



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIROGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ**

**EFEECTO DEL NIMODIPINO EN LA INTEGRACIÓN DE UN INJERTO
NERVIOSO SENSITIVO O MOTOR EN RATAS CON LESIÓN
EXPERIMENTAL DEL PLEXO BRAQUIAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
SUBESPECIALISTA EN NEUROTOLOGÍA

PRESENTA

MED. ESP. CARLOS ALBERTO ESTRADA TRISTÁN

TUTORA: DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ

COTUTOR: DR. ALEXANDER CÁRDENAS MEJÍA

México, D. F.

Enero 2008





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.

FIRMAS

DR. RICARDO COLIN PIANA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. CARLO PANE PIANESE
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DE NEUROTOLOGÍA

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
TUTORA

DR. ALEXANDER CÁRDENAS MEJÍA
COTUTOR

DEDICATORIA

Para aquella persona que, para bien ó para mal, me ha hecho lo que soy.

Para esa persona, que en la humildad de sus orígenes me ha mostrado el verdadero valor de las cosas.

Para esa persona, que desde la sencillez de su alma supo inculcar en mí el deseo de siempre buscar algo más.

Para esa persona, que con su ejemplo, me enseñó más de la vida que libro ó persona alguna, a avergonzarme del mal y a hacer con discreción el bien.

Para ella, siempre incondicional, siempre amorosa, siempre afectuosa, que perdona todo a pesar de mi indolencia.

Para mi Madre

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlo Pane, por su ejemplo, su amistad, su apoyo y por la gran cantidad de conocimientos y experiencia, no sólo de Medicina, que siempre me brindó de la manera más incondicional.

A la Dra. Lucinda Aguirre, quien compartió conmigo un poco de su experiencia y un mucho de su amistad, gracias sobre todo por el tiempo que me dedico, que es más valioso aún por lo escaso que es para ella.

A mis médicos adscritos de Neurología, por su saber y sobre todo por su paciencia en estos dos años, a la Dra. Vales por sus consejos, sus regaños y su manera de ver la vida; al Dr. Hernández por su experiencia en cirugía, su hiperactividad que contagia y el apoyo que me dio. Al Dr. Hinojosa por su gran conocimiento, su ecuanimidad y seguridad, a la Dra. Toledo por su gran experiencia, ayuda y conocimientos, y a Alfredo Vega, en quién además de conocer a un excelente Médico y persona, conocí a un gran amigo. A Alexander Cárdenas por su asesoría, su amistad y consejos.

A mis doctoras, a mis mueganos, a mis amigas y compañeras R2, Mónica y Ofelia, tan diferentes las dos, pero tan similares en el aspecto de ser incondicionales e increíbles personas, gracias por su apoyo, su comprensión y sobre todo gracias por su amistad.

A Gabriela, por que me motivó a estar aquí, gracias por la paciencia y por estar ahí pese a todo.

A Aurorita, sin la cual esta tesis definitivamente no habría resultado. A Daniela Masetto, que dedicó horas, días y semanas para que este proyecto resultara y que además de esto me brindó su amistad sincera y su alegría en los momentos de trabajo más abrumador.

A mis hermanos, Nora y Miguel, quienes desde la distancia siempre han estado conmigo.

A Dios que hizo posible todo lo anterior.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Lista de Abreviaturas, **vii**

Lista de Figuras, **viii**

Lista de tablas, **ix**

SUMMARY, **1**

RESUMEN, **2**

I. INTRODUCCIÓN, **3**

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, **8**

III. JUSTIFICACIÓN, **9**

IV. OBJETIVOS, **10**

1. Generales, **10**

2. Específicos, **10**

V. HIPÓTESIS, **11**

VI. MATERIAL Y METODOS, **11**

1. Diseño, **11**

2. Grupos experimentales, **11**

3. Procedimientos quirúrgicos, **12**

4. Preparación de la suspensión de nimodipino, **15**

5. Evaluación de la recuperación motora, **16**

6. Análisis histológico, **16**

7. Análisis estadístico, **17**

VII. RESULTADOS, **17**

1. Evaluación de la recuperación motora, **17**

2. Análisis Histopatológico, **18**

a) Grupo de lesión sin injerto, **20**

b) Grupo motor, **23**

c) Grupo sensitivo, **26**

d) Comparación entre grupos tratados con y sin nimodipino, **28**

VIII. DISCUSIÓN, **33**

IX. CONCLUSIONES, **36**

X.	PERSPECTIVAS,	37
XI.	REFERENCIAS,	38
XII.	ANEXOS,	42
	Anexo 1. Sistema de graduación funcional del N. Facial de House y Brackmann,	42
	Anexo 2. Método de perfusión,	43
	Anexo 3. Método de tinción modificado con Hematoxilina – Eosina,	45
	Anexo 4. . Método de tinción modificado con Tricrómico de Masson,	48
	Anexo 5. . Método de tinción modificado de Klüver – Barrera,	52
XIII.	VITAE,	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AT,	Azul de Toluidina
g,	Gramo
HB,	House-Brackmann
HE,	Hematoxilina y Eosina
IP,	Intraperitoneal
KB,	Klüver Barrera
kg,	Kilogramo
mg,	Miligramo
ml,	Mililitro
PBS,	Solución amortiguadora de fosfatos
PF,	Parálisis facial
TM,	Tricrómico de Masson
VHZ,	Virus Herpes Zoster
VIH,	Virus de inmunodeficiencia humana
VO,	Vía oral

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1,** Aspecto macroscópico del plexo braquial.
- Fig. 2,** Preparación quirúrgica para la toma de un injerto del nervio femoral y su implantación en el plexo braquial.
- Fig. 3,** Zona de la incisión requerida para el abordaje del plexo braquial en la rata.
- Fig. 4,** Tiempos quirúrgicos de la implantación de un injerto nervioso en el plexo braquial.
- Fig. 5,** Obtención de un fragmento de nervio femoral para su utilización como injerto
- Fig. 6,** Imagen de la prueba para evaluación de recuperación motora (Kunkel – Bagden).
- Fig. 7,** Evaluación de la actividad motora en ratas injertadas. (Grafico)
- Fig. 8,** Aspecto microscópico de nervio normal íntegro.
- Fig. 9,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por anastomosis término-terminal de una rata administrada sólo con vehículo.
- Fig. 10,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por anastomosis término-terminal de una rata medicada con nimodipino.
- Fig. 11,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio motor de una rata medicada con únicamente con vehiculo.
- Fig. 12,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio motor de una rata medicada con nimodipino.
- Fig. 13,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio sensitivo de una rata medicada sólo con vehiculo.
- Fig. 14,** Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio sensitivo de una rata medicada con nimodipino.
- Fig. 15,** Aspecto microscópico del infiltrado de basófilos.

Fig. 16, Aspecto microscópico de la reacción a cuerpo extraño al material de sutura en rata tratada sólo con vehiculo y en rata tratada con nimodipino. Aspecto microscópico de los cambios en la pared arterial en rata tratada sólo con vehiculo y en rata tratada con nimodipino

Fig. 17, Comparación entre el aspecto microscópico de los diferentes grados de infiltrados inflamatorio.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1, Resumen de resultados

SUMMARY

Background. The facial palsy (FP) secondary to extensive exeresis of tumors or severe trauma causes severe nervous disfunction that requires the implantation of nervous grafts. The donnor nerves used to replace the losses of facial nerve, can be motor or sensitive. Several reports establish that the repair of the nervous discontinuity with motor nerves is better than that made with sensitive ones. It is important to clarify the knowledge in this field because the disability that the taking of donor motor nerves can cause in patients.

Purpose. At present work we want to compare the efficacy of sensitive and motor nerves repair an experimental damaged motor nerve in rats, and to determine if nimodipine -- antagonist of Ca⁺⁺ channels and helper of the vascular functionality -- preserves the integration of the sensitive and motor grafts.

Material and methods. Thirty Wistar rats in which an incision in pectoral minor nerve was made, were randomly allocated in the following three groups (n=10):

- 1) Group A included animals in which de damaged nerve was only repairs by an end to end anastomose. (n=10)
- 2) Group B in which a motor graft was included between the extremities of the damaged nerve (n=10)
- 3) Group C, in which a sensitive graft was included between the extremities of the damaged nerve (n=10)

Each group was divided in two subgroups (n05). While the first one was orally treated with 20 mg/kg/day nimodipino during 30 days, the second one was only administered with vehicle (oil corn). At the end of treatment, the motor activity and the histological evaluation of grafts (using rutinary histological strains) were made.

Results. Motor activity was similar in all groups of rats. In contrast, both sensitive and motor grafts of rats treated with nimodipino had less inflammatory cells and better architectural nervous tissue conservation than those presented by rats only treated with vehicle.

Conclusions. Both, sensitive and motor grafts used to repair the nervous losses are useful. Nimodipino promotes the preservation of sensitive and motor grafts.

Perspectives. Our results will be useful to continue the study of grafts and to develop new treatments to preserve the implantation of grafts.

RESUMEN

Antecedentes. La parálisis facial (PF) secundaria a exéresis extensa de tumores ó traumatismos graves, causa disfunción nerviosa severa que requiere la implantación de injertos nerviosos. Los nervios donadores empleados para sustituir las pérdidas de nervio facial, pueden ser motores ó sensitivos. Se ha reportado que la reparación de la discontinuidad nerviosa con nervios de origen motor da mejor resultado clínico e histológico que la que se hace con un nervio sensitivo. Es importante ampliar el conocimiento en este campo porque la toma de nervios donadores motores puede causar discapacidad funcional en el paciente.

Objetivos. En este trabajo, queremos evaluar la utilidad de los injertos nerviosos (sensitivos y motores) en la reparación de un nervio motor lesionado experimentalmente en ratas y determinar si el nimodipino --antagonista de los canales de calcio y preservador de la funcionalidad vascular-- es útil para facilitar la integración de los injertos sensitivos y motores.

Material y métodos. Treinta ratas Wistar fueron divididas en 3 grupos (n = 10):

- 1) Grupo A (lesión sin injerto), en el cual se realizó sección del nervio pectoral menor, que se reparó por anastomosis término – terminal, sin implantación de injerto.
- 2) Grupo B (Injerto motor), en el cual se realizó sección del nervio pectoral menor y se reparó con la interposición de un fragmento de nervio motor (femoral);
- 3) Grupo C (Injerto sensitivo), donde la sección del nervio pectoral menor se reparó con un segmento de nervio sensitivo (safeno).

Se formaron dos subgrupos de cada grupo, que recibieron oralmente 20 mg/kg/día de nimodipino ó aceite de maíz (grupo control) durante un mes. Se realizó una prueba física para evaluar la recuperación funcional cada 2 semanas, (*Kunkel – Bagden*). Al término del tratamiento, se procesó el tejido del injerto para analizar histológicamente el grado de integración nerviosa y regeneración axonal.

Resultados. Los resultados de las pruebas físicas, no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales con injerto motor y sensitivo, tratados con nimodipino ó vehiculo. No obstante el análisis histológico de los injertos evidenció una integración mejor al tejido lesionado en los animales que fueron tratados con nimodipino, caracterizada por menor infiltrado inflamatoria, mejor preservación de la estructura nerviosa, menor depósito de colágeno y menor cambio inflamatorio de las paredes arteriales.

Conclusiones. El injerto motor y la anastomosis termino – Terminal muestran mejor grado de integración nerviosa que el injerto sensitivo. El nimodipino favorece la integración de los injertos nerviosos motores ó sensitivos

I. INTRODUCCIÓN

La expresión facial es una parte importante de la comunicación humana. La pérdida de simetría y expresión facial tienen un gran impacto sobre las condiciones psicosociales de los pacientes, pues provocan disminución de la calidad de vida, depresión, disminución del rendimiento laboral y social, y sensación de discapacidad física y mental (*Adour, Hilsinger y Callan, 1985; Crumley y Armstrong, 2005; Guntinas-Lichius, Straesser y Streppel, 2007; Mattox, 2005*).

La parálisis facial (PF) parcial ó total, es causada por una lesión ó enfermedad en cualquier parte del trayecto del nervio facial. Se caracteriza por debilidad ó falta total de movimiento de un lado de la cara, alteraciones del gusto (por afección de la rama cuerda del tímpano), epífora ó dolor a la exposición a ruidos intensos (por compromiso de la rama para el músculo del estribo) (*Adour, Hilsinger y Callan, 1985; Mattox, 2005*). Las causas primarias de la PF son infecciones virales (Virus herpes zoster, VIH), y otras asociadas a enfermedades autoinmunes (e.g. Enfermedad de Lyme, Enfermedad de Kawasaki), pero puede presentarse también en forma secundaria a traumatismos, (e.g. fracturas de hueso temporal, barotrauma, trauma al nacimiento), alteraciones congénitas (Sx. Moebius), desarrollo de procesos neoplásicos, (e.g. Schwannoma, tumores glómicos); ó ser de causa idiopática (parálisis de Bell) (*Adour, Hilsinger y Callan, 1985; Mattox, 2005*).

La PF es una de las causas más frecuentes en la Consulta de Urgencias en Otorrinolaringología, presentándose con una incidencia de alrededor de 20 a 30 casos por cada 100 mil habitantes (*Adour, Hilsinger y Callan, 1985; Mattox, 2005*).

La PF es en general una condición de buen pronóstico, considerándose que su forma idiopática se presenta con un porcentaje de recuperación del 80 a el 100 %. No

obstante, el pronóstico de ésta condición es desfavorable cuando se asocia a dolor radicular, hiperacusia, edad mayor a 60 años, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus y embarazo. (*Adour, Hilsinger y Callan, 1985; Adour, 1972; Crumley y Armstrong, 2005; Pane, Vales, Hinojosa y col., 2002*). Las parálisis secundarias a exéresis de schwannomas vestibulares dejan un déficit de la función facial en el 45% al 100% de los casos (*Darrouzet, Martel, Eneé y col., 2004; Rigby, Shah, Jackler y col., 1997; Samii, Cordula, 1997*).

El grado de disfunción en la PF puede ser variable y por consenso se determina en base a la escala de House y Brackmann (HB) (**Anexo 1**) (*House y Brackmann, 1985*).

El manejo de la parálisis idiopática puede ó no requerir tratamiento farmacológico, pero cuando la causa es traumática ó infecciosa, se administran esteroides orales ó medicamentos antivirales (*Adour, 1972; Grogan y Gronseth, 2001; Peitersen, 1992*). En el caso de disfunción nerviosa severa, como la secundaria a exéresis extensa de tumores ó traumatismos graves en los que hay pérdida de la continuidad nerviosa, se emplea alguna modalidad de tratamiento quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico esta sujeto a controversias, debido a que puede condicionar el desarrollo de lesiones adicionales (*Mattox, 2005*). La descompresión del nervio facial, empleada en casos donde no existe pérdida de la continuidad neural (*Fisch, 1981*), es de efectividad controversial en casos de parálisis de Bell, por el difícil acceso a la porción laberíntica y perigeniculada. No obstante, Fisch ha encontrado que cuando se descomprimen estas porciones en pacientes con degeneración mayor al 90% de las fibras nerviosas hay una mejoría estadísticamente significativa (*Fisch, 1981*).

Otros tipos de tratamientos quirúrgicos son: la anastomosis directa término-terminal libre de tensión, utilizado en caso de lesiones traumáticas ó iatrogénicas, donde

hay pérdidas de poca extensión (*Bascom, Schaitkin, May y col. 2000*); la interposición de un injerto nervioso, habitualmente tomado del nervio auricular mayor ó del nervio sural (*Ramsey, DerSimonian, Holtel y col. 2000*), en caso de pérdidas nerviosas extensas, como en las neoplasias (e.g. Schwannomas); la anastomosis hipogloso-facial (*Atlas, Lowinger. 1997*), cuando la porción intracraneal ó intratemporal del nervio facial no está disponible, o en casos de defectos muy grandes no favorables para colocación de un injerto; la realización de un injerto cruzado de sural, cuando se quiere crear un control divisional específico de los grupos musculares faciales (*Ferreira. 1984; Mattox. 2005*); y la anastomosis con el nervio paralizado, realizada de 6 a 12 meses en un segundo tiempo una vez se haya establecido una conducción nerviosa.

Hay factores que son importantes en el éxito del tratamiento quirúrgico, entre los que se encuentran: el tipo de injerto utilizado (nervio motor ó sensitivo), la revascularización del injerto y el tiempo que tarda en establecerse nuevamente la conducción nerviosa, que se refleja un mayor ó menor tiempo de denervación de los músculos blanco.

Se ha estudiado el efecto que tiene la reparación de los defectos nerviosos con injertos de nervio motor y con injertos provenientes de nervios sensitivos, siendo estos últimos de los más utilizados en la práctica clínica (e.g.. nervio sural). El estudio de Brenner y col. (2006) muestra que el reparar la discontinuidad nerviosa con nervios de origen motor otorga mejores resultados clínicos e histológicos que cuando la reparación se efectúa con un nervio sensitivo, ya que después de una lesión inicial, los axones motores se regeneran y se unen preferencialmente a fibras motoras, fenómeno llamado reinervación motora preferencial, siendo menos evidente para los injertos sensitivos. Sin embargo, la morbilidad secundaria a la toma de un injerto motor (e.g. déficit motor en

sitio donador) ha limitado su aplicación en la práctica clínica, por lo que no hay suficientes estudios que comparen los resultados entre estos dos tipos de injertos (*Brenner, Hess y Myckatyn. 2006*).

La revascularización del injerto es un punto clave en el éxito funcional, puesto que se asume que un injerto convencional es isquémico dada la hipoperfusión en el período postoperatorio, lo que va en detrimento de su función (*Best, Mckinnon, Midha y col. 1999*).

Los injertos no vascularizados convencionales, es decir, constituidos únicamente por el nervio, sin su pedículo vascular, muestran revascularización temprana desde las primeras 72 horas hasta 3 semanas después de la implantación del injerto. Los mecanismos de revascularización reportados incluyen la neovascularización centripeta, que es el mecanismo citado más frecuentemente, y la inosculación, es decir anastomosis de nuevos vasos que se incorporan a trama vascular ya existente (*Best, Mckinnon, Midha y col. 1999*).

Finalmente, el grado de recuperación en la conducción nerviosa, es también un factor importante, ya que es conocido que las lesiones de un nervio periférico, provocan una interrupción en la función de barrera de la membrana celular, permitiendo un influjo de calcio, gracias al gradiente electroquímico entre el interior y el exterior de la célula. La sobrecarga resultante en los niveles de calcio intracelular provoca una amplia variedad de reacciones en cadena, las cuales eventualmente conducen a la muerte celular. De acuerdo a esto, un agente que pueda prevenir la entrada excesiva de calcio, podría atenuar el daño celular causado por una lesión mecánica y así, mejorar la recuperación neuronal (*Angelov, Neiss, Streppel y col. 1996; Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002; Attsson, Ldskogius e Ikael, 1999*).

En diversos estudios clínicos, se demostró que el tratamiento vasoactivo con el calcio-antagonista nimodipino era efectivo en la preservación de la función facial en pacientes sometidos a cirugía de exéresis de schwannomas vestibulares. Esto se había observado ya en estudios experimentales, donde el nimodipino promovió la regeneración y el crecimiento axonal así como la remielinización en ratas, y que reduce la inervación polineuronal de los músculos blanco (*Angelov, Neiss, Streppel y col. 1996; Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002; Attsson, Ldskogius e Ikael, 1999; Biessels, Ter Laak y Kamal 2005; Lopez-Arrieta y Birks 2006; Mattsson, Björck, Remahl y col. 2005; Pane, Vales, Hinojosa y col. 2002; Sabbatini, Tomassoni y Di Tullio 2002; van der Zee, Schuurman, y Traber 1987; Voitenko, Kruglikov y Shutov. 2002*).

El nimodipino [(2-metoxietil) -1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-pirinedi -carboxilato], un bloqueador de los canales de calcio, utilizado como un agente anti-hipertensivo, tiene propiedades lipofílicas y puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica. Su acción primaria es unirse a receptores tipo L y reducir el número de canales abiertos que conducen iones de calcio a través de la membrana celular, restringiendo por lo tanto, el influjo de calcio dentro de las células. Tiene además efectos anti-vasoconstrictores y acción vasodilatadora sobre las arteriolas (*Angelov, Neiss, Streppel y col. 1996; Attsson, Ldskogius e Ikael, 1999; Sabbatini, Tomassoni y Di Tullio 2002*).

En situaciones experimentales, la inhibición de la entrada de calcio ha logrado proteger a las neuronas en diversas situaciones nocivas, lo cual sugiere que el nimodipino puede tener un potencial neuroprotector, principalmente contra la isquemia transitoria y la hipoxia. Los sitios de unión para nimodipino son encontrados en neuronas y en células vasculares y su acción puede influir sobre la conducción neural y el flujo

sanguíneo cerebral (*Angelov, Neiss, Streppel y col. 1996; Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002*).

A diferencia de otros bloqueadores de canales de calcio, el nimodipino ejerce sus efectos a dosis bajas, principalmente sobre las pequeñas arteriolas que determinan el flujo sanguíneo regional (*Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002; Sabbatini, Tomassoni y Di Tullio 2002*).

Existen ya diversos estudios que demuestran esta acción del nimodipino sobre el sistema nervioso central y periférico. Van Der Zee, en 1987, observó que el nimodipino favorece la recuperación funcional posterior al daño a nervios periféricos en la rata. En un estudio más reciente, Mattsson y Björck en el 2005, observaron que el nimodipino mejoró la recuperación funcional en un injerto de nervio sural utilizado para reparar una lesión de nervio laríngeo recurrente en un paciente.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos actuales de reparación de lesiones nerviosas, ya sea de nervio facial ó de algún otro nervio periférico; entre los que se incluyen la anastomosis término-terminal, la realización de interposición de injertos con algún otro nervio, generalmente el nervio sural ó auricular mayor en el caso del nervio facial, las transposiciones neuromusculares, etc., están limitados por el grado de recuperación funcional posterior a la anastomosis; además, los procesos degenerativos posteriores al daño neuronal, entre los que se encuentra la toxicidad por calcio, isquemia, daño por radicales libres, etc., influyen negativamente en el proceso de recuperación.

El uso de los antagonistas de los canales de calcio como el nimodipino, para promover la recuperación funcional y acelerar el tiempo de recuperación de una lesión nerviosa debe ser mejor fundamentada para apoyar su utilización clínica, razón principal de este estudio.

En la clínica, la interposición de injertos de nervios sensitivos es de las opciones más utilizadas para la reparación de lesiones a nervios periféricos, ya que causa menos morbilidad en el sitio donador que el tomar un nervio motor ó mixto, como por ejemplo secuelas motoras permanentes, sin embargo, esto podría ser, en determinados casos, un factor determinante de una mala integración nerviosa, dado el fenómeno de la reinervación preferencial, no existiendo suficientes estudios que comparen los resultados utilizando ambos tipos de injertos, por lo que se buscara comparar el resultado con ambos tipos de injertos, sensitivo y motor.

III. JUSTIFICACIÓN

En el Departamento de Neurotología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se recibe un importante número de pacientes con patologías asociadas de daño a nervios craneales ó periféricos, específicamente con parálisis facial, quienes son susceptibles realización de anastomosis, la colocación de injertos nerviosos, ó transferencias de músculo funcional (Ej. músculo Gracilis) para mejorar la función facial con resultados variables de acuerdo a lo ya mencionado,

Muchos de estos procedimientos requieren de dos procedimientos quirúrgicos, inicialmente para la realización del injerto, y una vez que se haya establecido la conducción nerviosa del injerto trasplantado, realizar un segundo tiempo para unirlo a un

músculo blanco ó bien realización de una transferencia de músculo funcional; es por esto que el tiempo que lleva la regeneración nerviosa resulta ser un factor importante para el resultado, por lo que es necesario el disminuirlo en lo posible para evitar una denervación prolongada, principalmente en aquellos casos donde se transfiere músculo funcional.

Por esta razón resulta indispensable realizar investigación para evaluar medicamentos coadyuvantes (como del Nimodipino), Para una regeneración nerviosa exitosa..

Por otro lado, es importante comparar el grado de integración de los injertos sensitivos, en comparación a los injertos motores para tener evidencias que justifiquen su utilización a pesar de las consecuencias funcionales que pueden resultar en el sitio donador.

IV. OBJETIVOS

1. Generales

- a. Evaluar si existe diferencia en el resultado final de un injerto de nervio motor ó sensitivo.
- b. Determinar la eficacia del nimodipino como promotor de la integración de un injerto nervioso motor ó sensitivo en ratas.

2. Específicos

- a. Evaluar histológicamente la integración de los injertos.
- b. Evaluar la función motora de los animales injertados y tratados ó no con nimodipino.
- c. Evaluar histológicamente el patrón de revascularización del injerto.

V. HIPÓTESIS

Existe una diferencia en el resultado final de la anastomosis nerviosa si se utiliza un injerto de nervio motor que si se utiliza uno de nervio sensitivo.

El uso de nimodipino es eficaz para promover la recuperación funcional posterior a la realización de una anastomosis nerviosa en un modelo animal.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO: Experimental
2. GRUPOS EXPERIMENTALES

Treinta ratas Wistar de 300 g se distribuyeron aleatoriamente en los tres grupos siguientes:

- a. Grupo A (control) (n=10), en el cual se seccionó el nervio del músculo pectoral menor (**Fig. 1**) y fue vuelto a unir (anastomosis termino - terminal).
- b. Grupo B (injerto sensitivo) (n=10), en el cual se seccionó el nervio del músculo pectoral menor y se reparó con un fragmento de nervio sensitivo (safeno).
- c. Grupo C (injerto motor) (n=10), en el cual se seccionó el nervio del músculo pectoral menor y se reparó con un segmento de nervio motor (femoral).

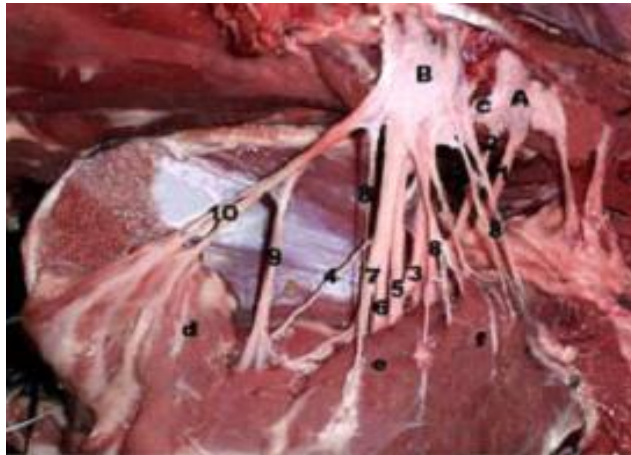


Fig.1. Plexo Braquial. **A**, tronco craneal; **B**, tronco caudal; **C**, Rama de unión del tronco craneal al tronco caudal; **1 – 9**, nervios del plexo braquial; **10**, nervio para el músculo pectoral menor

Se formaron dos subgrupos (n=5) de cada grupo, que recibieron oralmente: 20 mg/kg de nimodipino suspendido en aceite de maíz ó aceite de maíz (vehículo), diariamente, durante un mes.

3. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

- a. Sección del nervio del músculo pectoral menor realización de una anastomosis término Terminal. (Grupo control)
- b. Sección del nervio del músculo temporal e interposición de un injerto nervioso motor.
- c. Sección del nervio del músculo temporal e interposición de un injerto nervioso sensitivo.

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia general mediante la inyección intraperitoneal (IP) de ketamina a dosis de 75

mg/kg, en combinación con xylazina. La cara interna de uno de los brazos y región pectoral de cada animal fue afeitada y preparada con solución antiséptica. (**Fig. 2**)

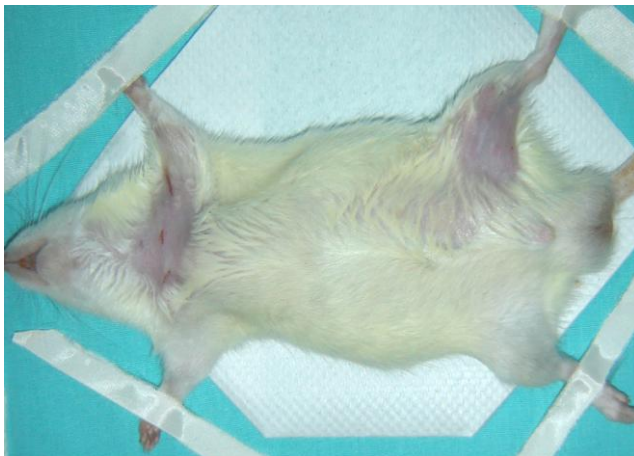


Fig. 2. Preparación quirúrgica para toma del injerto del miembro posterior e implantación del mismo en el plexo braquial

Para la realización de los tres procedimientos quirúrgicos, se abordó la cara interna de uno de los brazos de la rata mediante una incisión en forma oblicua desde la fosa cubital hasta la escotadura esternal. (**Fig. 3**)



Fig. 3. Zona de la incisión requerida para el abordaje del plexo braquial en la rata.

Posteriormente, se realizó una disección de los músculos pectorales y sección de los mismos para así descubrir el plexo braquial. Una vez hecho esto, se identificó la rama para el músculo pectoral menor y su trifurcación

característica, se disecó de la arteria subclavia y se realizó una sección con ayuda de tijeras de microcirugía, todo esto fue llevado a cabo bajo visión directa amplificada con microscopio quirúrgico. (Fig. 4)

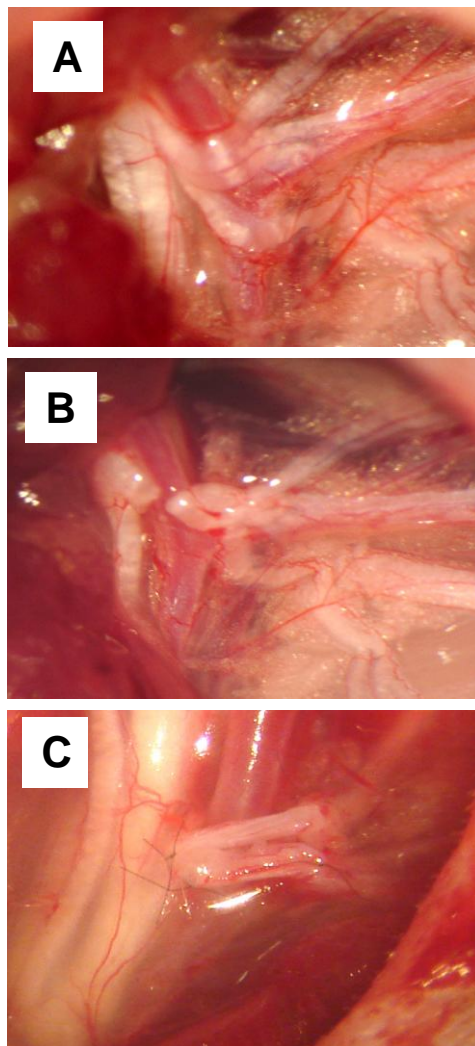


Fig. 4. Tiempos quirúrgicos de la implantación de un injerto nervioso en el plexo braquial. **A**, aspecto normal del nervio pectoral menor íntegro con su trifurcación sobre la arteria subclavia; **B**, nervio pectoral menor seccionado; **C**, nervio pectoral menor con injerto implantado.

Una vez hecha la sección, en el grupo control se realizó una anastomosis directa entre los segmentos distal y proximal (anastomosis termino - terminal). En el grupo b, se realizó una interposición entre los dos segmentos de la sección de

un fragmento tomado del nervio donador motor (femoral) ó de un fragmento del nervio donador sensitivo (safeno) en el grupo c, fueron suturado con nylon 10 – 0 u 11-0.

La toma de los injertos motores y sensitivos se realizó a través de una incisión oblicua en la cara interna del muslo de la rata en el mismo tiempo quirúrgico, identificándose en este caso, la rama motora del nervio femoral y una rama sensitiva superficial, las cuales se resecaron y dividieron en fragmentos para su uso como injerto. Los fueron mantenidos en solución fisiológica hasta su utilización en el mismo tiempo quirúrgico. (**Fig. 5**).

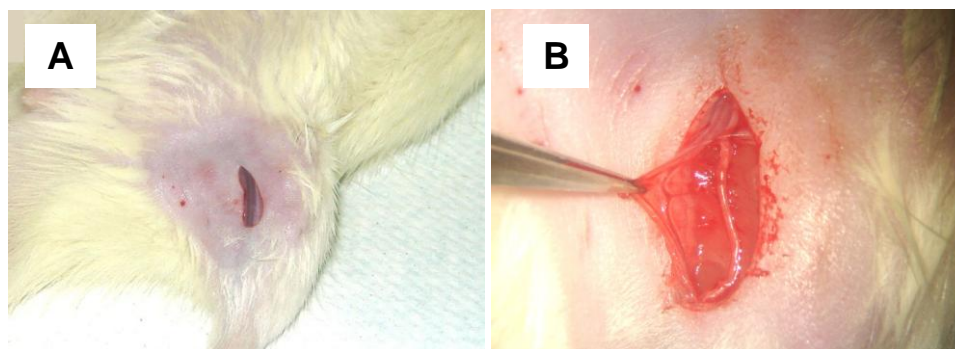


Fig. 5. Obtención de un fragmento de nervio femoral para su utilización como injerto; **A.** incisión en la región femoral; **B,** aspecto macroscópico del nervio y la arteria femorales.

4. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE NIMODIPINO (20 mg/kg)

Se homogeneizaron 20 mg de nimodipino en un mililitro de aceite de maíz para tener una suspensión del fármaco de 20 mgs/kg (ml/kg). Cada rata de 300 g recibió 0.3 ml de la suspensión.

La dosis de nimodipino administrada fue de 20 mg/kd/día, la cual se calculó en base a estudios previos en animales y en humanos (*Sabbatini, Tomassoni, Tullio, 2002; Voitenko, Kruglikov, Shutov, 2002; Biessels, Ter Laak, Kamal, 2005*).

5. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA

Durante el mes de seguimiento, se realizó la prueba de prensión y ascensión de los animales a un cordel (*Kunkel – Bagden, Dai, Gregman, 1993*) para evaluar la actividad motora de las extremidades superiores en dos ocasiones: una a las 2 semanas (5 determinaciones); y otra a las 4 semanas (5 determinaciones). La respuesta normal a esta prueba es la prensión firme de la rata e incluso su ascensión y recorrido sobre el cordel (**Fig. 6**).



Fig. 6. Prueba *Kunkel – Bagden* para evaluación de función motora, donde se suspende a la rata en un cordel de sus extremidades superiores. (*Kunkel – Bagden, Dai, Gregman, 1993*)

6. ANALISIS HISTOLÓGICO

Analizamos los tejidos perfundidos, procesados para análisis histológico y teñidos con las técnicas HE, KB, TM y AT de la zona del implante, en los cuales evaluamos cualitativamente la estructura del tejido (disposición de las fibras nerviosas, captación de color, continuidad), los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio, el depósito y organización de colágena y la conservación del tejido nervioso (mielina). En forma

paralela, analizamos tejidos perfundidos de ratas no intervenidas ($n = 10$) para tener el parámetro de normalidad que nos permitió detectar las diferencias en comparación con nuestros animales experimentales.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos fueron hechas con la prueba paramétrica para variables intervalares del programa SPSS versión 15.0.

VII. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MOTORA

La función motora de las ratas con lesión ó con implantación de injerto fue similar

Del mismo modo, el tiempo de prensión en los animales de los diferentes grupos, no varió con la administración de nimodipino (**Fig. 7**).

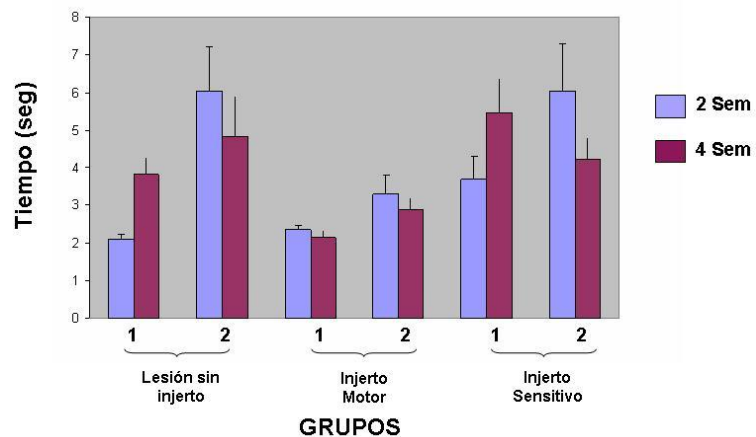


Fig. 7. Evaluación de la actividad motora en ratas con lesión sin injerto (Control) y con lesión e injerto motor ó sensitivo que recibieron nimodipino (1) ó vehículo (2).

2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El aspecto microscópico del nervio normal evidenció una continuidad de fibras onduladas que se tiñeron de color rosa uniforme en fascículos. Los núcleos basófilos de las células resaltaron dentro de los fascículos. No se observaron infiltrados de células inflamatorias en la periferia del nervio. El perineuro se coloreó de rosa intenso. La tinción con HE evidenció también colágena eosinofílica poco abundante, organizada en la periferia. Las paredes de los vasos sanguíneos estuvieron formadas por estratos de células (de 2 a 3). La tinción con TM permitió diferenciar el tejido nervioso que se tiñó de rosa y la colágena circundante que se tiñó de azul. La tinción de KB específica para mielina, permitió diferenciar el tejido nervioso que se coloreó de azul intenso por la afinidad del colorante a la mielina y la colágena teñida de azul claro. La tinción de AT permitió definir con precisión los trayectos de los nervios y los núcleos celulares (**Fig. 8**).

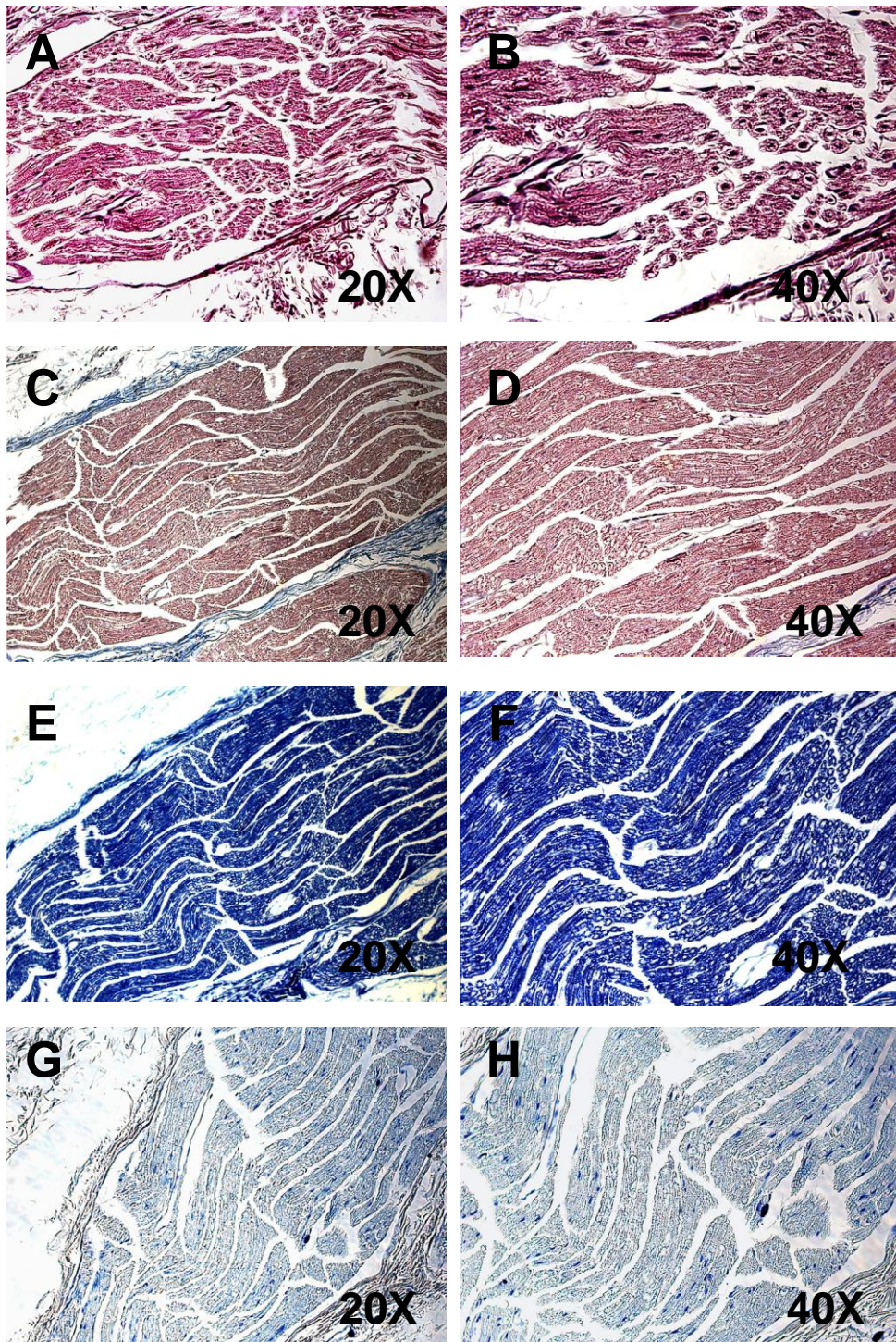


Fig. 8. Aspecto microscópico de nervio normal. **A y B,** HE; **C y D,** Tricrómico de Masson; **E y F,** Klüver – Barrera; **G y H,** Azul de Toluidina.

Grupo con lesión sin injerto (control) (**Figs. 9 y 10**).

a. Subgrupo administrado sólo con vehículo (aceite de maíz).

El análisis de las laminillas, demostró una buena preservación de la arquitectura nerviosa, en la tinción de HE se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio moderado, tanto en la periferia del nervio como en el interior del mismo. En la tinción tricrómico de Masson, fue evidente la diferencia entre los extremos distal y proximal a la lesión del nervio, con una menor intensidad en la coloración de la mielina en el extremo distal; se observó además fibras de colágena y precolágena en forma desorganizada alrededor del nervio y dentro del mismo en moderada cantidad. Los cambios en intensidad y cantidad de la mielina se corroboraron con la tinción de Klüver – Barrera, observándose una cantidad menor en el extremo distal, aunque la colágena en este caso se tiñó de azul claro. En la tinción de azul de Toluidina tiñó tanto tejido nervioso como mielina, siendo únicamente más evidente los núcleos celulares y el infiltrado inflamatorio.

b. Grupo con nimodipino.

En este grupo, también se conservó la arquitectura nerviosa, se observó también en la tinción HE infiltrado inflamatorio en la periferia y el interior del nervio pero en menor grado que en el grupo sin nimodipino. En la tinción de TM, la mielina se observó mejor conservada en cuanto a su arquitectura en los cortes longitudinales, pero persistió la diferencia en la tonalidad y cantidad de mielina, la cantidad de colágena y precolágena fue menor en la periferia y sobre todo en el interior del nervio, y se encontró mejor organizada, en KB se identificó mielina en mayor proporción que en grupo sin nimodipino. En AT, se observaron adecuadamente los axones y los núcleos de las células de Schwann.

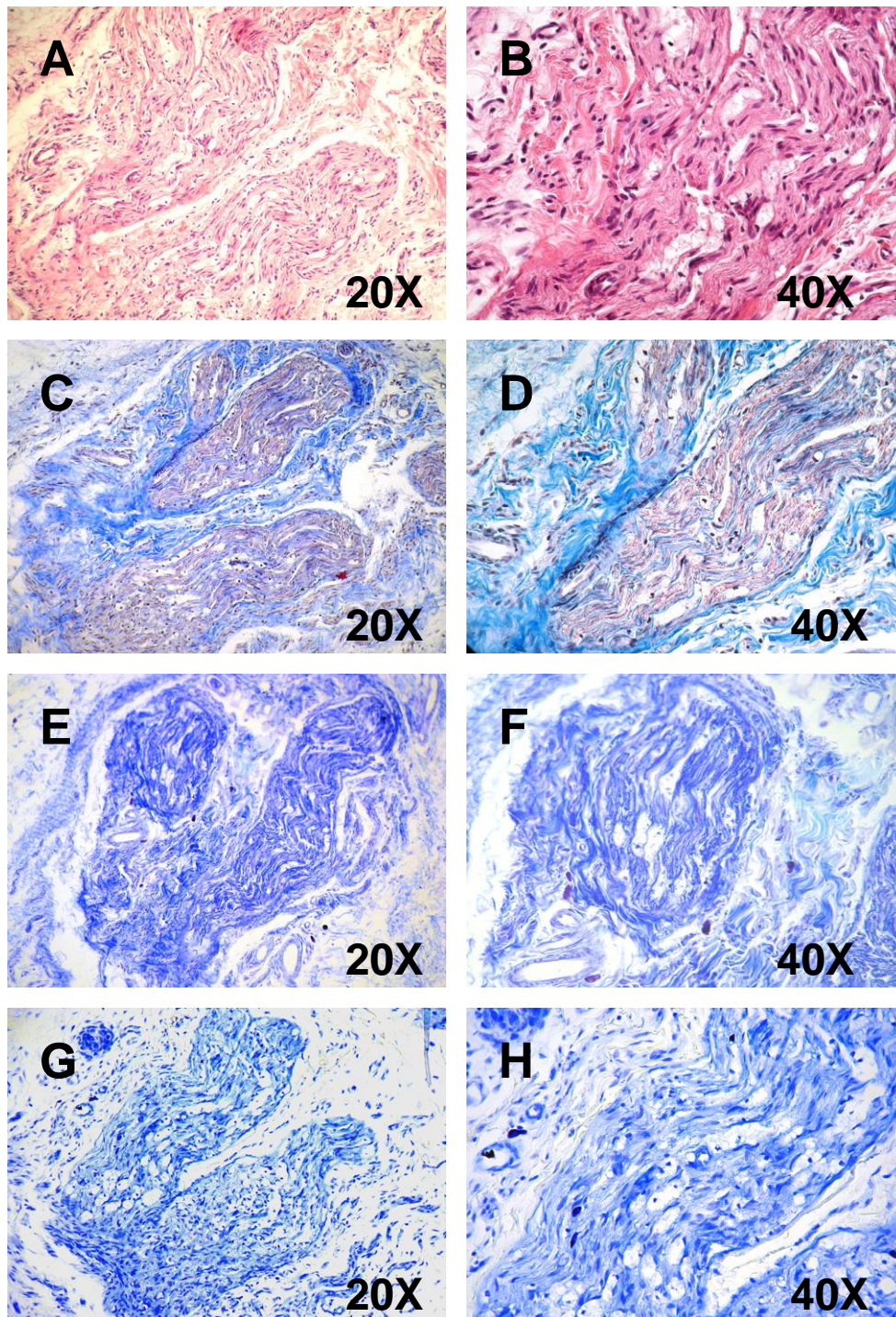


Fig. 9. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por anastomosis término-terminal de una rata administrada sólo con vehículo. **A y B,** HE; **C y D,** Tricrómico de Masson; **E y F,** Klüver-Barrera; **G y H,** Azul de toluidina

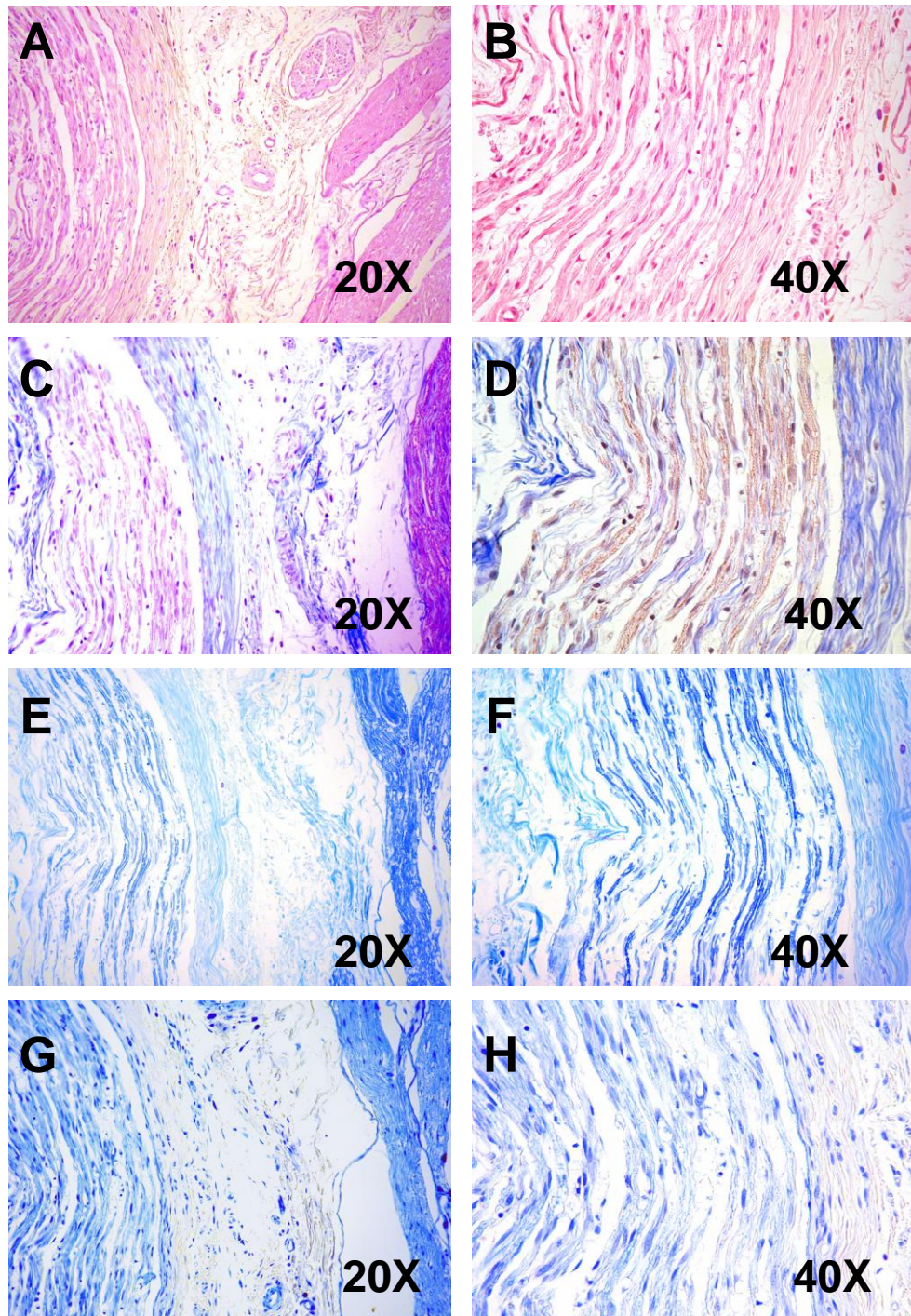


Fig. 10. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por anastomosis término-terminal de una rata medicada con nimodipino. **A y B,** HE; **C y D,** Tricrómico de Masson; **E y F,** Klüver-Barrera; **G y H,** Azul de toluidina

Grupo con injerto nervioso motor (**Fig. 11 y 12**)

a. Grupo administrado sólo con vehiculo

En forma similar al grupo previo, se conservo la arquitectura nerviosa, pero el infiltrado inflamatorio observado en HE fue de mayor intensidad, se observó reacción inflamatoria a cuerpo extraño a la sutura, con presencia de células epitelioides alrededor de la misma. En TM se observó gran cantidad de colágena y precolágena mayormente desorganizada en la periferia del injerto, moderada dentro del mismo y mielina en menor cantidad que en el nervio normal, en KB se observo escasa mielina dentro del injerto motor y la colagena intensamente teñida en su periferia. En AT se observó buena preservación de la arquitectura dentro del injerto, con tinción intensa de los núcleos celulares.

b. Grupo con nimodipino

Hubo mejor conservación de la arquitectura nerviosa; el infiltrado inflamatorio fue menos abundante que en los animales tratados sólo con vehiculo y también hubo reacción inflamatoria a cuerpo extraño, con presencia de células epiteloideas, pero de menor intensidad. En TM la mielina se tiñó con una intensidad similar a la del nervio normal, la colágena fue escasa dentro del nervio y se observó bien organizada en la periferia. En KB la mielina dentro del injerto se tiñó en moderada cantidad, más que en el grupo sin nimodipino, en AT se observo la estructura del axon conservada con buena diferenciación de los núcleos celulares.

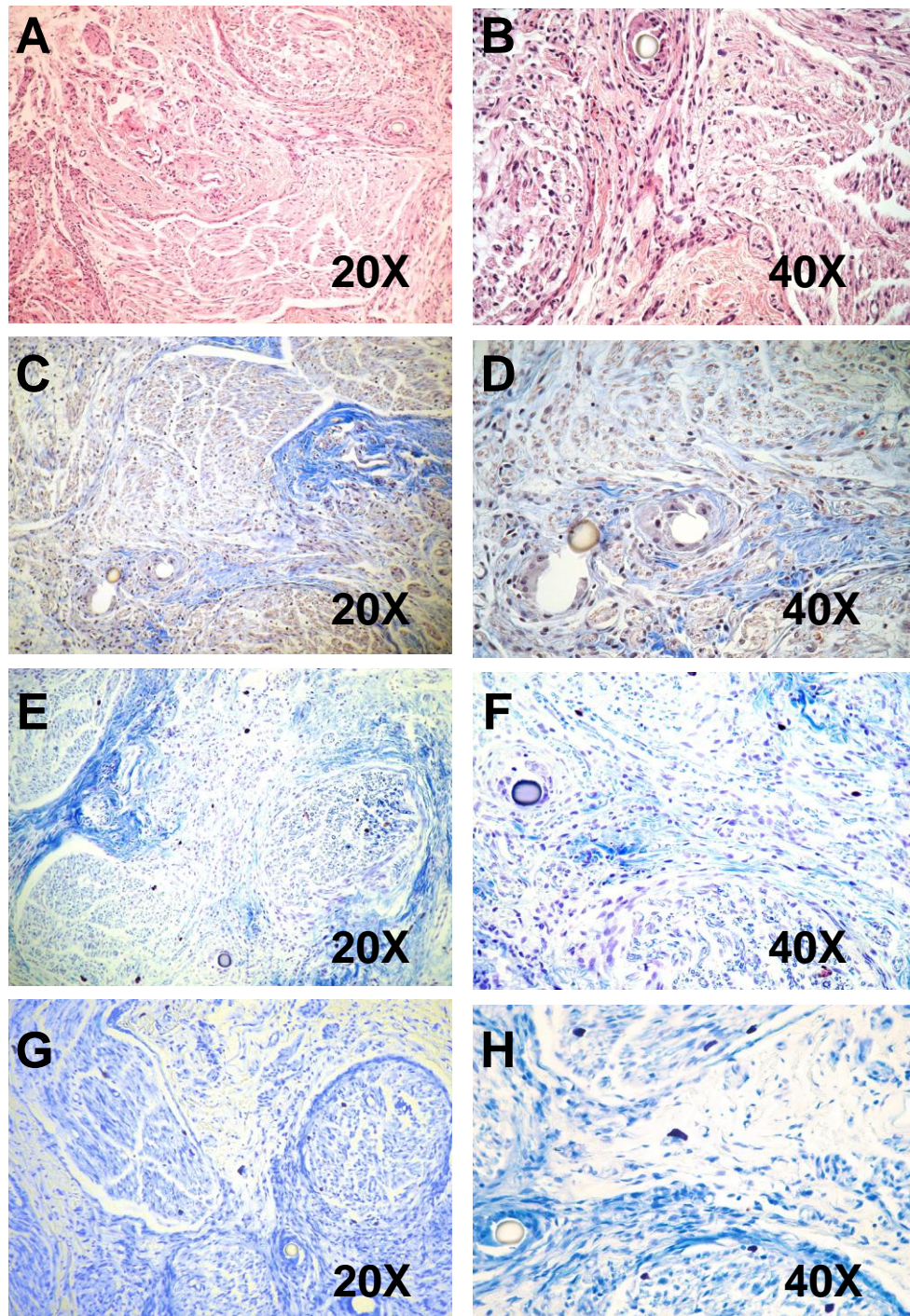


Fig. 11. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio motor de una rata medicada con únicamente con vehículo. **A y B,** HE; **C y D,** Tricrómico de Masson; **E y F,** Klüver-Barrera; **G y H,** Azul de toluidina. La flecha indica el sitio de la sutura (Nylon 11-0)

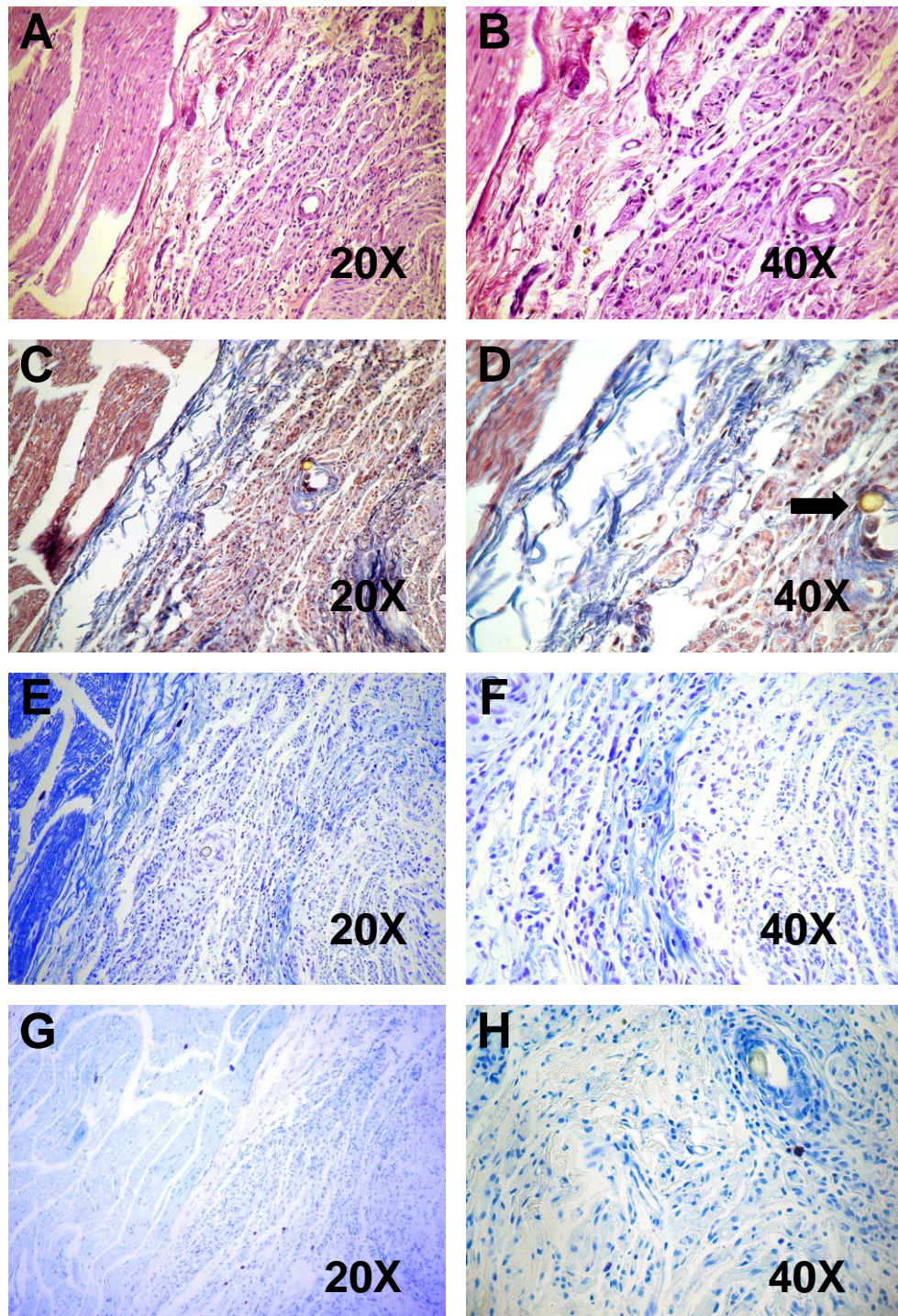


Fig. 12. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio motor de una rata medicada con nimodipino. **A y B,** HE; **C y D,** Tricrómico de Masson; **E y F,** Klüver-Barrera; **G y H,** Azul de toluidina. La flecha indica el sitio de la sutura (Nylon 11-0)

Grupo con injerto nervioso sensitivo (**Fig. 13 y 14**)

a. Grupo solo con vehiculo

Los cortes histológicos de este grupo, mostraron en HE un infiltrado inflamatorio muy intenso, con modificaciones en las paredes de los vasos arteriales, sugerentes de un proceso de arteritis, estaba presente una gran reacción a cuerpo extraño y distorsión de la arquitectura nerviosa en forma importante. En TM se limitó mejor la zona del injerto, con presencia de infiltrado dentro del mismo, mielina disminuida y colágena y precolágena abundante y desorganizada. En KB se observó alternancia de zonas con mielina teñida en forma moderada con zonas de perdida importante de la arquitectura del injerto, en AT se observó tinción de las estructuras axonales en forma moderada dentro del injerto, resaltando el infiltrado inflamatorio y una gran cantidad de basófilos.

b. Grupo con nimodipino

Este grupo mostró una gran diferencia en relación al grupo que no recibió nimodipino. Hubo mejor preservación de la arquitectura nerviosa, el infiltrado inflamatorio fue menos abundante, y la integración del injerto fue mejor. En la tinción de TM se apreció mejor la integridad del injerto, resaltando la intensidad de la mielina, los depósitos de colágena fueron menos abundantes y más organizados. En KB resaltó nuevamente la presencia de la mielina en la zona del injerto a diferencia del grupo previo y el infiltrado inflamatorio basófilo dentro del injerto. En AT nuevamente se observaron las estructuras neurales y el infiltrado inflamatorio.

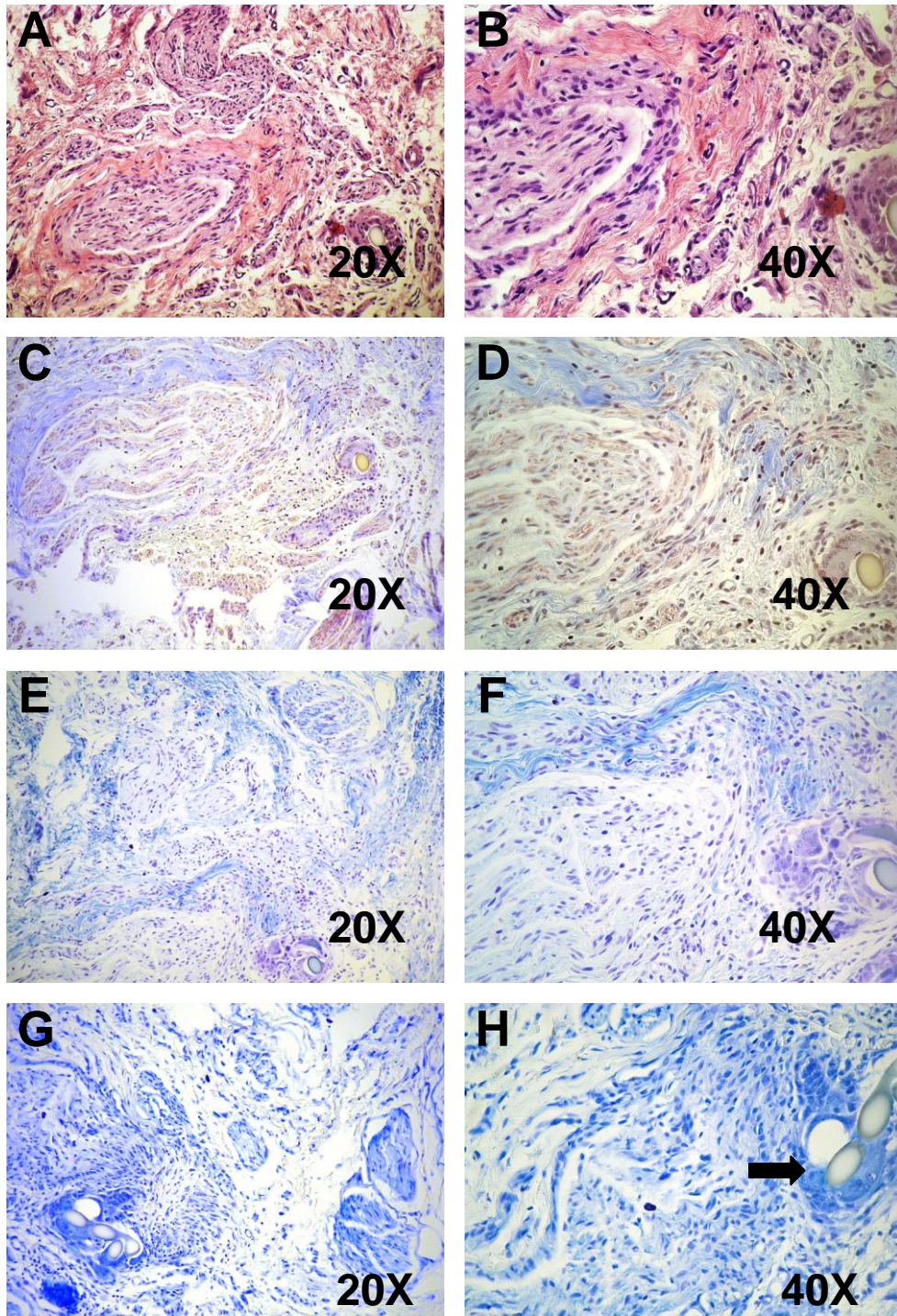


Fig. 13. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio sensitivo de una rata medicada sólo con vehiculo. **A y B**, HE; **C y D**, Tricrómico de Masson; **E y F**, Klüver-Barrera; **G y H**, Azul de toluidina. La flecha indica el sitio de la sutura (Nylon 11-0)

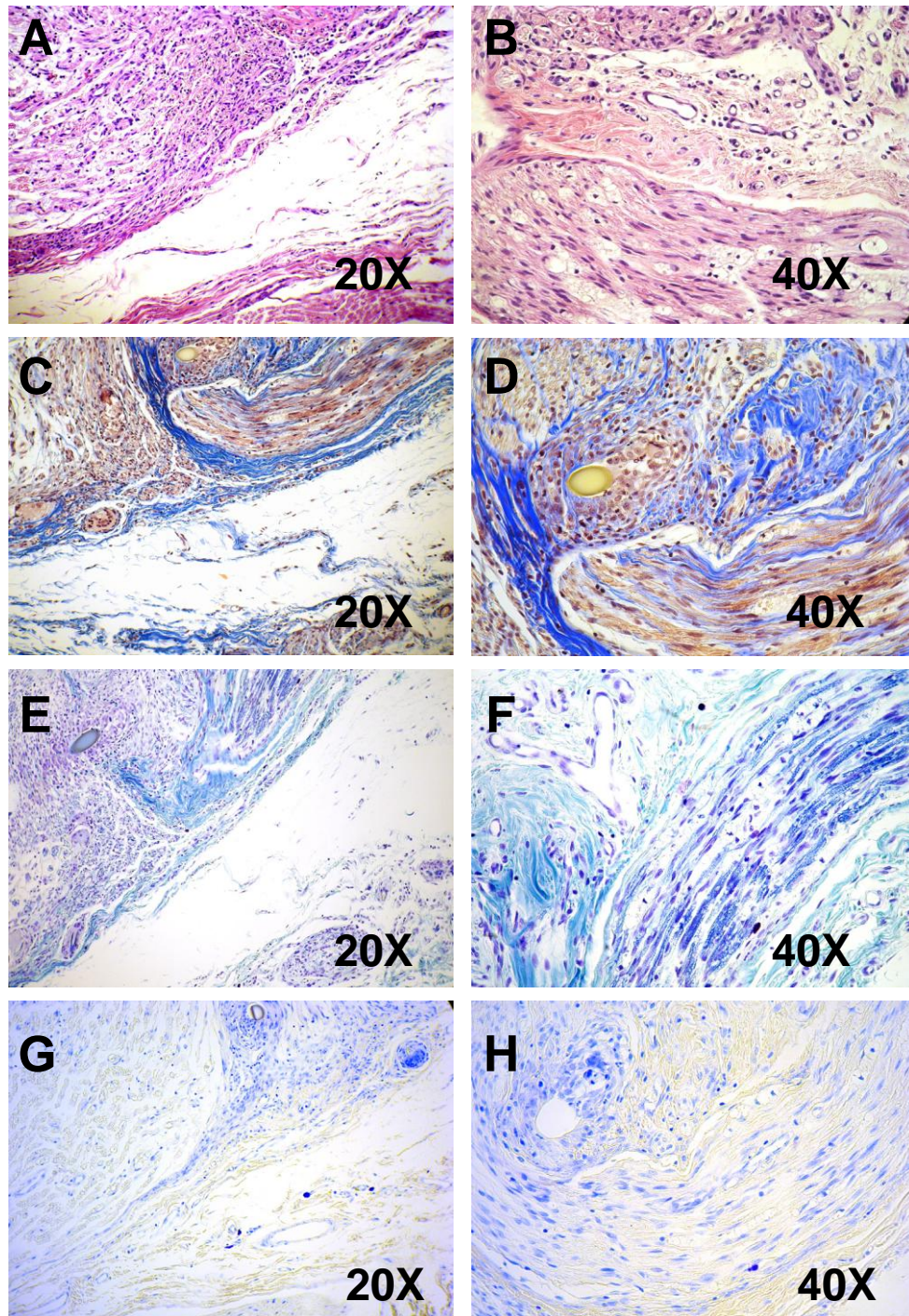


Fig. 14. Aspecto microscópico de nervio pectoral menor, seccionado y reparado por interposición de un injerto de nervio sensitivo de una rata medicada con nimopidipino. **A y B**, HE; **C y D**, Tricrómico de Masson; **E y F**, Klüver-Barrera; **G y H**, Azul de toluidina.

Comparación entre grupos tratados con vehiculo y nimodipino (**Figs. 15 y 16**)

Independientemente del tipo de reparación quirúrgica, existieron diferencias notables en el aspecto microscópico entre ambos grupos de tratamiento: se observó un infiltrado inflamatorio más intenso en el grupo tratado únicamente con vehiculo, y entre estos el grupo de injerto sensitivo fue el que mostró un infiltrado más importante. Fue relevante que en ambos grupos se encontrara una cantidad significativa de basófilos, posiblemente relacionados a la reacción contra el material de sutura (**Fig. 15**).

En ambos grupos se observó una reacción tipo cuerpo extraño contra el material de sutura. En el grupo tratado sólo con vehiculo, la reacción a cuerpo extraño pareció ser más severa, con células epitelioides de gran tamaño y pérdida de la arquitectura tisular más evidente. Se observó una gran cantidad de colágena y precolágena en ambos grupos, asociada al injerto y al sitio de la reparación, pero de aspecto más organizado en el grupo de nimodipino, donde también se observó colágena en menor cantidad dentro del injerto. Hubo una diferencia notable entre los subgrupos con injerto sensitivo (con ó sin nimodipino). (**Fig. 13 E y F; Fig. 14 E y F**). La cantidad de mielina observada en TM y KB fue mayor en el grupo de nimodipino en forma uniforme, mientras que en el grupo sin nimodipino, fueron el injerto motor y la anastomosis termino – terminal los que mostraron cualitativamente mayor cantidad. Los cambios en las paredes arteriales fueron muy evidentes, caracterizándose por engrosamiento intenso de las paredes --las cuales mostraron capas numerosas de células, absolutamente anormales-- (**Fig. 16**).

En todos los grupos se observó proliferación de la microcirculación, más evidente en los grupos tratados con nimodipino.

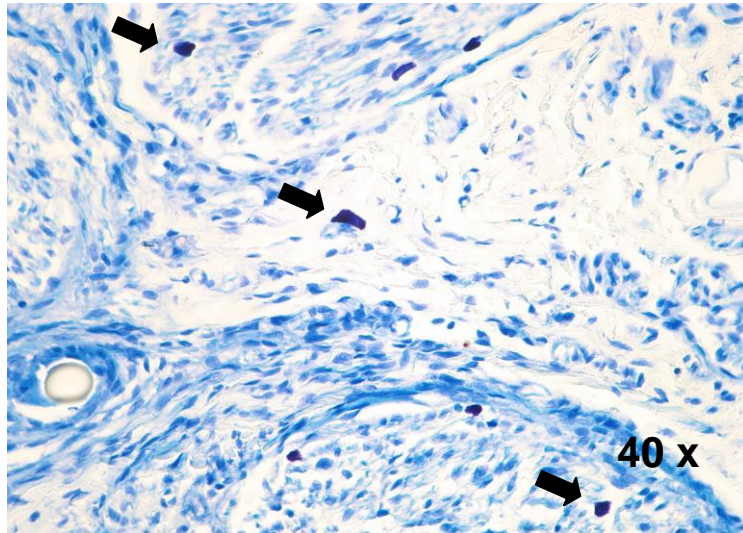


Fig. 15. Aspecto microscópico del infiltrado de basófilos, que destacan por su profunda coloración violácea. Imagen en AT. Las flechas indican la posición de algunos de los basófilos.

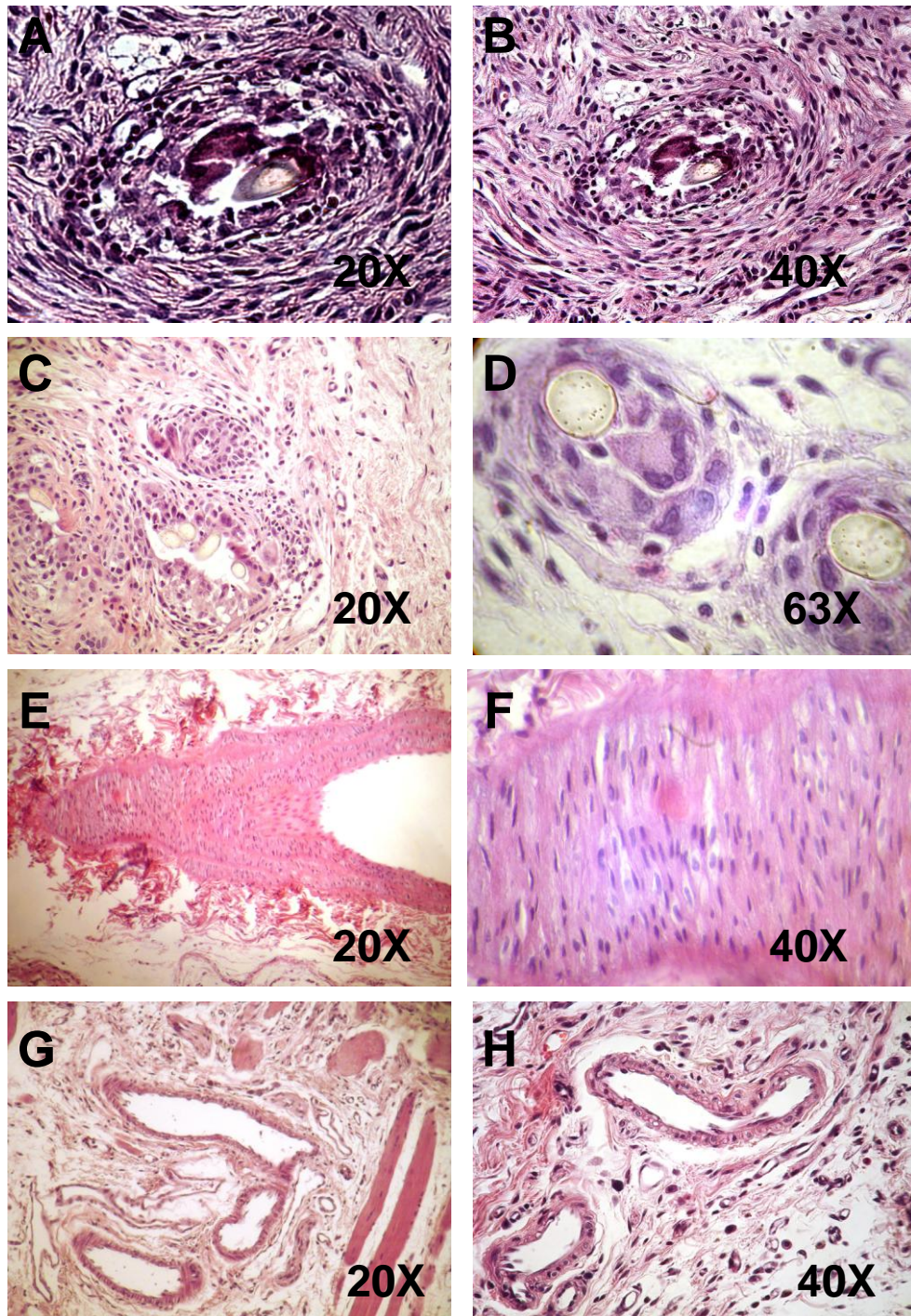


Fig. 16. **A y B,** HE, Aspecto microscópico de la reacción a cuerpo extraño al material de sutura en rata tratada sólo con vehículo; **C y D,** HE, Aspecto microscópico de la reacción a cuerpo extraño al material de sutura en rata tratada con nimodipino; **E y F,** HE, Aspecto microscópico de los cambios en la pared arterial en rata tratada sólo con vehículo; **G y H,** HE, Aspecto microscópico de los cambios en la pared arterial en rata tratada con nimodipino.

En la **Tabla 1** y la **Fig. 17** se presenta un resumen de los resultados más relevantes.

Grupo	Infiltrado inflamatorio ^a	Depósito de colágena ^a	Vasos sanguíneos	Preservación arquitectura
Lesión sin injerto sin nimodipino	++	++	Con inflamación moderada	Conservada
Lesión sin injerto con nimodipino	+	+	Con inflamación leve	Conservada
Injerto motor sin nimodipino	++	++	Con inflamación moderada	Conservada
Injerto motor con nimodipino	+	+	Con inflamación leve	Conservada
Injerto sensitivo sin nimodipino	+++	+++	Con inflamación severa	Perdida
Injerto sensitivo con nimodipino	+	+	Con inflamación leve	Conservada

^a +, leve; ++, moderada; +++ severa

Tabla 1. Resumen de resultados

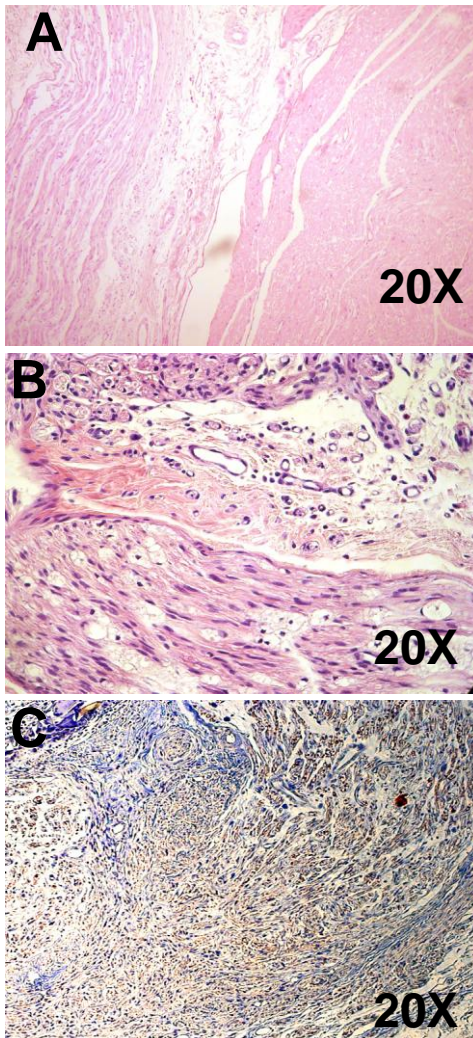


Fig. 17. Comparación entre el aspecto microscopico de diferentes grados de infiltrados inflamatorio, **A** , Infiltrado leve (+) HE; **B**, Infiltrado moderado (++) HE; y **C**, Infiltrado y depósito de colágena severo (+++) TM.

VIII. DISCUSIÓN

La pérdida de la simetría y de la capacidad de expresión facial secundaria a parálisis facial de cualquier etiología, es de gran impacto psicológico, social e incluso laboral, disminuyendo en gran medida la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Es por eso que se han ideado diferentes modalidades para el tratamiento de las secuelas permanentes, principalmente de tipo quirúrgico, cuyos resultados están siempre limitados

por el grado de regeneración nerviosa, tiempo de evolución, y tipo de procedimiento realizado. Hoy en día, el tratamiento quirúrgico está principalmente dirigido a la colocación de injertos nerviosos para corregir defectos en la continuidad del nervio ó realizar puentes cruzados con el nervio sano contralateral, y en un segundo tiempo quirúrgico realizar transposiciones neuromusculares de tipo más funcional, sin embargo, el tipo de injerto más utilizado es de tipo sensorial, específicamente de nervio sural, lo que de acuerdo a los reportes ya comentados puede representar un factor adverso. Otros factores de importancia que influyen negativamente en la integración del injerto son la falta de vascularización inicial en los injertos libres, que condiciona isquemia inicial y la toxicidad por calcio.

La evaluación de la actividad motora con la prueba de prensión y ascensión (*Kunkel – Bagden, Dai, Gregman, 1993*), no demostró diferencias funcionales entre los diversos grupos. En contraste, los hallazgos histológicos evidenciaron diferencias importantes en la integración del injerto en los animales tratados con nimodipino. Estos resultados muestran contundentemente la utilidad de éste fármaco para preservar la arquitectura de los vasos, así como también su funcionalidad al favorecer un aporte sanguíneo adecuado y la llegada de moléculas y células efectoras al injerto. La falta de evidencias en el mejoramiento de la actividad nerviosa en este trabajo puede haberse debido a que: 1) el número de animales analizados fue pequeño y los resultados experimentales en ratas son muy heterogéneos por variabilidad interindividual, así que será necesario estudiar una muestra más grande; 2) no existen estudios previos que indiquen el tiempo que debe transcurrir después de la implantación de un injerto para realizar pruebas funcionales, por lo que este trabajo indica la necesidad de realizar un estudio sobre cinética de integración del injerto en nuestro modelo; y el uso de una

prueba funcional, resulta a veces insuficiente para establecer conclusiones contundentes, por lo que será necesario reforzar nuestros resultados en este trabajo con otras pruebas de funcionalidad.

La integración del injerto fue diferente entre los grupos. Se observó que la reparación directa mediante anastomosis termino – terminal, y la reparación con injerto motor lograron los mejores resultados, principalmente a nivel microscópico, conservándose la arquitectura nerviosa, menor cantidad de infiltrado inflamatorio y menor cantidad de colágena producida, así como conservación de la estructura vascular, que sin duda ejerce una importante repercusión funcional. Esto confirma los resultados obtenidos por Brenner y col. (2006), quien observó una reinervación preferencial en nervios motores implantados con injertos motores, lo que explica la mejor integración en este tipo de injertos. Por el contrario, los injertos de tipo sensitivo, principalmente los grupo sin nimodipino, se caracterizaron por la presencia de infiltrado inflamatorio intenso, una importante reacción a cuerpo extraño y pérdida de la arquitectura nerviosa evidenciada por menor cantidad de mielina que puso de manifiesto una mala integración del injerto. Brenner y col. (2006) plantea la hipótesis de la existencia de un rechazo de injerto cuando se utiliza para el implante un tipo de nervio donador distinto al del tipo del nervio lesionado.

Otro hallazgo prominente fue la proliferación de la microcirculación a nivel del sitio del injerto, este hecho fue más evidente en las ratas tratadas con nimodipino. Estas observaciones están en relación con el efecto predominante del nimodipino sobre arteriolas, promoviendo aumento del flujo sanguíneo local (*Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002; Sabbatini, Tomassoni y Di Tullio 2002*). Otra acción principal del nimodipino es su efecto bloqueador de los canales de calcio, lo que en situaciones de daño isquémico y

traumático disminuye la entrada intracelular de calcio, toxicidad y muerte celular, por lo que se considera al nimodipino como un protector neuronal, además se ha observado que este agente puede favorecer la regeneración neuronal. (V *Angelov, Neiss, Streppel y col. 1996; Arakawa, Nishijima, Shimizu, 2002; Attsson, Ldskogius e Ikael, 1999; Biessels, Ter Laak y Kamal 2005; Lopez-Arrieta y Birks 2006; Mattsson, Björck, Remahl y col. 2005; Pane, Vales, Hinojosa y col. 2002; Sabbatini, Tomassoni y Di Tullio 2002; van der Zee, Schuurman, y Traber 1987; Voitenko, Kruglikov y Shutov. 2002*).

El grupo que mostró con mayor claridad diferencias contundentes del uso de nimodipino fue el de los injertos con nervio sensitivo, pero todos los grupos administrados con este agente mostraron mejor integración del injerto que los que recibieron vehículo.

IX. CONCLUSIONES

La anastomosis término-terminal, la interposición de injerto motor y la interposición de injerto sensitivo son útiles para promover la regeneración nerviosa. No obstante, el implante de un nervio motor lesionado con un injerto de nervio motor es mejor.

El uso del nimodipino favorece la integración de los injertos nerviosos en ratas en las que se implanta injertos motores ó sensitivos.

X. PERSPECTIVAS

Este trabajo demuestra en forma contundente cambios titulares que favorecen la integración de un injerto con el uso de nimodipino, y sin duda, servirá de base para caracterizar los efectos fisiológicos de este fármaco y para la evaluación y desarrollo de nuevos agentes que favorezcan las reparaciones nerviosas que se llevan a cabo por pérdidas nerviosas extensas.

Por otro lado, el desarrollo de este trabajo abre nuevas expectativas y líneas de estudio en el uso de injertos nerviosos.

XI. REFERENCIAS

- Adour KK**; Hilsinger Jr RL; Callan EJ. Facial paralysis and Bell's palsy: a protocol for differential diagnosis. *American Journal of Otolaryngology*. 1985; 6(suppl):68.
- Adour KK**: Prednisone treatment for idiopathic facial paralysis (Bell's palsy). *New England Journal of Medicine*. 1972; 287:1268.
- Angelov DN**; Neiss WF; Streppel M; Andermahr J; Mader K; Stennert E. Nimodipine accelerates axonal sprouting alter surgical repair of rat Facial Nerve. *Journal of Neuroscience*. 1996; 16(3): 1041 – 1048.
- Arakawa Y**, Nishijima Ch, Shimizu N. Survival promoting activity of nimodipine and nifedipine in rat motoneurons: implications of an intrinsic calcium toxicity in motoneurons. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 83: 150-156.
- Atlas M.D**; Lowinger D.S.G. A new technique for hypoglossal-facial nerve repair. *Laryngoscope* 1997; 107: 984-991.
- Attsson PM**, Ldskogius AA, Ikael M. Nimodipine induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J. Neurosurgery*. 1999; 90: 760-765.
- Bascom D.A.**, Schaitkin B.M., May M., Klein S.: Facial nerve repair. a retrospective review. *Facial Plastic Surgery*. 2000; 16: 309-313.
- Basso DM**; Fisher LC; Anderson AJ; Jakeman LB. McTigue DM; Popovich PG. Basso mouse scale for locomotion defects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of Neurotrauma*. 2006; 23(5):635-659.
- Best TJ**; Mckinnon SE; Midha R; Hunter D; Evans PJ. Revascularization of peripheral nerve autografts and allografts. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 1999; 104(1): 152-160.
- Biessels GJ**, Ter Laak MP, Kamal A. Effects of the Ca²⁺ antagonist nimodipino on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *Brain Research*. 2005; 1035 (1): 86-93.
- Brenner MJ**, Hess JR, Myckatyn TM. Repair of motor nerve gaps with sensory nerve inhibits regeneration in rats. *Laryngoscope*, 116: 1685-1692, 2006
- Brushart TM**. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J. Neurosci* 1993; 13: 2730-2738.

Cross T; Sheard ChE; Garrud P; Nikolopoulos TP; O'Donoghue GM. Impact of facial paralysis on patients with acoustic neuroma. *The Laryngoscope*. 2000; 110: 1539-1542.

Crumley RL; Armstrong WB. Rehabilitation of facial paralysis. En: Cummings Ch. *Otolaryngology: Head & Neck Surgery*, 4th ed., 2005 Mosby. Capitulo 35 : pp 824 Philadelphia, Pennsylvania.

Darrouzet V; Martel J; Eneé V ; Bébéar JP; Guérin J. Vestibular schwannoma surgery outcomes: our multidisciplinary experience in 400 cases over 17 years. *The Laryngoscope*. 2004;114:681-688.

De Souza AS; Da Silva CA; Del Bel EA. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *Journal of Neurotrauma*. 2004; 21(5):627-635.

Ferreira MC. Cross-facial nerve grafting *Clin Plast Surg* 1984; 11:211.

Fisch U: Surgery for Bell's palsy. *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery*. 1981; 107:1.

Guntinas-Lichius O; Straesser A y Streppel M. Quality of life after facial nerve repair. *The Laryngoscope*. 2007; 117:421-426.

Guntinas-Lichius O; Streppel M; Stennert E. Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *The American Journal of Surgery*. 2006;191:61-67.

Grogan PM, Gronseth GS. Practice parameter: steroids, acyclovir and surgery for Bell's palsy (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56(7):830-836.

Hatoko M, Tada H, Tanaka A, Kuwahara M. The differential expression of N-cadherin in vascularized and no-vascularized nerve grafts: A study in a rat sciatic nerve model. *Ann Plast Surg*. 2001; 47:322- 327

House JW; Brackmann DE. Facial nerve grading system. *Otolaryngology – Head & Neck Surgery* .1985;93:146-147

Kunkel – Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*. 1993; 119; 153-164.

- Koopmans GC**; Deumens R; Honig WMM; Hamers FPT; Steinbush HWM; Joosten EAJ. The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: The importance of objective analysis of coordination. *Journal of Neurotrauma*. 2005; 22(2):214-225.
- Kwon BK**; Fisher ChG; Dvorak MF; Tetzlaff W. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*. 2005; 30(175):S3-S13.
- Lopez-Arrieta**. Birks, J. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. [Systematic Review] *Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006; 3.
- Mattox DE**. Clinical disorders of the facial nerve. En: Cummings Ch. Otolaryngology: Head & Neck Surgery, 4th ed., 2005 Mosby. Capitulo 147:pp 3333-3348. Philadelphia, Pennsylvania.
- Mattsson P**; Björck G, Remahl S; Bäckdahl M; Hamberger B; Hydman J; Svensson M. Nimodipino and microsurgery induced recovery of the vocal cord after recurrent laryngeal nerve resection. *Laryngoscope*. 2005; 115:1863–1865.
- Nascimento V S**, D'Alva M S. Antioxidant effect of nimodipine in young rats alter pilocarpine induced seizures. *Pharmacology, biochemistry & behavior*. 2005; 82(1): 11-16,
- Pane CC**; Vales LO; Hinojosa R; Esteinou Madrid C; Cruz JE; Mañé A; Martínez Morán L; Poó JE; Torres y Gutierrez A; Olguin J; Abiuso J; Hanuch E; Alegría J; Volpi C; Flaskamp R; Peñaranda A; García Gómez JM; Hernández J; Pedraza A; Quijano D; Martínez C; Castañeda JR; Cardeñosa OJ; Valencia G. New approaches to the management of peripheral vertigo: Efficacy and safety of two calcium antagonist in a 12 weeks, multinational, double blind study. *Otology & Neurotology*. 2002; 23(3):357-363.
- Peitersen E**: Natural history of Bell's palsy. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1992; 492:122.
- Ramsey MH**, DerSimonian R, Holtel MR; Burgess LPA. Corticosteroid treatment for idiopathic facial nerve paralysis: a meta-analysis. *Laryngoscope* 2000; 110(3):335-341
- Reddy P.G.**; Arden R.L.; Mathog R.H.. Facial nerve rehabilitation after radical parotidectomy. *Laryngoscope*.1999;109: 894-899.

Rigby PL; Shah SB; Jackler RK; Chung JH; Cooke DD. Acoustic neuroma surgery: outcome analysis of patient-perceived disability. *American Journal of Otology*. 1997;18: 427-435.

Sabbatini M, Tomassoni D, Di Tullio MA. Neuroprotective effect of treatment with calcium antagonists on hypertensive retina. *Clinical and experimental hypertension*. 2002; 24 (7 & 8): 727-740.

Samii M; Cordula M. Management of 1000 vestibular Schwannomas (Acoustic neuromas): Surgical management and results with an emphasis on complications and how to avoid them. *Neurosurgery*. 1997; 40(1):11-23.

Spector J.G.: Mimetic surgery for the paralyzed face. *Laryngoscope*. 1985; 95. 1494-1522.

Strauss Ch; Romstöck J; Fahlbusch R; Rampp S; Scheller Ch. Preservation of facial nerve function after postoperative vasoactive treatment in vestibular Schwannoma surgery. *Neurosurgery*. 2006;59(3):577-584.

Tufarelli D; Meli A; Alesii A; De Angelis E; Badaracco C; Falcioni M; Sanna M. Quality of life after acoustic neuroma surgery. *Otology & Neurotology*. 2006;27(3):403-409.

van der Zee CEEM, Schuurman T, Traber J y Gispen WH. Oral administration of nimodipine accelerates functional recovering following peripheral nerve damage in the rat. *Neuroscience letters*. 1987;83: 143 – 148.

Voitenko N, Kruglikov I, Shutov L. Relief of diabetes – induced changes in nociceptive system of nimodipine treated rats. *Abstract book: 62nd scientific sessions; Friday, June 14 Tuesday, June 18; the Moscone center; San Francisco, California. 2002; 51(Suppl 2): P A195.*

XII. ANEXOS

Anexo 1. Sistema de graduación funcional del Nervio Facial de House – Brackmann ^a

Grado	Características
I. Normal	Función facial normal en todas las áreas
II. Disfunción leve	<p>Reposo: Leve debilidad notable en la inspección cercana. Puede haber sincinesias leves. En reposo, tono y simetría normal</p> <p>Movimiento: Frente: función moderada a buena Ojo: cierre completo con esfuerzo mínimo Boca: asimetría leve</p>
III. Disfunción moderada	<p>Reposo: Diferencia obvia, pero no desfigurante entre los dos lados. Sincinesias, contractura ó espasmo hemifacial notables pero no severos. En reposo, tono y simetría normal.</p> <p>Movimiento: Frente: movimiento leve a moderado Ojo: cierre completo con esfuerzo Boca: leve debilidad con máximo esfuerzo.</p>
IV. Disfunción moderadamente severa	<p>Reposo: Debilidad obvia y/o asimetría desfigurante. En reposo, tono y simetría normal.</p> <p>Movimiento: Frente: Ninguno Ojo: Cierre incompleto Boca: asimétrica con máximo esfuerzo</p>
V. Disfunción severa	<p>Reposo: Solamente movimiento apenas perceptible. Asimetría en reposo.</p> <p>Movimiento: Frente: Ninguno Ojo: Cierre incompleto Boca: leve movimiento</p>
VI. Parálisis total	Sin movimiento

^aTomado de: House y Brackmann, 1985.

Anexo 2. Método de Perfusión de la rata

a) Material

1. Bomba peristáltica a flujo bajo
2. Jeringa de 3ml
3. Gasas
4. Alcohol al 70%
5. Ketamina (1000mg/10ml) y Xilacina (20mg/ml)
6. Solución de lavado: PBS 1x (1000ml)

Sol. Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1x para 1 litro.

<i>Soluto</i>	<i>Cantidad</i>
Cloruro de Sodio	6.5
Fosfato de Potasio Monobásico	2.8
Fosfato de Potasio Dibásico	0.4

7. Solución de fijado: PFA al 2% (1000ml)

Sol. Paraformaldehído (PFA) al 2%

1. Calentar 300ml de agua bidestilada a no más de 60° C.
2. Pesar 20g de PFA (Se encuentra en refrigeración).
3. Verter los 20g de PFA en el agua bajo agitación.
4. Adicionar unas gotas de NaOH 10N/1N hasta la completa disolución del PFA.

5. Pesar reactivos para 1l de PBS 1x, disolverlos y aforar a 700ml con agua bidestilada.
6. Adicionar el PBS al PFA bajo agitación
7. Medir pH en potenciometro el cual no debe rebasar el valor de 9
8. Filtrarlo y ponerlo en hielo hasta que se use y durante su utilización.
9. Adicionar a la solución de lavado 1ml de Heparina por cada 500ml.

b) Parámetros de bomba peristáltica PERIMATIC GP

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Volumen	0.5ml
Count	999
Delay	0.5seg
Modo	Automatic
Profile	Show/Slow/Slow
Tube	5mm
Dirección	Run clockwise
Round	↓↓

c) Anestesia intraperitoneal

1. Cargar jeringa con Ketamina 1.5 ml (1000mg/10ml) y Xilacina 0.2ml (20mg/ml)
2. Tomar la rata por el dorso, con una sola mano, en un solo movimiento.
3. Con la rata correctamente inmovilizada (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) inclinarla caudalmente y trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas. (Fig. 1A línea roja).
4. La aguja deberá ser insertada sobre esta línea, en el lado derecho del animal y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente el abdomen (Fig. 1A línea azul). De esta manera disminuimos el riesgo de inyectar en ciego o vejiga urinaria.
5. La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente medio centímetro y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.
6. Aspirar para asegurarse de que no se ha alcanzado ningún vaso sanguíneo, ciego o vejiga urinaria.
7. Si ningún fluido es aspirado, proceder a la inyección de la muestra.
8. Retirar la aguja y presionar ligeramente la zona de inyección.

d) Perfusión in vivo

1. Con la rata ya anestesiada, colocarla en posición decúbito supino sobre una placa/rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación.

2. Lavar la superficie de la rata con etanol 70°.
3. Realizar un corte en la piel a la altura del final del esternón, separar la piel y cortar las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón.(Fig. 1B)
4. Insertar la aguja, bien de la jeringuilla o bien de la manguera (en caso de utilizar el aparato de perfusión) que contiene la solución de lavado, en el ventrículo izquierdo y profundizar en dirección a la aorta. (Fig. 1C)
5. La aguja puede fijarse con pinza Kelly durante la perfusión.
6. Realizar una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. (Fig. 1C)
7. Proceder al lavado con la solución salina o PBS 1x (1000ml)
8. Proceder a la perfusión de la solución de fijado (PFA 2% 1000ml).
9. Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación del animal.
10. Al finalizar, retirar la aguja y proceder a la extracción de los órganos deseados.
11. Obtención de los órganos deseados

Anexo 3. Método de tinción hematoxilina-eosina modificada

Tren de tinción

Hematoxilina Gill

Agua

Carbonato de litio

Eosina Y

Alcohol 96%

Alcohol 96%

Alcohol absoluto

Alcohol absoluto

Alcohol absoluto/xilol

Xilol

Xilol

Material

- A. Hematoxilina anhidra (Hämatoxylin indikator and für die mikroskopie) $C_{16}H_{14}O_6$, Polvo. MERK, Art. 4305.
- B. Carbonato de litio Li_2CO_3 , Polvo. J.T. Baker®, 2362.
- C. Eosina Y amarillenta soluble en agua (Yellowish eosin microscopy) $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Polvo. Merk, 15935.
- D. Alcohol Etilico.
- E. Xilol (Xylenes) $C_6H_4(CH_3)_2$. Lab Guard®, 8668.
- F. Etilenglicol $HOCH_2CH_2OH$. J.T. Baker®, 9300
- G. Yodato de sodio.
- H. Ácido acético glacial CH_3COOH , J.T. Baker®, 9507-61.
- I. Resina poly-mount, Polieciences, Inc, Cat. 08381.

Preparación de las soluciones

Hematoxilina Gill

Agua destilada	750ml
Etilenglicol	250ml
Hematoxilina	2.0g
Yodato de sodio	0.2g
Sulfato de aluminio	17.6g
Ácido acético glacial	2ml

Procedimiento

Se prepara en el orden en que están los reactivos y se pone en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Filtrar a través de papel Whatmann del No. 1. Este colorante no mancha el recipiente en el que se guarda, ni se precipita y dura muchos meses. Debe evitarse exponer a los rayos del sol y guardar en un frasco color ámbar rotulado.

Eosina

Solución de Stock

Eosina	1g
Agua destilada	20ml
Alcohol 96%	80ml

Solución de Trabajo

Solución de Stock	1 parte
Alcohol 80 grados	3 partes

Exactamente antes de usar, adicionar 0.5 ml de ácido acético glacial por cada 100ml de colorante y agitar

Solución para Virar Carbonato de Litio saturado en Agua

Carbonato de litio	1.0gm
Agua destilada	100.0ml

Procedimiento

Desparafinar

- 1.- Colocar las laminillas en la estufa durante 20 minutos

Nota: No hacer inmediato el paso 1 al paso 2, esperar por lo menos 10 seg.

- | | |
|----------------------------|-------|
| 2.- Xilol I | 5min |
| 3.- Xilol II | 5min |
| 4.- Alcohol absoluto/xilol | 5seg |
| 5.- Alcohol absoluto | 5seg |
| 6.- Alcohol absoluto | 5seg |
| 7.- Alcohol 96% | 5seg |
| 8.- Alcohol 96% | 5seg |
| 9.- Agua destilada | 10seg |

Tinción

- | | |
|---|----------|
| 1.- Hematoxilina Gill | 10min |
| 2.- Enjuagar en tina llena con agua
Corriente y con chorro abierto | 20 Baños |
| 3.- Carbonato de litio | 10 Baños |
| 4.- Enjuagar en cuba con agua corriente | 10 Baños |
| 5.- Eosina | 10 Baños |
| 6.- Alcohol 96% | 5 Baños |
| 7.- Alcohol 96% | 5 Baños |
| 8.- Alcohol absoluto | 5 Baños |
| 9.- Alcohol absoluto | 5 Baños |
| 10.- Alcohol absoluto/xilol | 5 Baños |
| 11.- Xilol | 5 Baños |
| 12.- Xilol | 5 Baños |
| 13.- Montar con cubreobjetos cada corte con 3 gotas de resina. | |

Anexo 4. Método de tinción tricrómico de Masson

Tren de Tinción

Solución de Bouin

Agua

Alcohol 50%

Hematoxilina Férrica de Weigert

Agua

Agua Desionizada

Fucsina Ácida-Escarlata de Biebrich

Agua desionizada

Ácido Fosfotúngstico/ Ácido Fosfomolibdico

Azul de Anilina

Ácido Acético al 1%

Material

- A. Xilol (Xylenes) $C_6H_4(CH_3)_2$. Lab Guard®, 8668.
- B. Alcohol Etilico.
- C. Agua Destilada.
- D. Ácido Pícrico 2.4.6. $(NO_2)_3C_6H_2OH$, cristales. J.T.Baker®, 041373.
- E. Formaldehído (Chloroform) $CHCl_3$. Lab Guard®, 4443.
- F. Ácido Acético Glacial CH_3COOH . J.T. Baker®, 9507-61.
- G. Hematoxilina (Hematoxylin Anhydrous) $C_{16}H_{14}O_6$, Cristales. SIGMA CHEMICAL COMPANY, No. H-9627.
- H. Cloruro Férrico $FeCl_{3.6}H_2O$, Trozos. J.T.Baker®, 1996.
- I. Ácido Clorhídrico HCl. J.T. Baker®, 9535-61.
- J. Agua Desionizada.
- K. Solución de Fucsina Ácida-Escarlata de Biebrich (Escarlata Biebrich 0.9%, Fucsina Ácida 0.1%, en Ácido Acético 1.0%). SIGMA - ALDRICH®, número de catálogo HT15-1.
- L. Solución Ácido Fosfotúngstico (Ácido Fosfotúngstico, 10%). SIGMA - ALDRICH®, número de catálogo HT15-2.

- M. Solución de Ácido Fosfomolibdico (Ácido Fosfomolibdico 10%). SIGMA –ALDRICH®, número de catálogo HT15-3. La formación de un precipitado no afecta al rendimiento.
- N. Solución Azul de Anilina (Azul de Anilina 2.4%, y Ácido Acético 2%). SIGMA –ALDRICH®, número de catálogo HT15-2.
- O. Resina Poly-mount. Polieciences, Inc, Cat. 08381.

Preparación de Soluciones

- A. Alcohol 96%
- B. Solución acuosa saturada con Ácido Pítrico
- C. Solución Formol 37-40%
- D. Alcohol 50%
- E. Solución de Bouin

Ácido Pítrico, solución acuosa saturada	750.0ml
Formol 37-40%	250.0ml
Ácido Acético Glacial	50.0ml

Almacenar después de su uso a temperatura ambiente en un frasco rotulado.

Para remover al ácido pítrico se dejan las preparaciones durante 15 min en agitación en una cuba con Alcohol 50% hasta eliminar el color amarillo de los tejidos

- F. Alcohol 95%
- G. Cloruro Férrico 29% (acuoso)
- H. Solución Hematoxilina Férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina	1.0g
Alcohol 95%	100.0ml

Solución B

Cloruro Férrico 29% (acuoso)	4.0ml
Agua Destilada	95.0ml
Ácido Clorhídrico, concentrado	1.0ml

Solución de Trabajo

Partes iguales de la solución A y solución B.

Almacenar después de su uso a temperatura ambiente en un frasco color ámbar rotulado.

I. Solución Ácido Acético 1%

Ácido Acético Glacial	1.0ml
Agua Destilada	100.0ml

Desechar solución después de su uso.

J. Solución de Trabajo Ácido Fosfotúngstico/ Ácido Fosfomolibdico

Mezclar un volumen de Solución Ácido Fosfotúngstico, número de catálogo HT15-2, y un volumen de Solución de Ácido Fosfomolibdico, número de catálogo HT15-3, con dos volúmenes de Agua Desionizada. Almacenar después de su uso a temperatura ambiente en un frasco rotulado.

Procedimiento de Tinción

Desparafinado

- 1.- Colocar las laminillas en la estufa durante 20 minutos
- 2.- Xilol I 5min
- 3.- Xilol II 5min
- 4.- Alcohol Absoluto/Xilol 5seg
- 5.- Alcohol Absoluto 5seg
- 6.- Alcohol Absoluto 5seg
- 7.- Alcohol 96% 5seg
- 8.- Alcohol 96% 5seg
- 9.- Agua Destilada 10seg

Tinción

- 1.- Colocar los portaobjetos en Solución de Bouin a temperatura ambiente toda la noche.
- 2.- Lavar los portaobjetos en agua corriente 5min
- 3.- Colocar en agitación en una cuba con Alcohol 50% 15min

4.- Teñir en Solución de Hematoxilina Férrica de Weigert	5min
5.- Lavar con agua corriente (20Baños al inicio y al final)	5min
6.- Aclarar con Agua Desionizada	20Baños
7.- Teñir en Solución Fucsina Ácida-Escarlata de Biebrich, número de catálogo HT15-1	5min
8.- Aclarar con Agua desionizada	20Baños
9.- Colocar los portaobjetos en Solución de Trabajo Ácido Fosfotúngstico/ Ácido Fosfomolíbdico	5min
10.-Colocar los portaobjetos en Azul de Anilina, número de catálogo HT15-2	5min
11.-Colocar los portaobjetos en Ácido Acético al 1%	2min
Aclaramiento	
1. Alcohol 96%	10Baños
2. Alcohol 96%	10Baños
3. Alcohol Absoluto	10Baños
4. Alcohol Absoluto	10Baños
5. Alcohol Absoluto/Xilol	10Baños
6. Xilol	10Baños
7. Xilol	10Baños
8. Montar con cubreobjetos cada corte con una (murino) o 3 (canino) gota(s) de resina.	

Anexo 5. Método Klüver-Barrera para mielina y células nerviosas

Tren de Tinción

Azul Luxol Rápido

Alcohol 95%

Agua Destilada

Carbonato de Litio

Alcohol 70%

Agua Destilada

Carbonato de Litio

Alcohol 70%

Agua Destilada

Violeta de Cresilo

Alcohol 95%

Alcohol Absoluto

Xilol

I. Material

A. Azul luxol rápido, polvo, SIGMA, 2653.

B. Alcohol etílico.

C. Ácido glacial acético CH_3COOH . J.T. Baker®, 9507-61.

D. Violeta de cresilo (Cresyl violet acetate) $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$, (Dye content 75%, sodium content N/A), polvo, SIGMA, C 5042.

E. Água destilada.

F. Carbonato de litio Li_2CO_3 , polvo. J.T. Baker®, 2362.

G. Xilol (Xylenes) $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$. Lab Guard®, 8668.

H. Resina poly-mount, Polieciences, Inc, Cat. 08381.

II. Preparación de las Soluciones

A. Azul luxol rápido 0.1%

Azul luxol rápido	0.1 g
Alcohol 95%	100.0 ml

NOTA: Agregar 0.5 ml de ácido glacial acético a cada 100 ml (la solución es estable).

B. Violeta de cresilo 0.1%

Violeta de cresilo	0.1 g
Agua destilada	100.0 ml

NOTA: Justo antes de su uso, agregar 15 gotas de ácido glacial acético al 10% y filtrar. Usar precalentada a 57°C.

C. Carbonato de Litio 0.05%

Carbonato de Litio	0.05 g
Agua Destilada	100.0 ml

D. Alcohol 95%

Alcohol 100%	95.0 ml
Agua Destilada	5.0 ml

E. Alcohol 70%

Alcohol 100%	70.0 ml
Agua Destilada	30.0 ml

III. Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar hasta Alcohol 95%.
2. Colocar las laminillas en la solución de azul luxol rápido a 56-60 °C durante 15 h.
3. Aclarar con alcohol 95% en dos baños diferentes agitando gentilmente hasta que no se desprenda más colorante (aprox. 10 min en cada cuba).
4. Aclarar en agua destilada hasta que no se desprenda más colorante (aprox. 15 min).
5. Iniciar la diferenciación entre sustancia gris y sustancia blanca con una inmersión rápida en la solución de carbonato de litio 0.05%.
6. Continuar la diferenciación en alcohol 70% en tres baños diferentes, agitando gentilmente durante 1 min cada 4 min e invirtiendo un total de 15 min en cada uno de ellos.
7. Lavar gentilmente en agua destilada (aprox. 5 min).
8. Hacer una última inmersión rápida en carbonato de litio 0.05%.
9. Terminar la diferenciación en alcohol 70% en tres baños diferentes, agitando gentilmente durante 1 min cada 4 min e invirtiendo un total de 15 min en cada uno de ellos.
10. Lavar gentilmente en agua destilada (aprox. 5 min).
11. Colocar las laminillas en la solución de violeta de cresilo precalentada durante 10 min.
12. Diferenciar en alcohol 95% en 2 baños diferentes agitando gentilmente e invirtiendo 3 min en cada uno de ellos.
13. Deshidratar en alcohol absoluto en 2 baños diferentes mediante 5 enjuagues lentos en cada uno de ellos.
14. Aclarar en xilol en 2 baños diferentes mediante 5 enjuagues lentos en cada uno de ellos.
15. Montar cubreobjetos con 4 gotas de resina.

VITAE

DATOS ACADEMICOS

EDUCACION PRIMARIA

Esc. Primaria Oficial "Margarita Maza de Juárez"
San Luis Potosí, S. L. P.
1982 – 1988

EDUCACION SECUNDARIA

Esc. Secundaria Oficial "Prof. José Ciríaco Cruz"
San Luis Potosí, S. L. P.
1988 – 1991

EDUCACION MEDIA SUPERIOR

Esc. Preparatoria "Lic. Jesús Silva Herzog"
Bachillerato Químico – Biológico y Físico - Matemático
San Luis Potosí, S. L. P.
1991 – 1993

EDUCACION SUPERIOR

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Licenciatura en carrera de Médico Cirujano
1993 – 1999
Promedio general en la carrera: 9.46
Lugar ocupado en la carrera: 7° (Generación de 67 alumnos)
Fecha de Examen Profesional: 22 de enero del 2000
Examen general para el egreso de la Licenciatura en Medicina General
(CENEVAL) 2do lugar:
Aprobado (Testimonio de Alto Rendimiento Académico / 21 de octubre de 1999)

INTERNADO ROTARORIO

Hospital General del ISSSTE
San Luis Potosí, S. L. P.
1 de julio de 1998 al 30 de junio de 1999
Calificación final: 10.0

SERVICIO SOCIAL

Instituto Mexicano del Seguro Social
Unidad Médica Rural No. 163, localidad de Ejido Rodrigo
Mpo. De Villa de Reyes
San Luis Potosí, S. L. P.
1 de agosto de 1999 al 31 de julio de 2000

ESTUDIOS DE POSTGRADO

XXIV Examen Nacional de Aspirantes a Residencias Médicas en
Otorrinolaringología
30 de septiembre y 1 de octubre de 2000
Lugar obtenido en su grupo de especialidad: 6 (500 aspirantes)

Estudio de Postgrado en la Especialidad de Otorrinolaringología
Hospital de Especialidades C. M. N. No. 1, León, Gto.
I. M. S. S.
1 de marzo de 2001 al 28 de febrero del 2005
Fecha de Examen Final de Especialidad: 16 de febrero del 2005

Examen de Ingreso al Consejo Mexicano de O. R. L. y Cirugía de Cabeza y Cuello
11 y 12 de Febrero del 2005
APROBADO. Con folio No. 1809, credencial No. EST-1809/05
7mo lugar

Estudio de Subespecialidad de Neurología
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
1 de marzo del 2006 a la fecha (Finalización 28 de febrero 2008)

TRABAJOS

“Presentación Atípica de quiste branquial en adulto”

Trabajo libre
XXIV Congreso Nacional FESORMEX
Mérida, Yucatán
Octubre 2002

“Resultados de Miringoplastias en el HE IMSS CMN León, Gto, durante el periodo 1998 – 2002”

Trabajo libre
LIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de ORL y CCC
Mayo 2003

“Respuesta a lisados bacterianos en pacientes pediátricos con cuadros infecciosos repetitivos”

Trabajo libre

LIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de ORL y CCC

Mayo 2003

“Quinolona Vs Clindamicina en manejo de sinusitis crónica”

Trabajo libre

LIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de ORL y CCC

Mayo 2003

“Comparación de inhibidores Cox 2 Vs glucocorticoide tópico nasal en pacientes con poliposis nasal sin componente alérgico”

Trabajo libre

LIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de ORL y CCC

Mayo 2003

“Linfoma No Hodgkin, presentación de un caso”

Trabajo libre

XXV Congreso Nacional FESORMEX

Octubre 2003

“Papiloma nasal invertido del Seno Frontal, reporte de un caso”

Trabajo libre

XV Congreso Nacional de la FESORMEX

Octubre 2003

“Poliposis nasosinusal con extensión intracraneal”

Trabajo libre

XXVI Congreso Nacional FESORMEX

Octubre 2004

“Parálisis Facial Bilateral Simultánea”

Trabajo libre

XXVI Congreso Nacional FESORMEX

Octubre 2004

RECONOCIMIENTOS

Testimonio de Alto Rendimiento Académico en el EGEL – MG del CENEVAL

14 diciembre 1999

Reconocimiento por Primer Lugar de Aprovechamiento académico en la
Especialidad de Otorrinolaringología

Ciclo escolar 2003 – 2004

Universidad de Guanajuato

30 noviembre 2004

Reconocimiento por Primer Lugar de Aprovechamiento académico en la
Especialidad de Otorrinolaringología

Ciclo escolar 2004 – 2005

Universidad de Guanajuato

21 noviembre 2005

Reconocimiento por Promedio más alto durante los estudios de la Especialidad de
Otorrinolaringología

Universidad de Guanajuato

21 noviembre 2005