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2005;18(5):258-266.
  31. Ambro BT, Zimmerman J, Rosenthal M, Pribitkin EA. Nasal septal perforation repair with porcine small intestinal submucosa. *Arch Facial Plast Surg*. 2003;5(6):528–529.

32. Franklin ME Jr, Gonzalez JJ Jr, Glass JL. Use of porcine small intestinal submucosa as a prosthetic device for laparoscopic repair of hernias in contaminated fields: 2-year follow-up. *Hernia*. 2004;8:186–189.
33. Kini S, Gagner M, de Csepel J, Gentileschi P, Dakin G. A biodegradable membrane from porcine intestinal submucosa to reinforce the gastrojejunostomy in laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg*. 2001;11:469–473.
34. Mantovani F, Trinchieri A, Castelnuovo C, Romanò AL, Pisani E. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix. *Eur Urol*. 2003;44:600–602.
35. Fiala R, Vidlar A, Vrtal R, Belej K, Student V. Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures. *Eur Urol*. 2007;51:1702–1708.
36. Rutner AB, Levine SR, Schmaelzle JF. Processed porcine small intestine submucosa as a graft material for pubovaginal slings: durability and results. *Urology*. 2003;62:805-809.
37. Mostow EN, Haraway GD, Dalsing M, Hodde JP, King D; OASIS Venus Ulcer Study Group. Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. *J Vasc Surg*. 2005;41(5):837-843.
38. Shi L, Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *Int J Burns Trauma*. 2013;3(4):173-179.
39. Smith RM, Wiedl C, Chubb P, Greene CH. Role of small intestine submucosa (SIS) as a nerve conduit: preliminary report. *J Invest Surg*. 2004;17:339–344.
40. Kokkalis ZT, Pu C, Small GA, Weiser RW, Venouziou AI, Sotereanos DG. Assessment of Processed Porcine Extracellular Matrix as a Protective Barrier in a Rabbit Nerve Wrap Model. *J Reconstr Microsurg*. 2010;27(1):19-28.
41. Yi JS, Lee HJ, Lee HJ, Lee IW, Yang JH. Rat Peripheral Nerve Regeneration Using Nerve Guidance Channel by Porcine Small Intestinal Submucosa. *J Korean*

- Neurosurg Soc.* 2013;53(2):65-71.
42. Xu J, Varitimidis SE, Fisher KJ, Tomaino MM, Sotereanos DG. The effect of wrapping scarred nerves with autogenous vein graft to treat recurrent chronic nerve compression. *J Hand Surg Am.* 2000;25(1):93-103.
  43. Orgel MG, Huser JW. A comparison of light and scanning electron microscopy in nerve regeneration studies. *Plast Reconstr Surg.* 1980;65(5):628-634.
  44. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(3):384-388.
  45. Jortner BS. Mechanisms of toxic injury in the peripheral nervous system: neuropathologic considerations. *Toxicol Pathol.* 2000;28(1):54-69.
  46. Mazzer PY, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Methods.* 2008;173(2):249-258.
  47. de Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of the sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77:634-643.
  48. Sedy J, Urdzikova L, Jendelova P, Sykova E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience Biobehav Rev.* 2008;32(3):550–580.
  49. Sexton KW, Rodriguez-Feo CL, Boyer RB, et. al. Axonal fusion via conduit-based delivery of hydrophilic polymers. *Hand.* 2015;10(4):688–694.
  50. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación de 22-08-2001.
  51. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting *In vivo* experiments: The ARRIVE guidelines. *J Physiol.* 2010;588(Pt 14):2519–2521.

52. Kasukurthi R, Brenner MJ, Moore AM, et. al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. 2009. *J Neurosci Methods*;184(2):303-309.
53. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J Vis Exp*. 2012;(65):e3564.
54. Norenberg KM, Fitts RH. Contractile responses of the rat gastrocnemius and soleus muscles to isotonic resistance exercise. *J Appl Physiol*. 2004;97(6):2322-2332.
55. Su Y, Zeng BF, Zhang CQ, Zhang KG, Xie XT. Study of biocompatibility of small intestinal submucosa (SIS) with Schwann cells in vitro. *Brain Res*. 2007;1145:41-47.
56. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004;25(9):1583–1592.
57. Vasudevan S, Yan JG, Zhang LL, Matloub HS, Cheng JJ. A rat model for long-gap peripheral nerve reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(4):871–876.
58. Peralta-Zamora L, Rivas-Manzano P, Estrada-Flores E, eds. *Manual de Técnicas Histológicas*. México; Ed. AGT, S.A.;1982.