

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**



**“REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS  
MEDIANTE CONSTRUCTOS  
TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES DE LA GRASA E  
HIDROGELES DE FIBRINA-AGAROSA”**

**JUAN GARRIDO GÓMEZ**  
Granada y Abril de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan Garrido Gómez  
D.L.: Gr 4057-2011  
ISBN: 978-84-694-3616-5



**“REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS MEDIANTE  
CONSTRUCTOS TRIDIMENSIONALES CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES DE LA GRASA E HIDROGELES DE FIBRINA-  
AGAROSA”**

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía  
Juan Garrido Gómez  
para aspirar al título de Doctor.

Fdo.: Juan Garrido Gómez

Vº Bueno del director de la tesis.

Vº bueno del director de la tesis

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Pedro Hernández Cortés  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Universidad de Granada  
Hospital Universitario San Cecilio.  
Granada.

Vº Bueno del director de la tesis.

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz  
Doctor en Medicina y Cirugía.  
Universidad de Granada.

Departamento de Histología  
Departamento de Cirugía y sus especialidades  
Universidad de Granada  
2011

## **DEDICATORIA:**

A todas las personas que me apoyaron y que confiaron en mí en los momentos difíciles de mi infancia. Por vosotros es hoy posible esta tesis doctoral. Gracias.

*“Cuando quieras una cosa, todo el Universo conspirará para que la consigas”*

Paulo Coelho. El alquimista.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Nunca el agradecimiento puede quedar suficientemente reflejado por escrito por cuanto las palabras, aunque transductoras ideales de sentimientos, tienen cualidad física, y es, en otro rango más espiritual donde nace y permanece la gratitud.*

En primer lugar, agradecer eternamente a MI FAMILIA su apoyo incondicional durante mis 28 años de vida. Gracias por vuestro esfuerzo constante, por inculcarme la humildad, el sacrificio diario y la constancia como pilares de mi vida. A vosotros no dedico esta tesis doctoral, os dedico MI VIDA ENTERA.

A mi futura esposa, Verónica, por enseñarme a soñar y a luchar por los sueños. Gracias por tu inagotable paciencia, por ser como eres, por tus sabios consejos y por ser mi sombra durante los 14 años de relación que nos unen.

A mis amigos del alma, Manuel López y Miguel Ángel Arrabal, por estar siempre ahí, por brindarme vuestros magníficos consejos y por todos los buenos y malos momentos que hemos vivido juntos. A todos los amigos de la infancia, Zafra, Edu, Cabrera, Alfonso, Jose, por escuchar mis proyectos y ayudarme a desconectar en los momentos de cansancio y desánimo. A Miguel Ángel López, por *resetear* la memoria *ram* y volverla a configurar cada vez que el ordenador se quedaba “pillado”. A Paco Checa y a mi padre, por enseñarme la disciplina del duro trabajo diario en la carpintería, que ahora me hace valorar mucho más lo que consigo.

A mi gran amigo y compañero Pedro Hernández, al que considero mi maestro en el arte de la cirugía. Por suscitar en mí la curiosidad de desarrollar nuevas técnicas y métodos para solventar los problemas de nuestros pacientes, por corregirme, por ser crítico, por ser exigente, por no aceptar cualquier resultado. No puedo expresar el profundo agradecimiento por su dedicación al campo de la enseñanza, por las horas de cirugía que hemos compartido y por dirigir esta tesis doctoral.

A Miguel Alaminos, su gran capacidad de trabajo y su humildad. Gracias por esa silla de tu despacho donde tantas horas hemos escrito frente al ordenador, por las lágrimas de pena cuando se nos derramó el formol, por todos los buenos momentos que he pasado en mi doctorando. Gracias por dirigir mi tesis y ayudarme a tomar las decisiones importantes, por abrirme las puertas del laboratorio y poner a mi disposición todos los medios y conocimientos que posee.

A José Antonio Sáez, por tus sabios consejos tanto en la clínica diaria como en la investigación, por tu perfeccionismo en el diseño del trabajo, por las preguntas que nunca sé contestarte, por tu dedicación a esta tesis doctoral de manera desinteresada desde el primer día que toqué a la puerta de tu despacho para pedirte ayuda.

A Salomé García, por todas las tardes que has dedicado a realizar los electromiogramas de todas y cada una de las ratas. Por tener siempre una sonrisa y unas palabras de ánimo para continuar con el trabajo a pesar de las dificultades con las que nos hemos ido encontrando.

A Sebastián Carriel (*chulillo*), por todas las horas que ha dedicado a esta tesis doctoral. Gracias por aguantar mi somnolencia frente al microscopio en los días saliente de guardia y por impregnarme de los valores que mueven a las personas a ayudar a otras.

A José Manuel Ferrer, padrino de la promoción, amigo y un modelo en todos los campos, humanos y técnicos. Gracias por tu tiempo, impregnarme de tu experiencia y tu sabiduría.

Agradecer a todos los compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico de Granada: Pipi, Diana, Paco, M. José, Carlos, Rafa, Cabello, Pepelu, Peñas, Lucía, Villén, Garvayo, Siles, Pajares, García Hernández, Antelo, Álvarez de Cienfuegos, Sánchez Ortega, Aznar, Fernández... por animarme para seguir adelante con este proyecto, por cogerme el bus para “escaparme” un momento a la facultad para ver cómo están las ratas, por preocuparse por mi formación como cirujano, por ser mi familia durante estos cuatro años de residencia. Además, gracias a mi Jefe de Servicio, Javier Torres, por ser más horizontal que vertical en la relación interpersonal. Gracias por las decenas de consejos que me has brindado, por insistirme que primero es el corazón y luego la cabeza, por ser más un padre que un jefe y, por apostar, por mis cualidades, tanto personales como clínicas, en las situaciones más adversas.

Agradecer al Departamento de Histología de la Universidad de Granada, especialmente al Dr. Campos por su apoyo y orientación en éste proyecto y por considerarme siempre como “uno más” del equipo. Gracias a Ingrid Garzón por su gran disposición y facilitarme todo el material y trabajo en el laboratorio a cualquier hora y cualquier día. A Miguel González Andrades, por sus consejos y sus palabras de ánimo para continuar con esta tesis doctoral y por prometernos a nosotros mismos que “...a partir de ahora vamos a vivir más y a trabajar menos...”.

Gracias a Serafín, por el cuidado de los animales, tener siempre a punto el quirófano experimental del departamento, la disposición para ayudarme y enseñarme a manejar los animales de experimentación a pesar de las mordeduras (nunca se me olvidará lo del guante de acero). A Concha y Amalia, por cederme sus instalaciones, cuidar de los animales y poner a mi disposición su ayuda y cariño en cada una de las intervenciones.

Gracias a los supervisores de quirófano, Carmelo Chinchilla y Carmen Barba, por ponerme en contacto con Prim Distribuciones y por apoyar esta causa de forma altruista y constante con los medios de los que disponían. A Prim Distribuciones, en especial a Inocencio López, por ceder los conductos nerviosos de NeuraGen que han sido utilizados en esta tesis doctoral y por el interés que ha mostrado desde el primer momento en este proyecto

Gracias a mis profesores, en especial a Isabel e Inés Arboledas, por aquellos consejos no sólo de Literatura; a Rosario Cañabate, por aquellos procesos de digestión que me fascinaban y que hicieron aflorar mi vocación (nunca te lo dije); Asunción y Cristobal, por aquellas matrices y logaritmos con tendencia al infinito; Paco Colodro, por enseñarme a entender a Platón; Simona Villar, Jose Luis López y Javier Gómez-Urda, por iniciar en mí el inglés que tan útil me ha sido para leerme los casi doscientos artículos que componen la bibliografía de esta tesis; a Pepe y Caty, que me dieron el empujón químico-biológico en la recta final; todos me ayudaron a dar un giro en mi vida para alcanzar la Facultad de Medicina.

Gracias a todos los pacientes que han pasado por mis manos, porque de cada uno he aprendido cada día un poco más.

Gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

# **ÍNDICE**

# INTRODUCCIÓN:

## 1. EL NERVI PERIFÉRICO.

- 1.1. ANATOMÍA DEL NERVI PERIFÉRICO (pág. 15-17)
- 1.2. HISTOLOGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO (pág. 17-21)
- 1.3. FISIOLÓGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO (pág. 21-42)
- 1.4. LESIONES NERVIOSAS:
  - Clasificación (pág. 25-27)
  - Principios de la regeneración nerviosa (pág. 28-35)
- 1.5 TRATAMIENTO ACTUAL DE LAS LESIONES NERVIOSAS.
  - Tratamiento inicial o en fase aguda (pág. 35-37)
  - Tratamiento reparador definitivo (pág. 37-39)
  - Técnica quirúrgicas de reparación nerviosa (pág. 39-63)
  - Tratamientos paliativos (pág. 63-71)

## 2. INGENIERÍA TISULAR. MEDICINA REGENERATIVA.

- 2.1 CONCEPTOS. INTRODUCCIÓN (pág. 72-74).
- 2.2 CÉLULAS MADRE
  - A. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (pág. 75-76)
  - B. CÉLULAS MADRE FETALES (pág. 77)
  - C. CÉLULAS MADRE ADULTAS (pág. 77-80)
- 2.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PROCEDENTES DE LA GRASA (ADSC) (pág. 80-84)
- 2.4 BIOMATERIALES (pág. 84-86)
- 2.5 LA INGENIERÍA TISULAR EN LAS LESIONES DEL NERVI PERIFÉRICO (pág. 86-88)

## OBJETIVOS (pág. 90)

## MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Tipo de estudio (pág. 92)
2. Sujetos de estudio (pág. 92)
3. Generación de modelo de lesión de nervio periférico (pág. 92-96)
4. Grupos de estudio (pág. 96-97)
5. Reparación microquirúrgica del defecto nervioso (pág. 98-99)
6. Generación de hidrogeles de fibrina-agarosa tridimensional (pág. 99-100)
7. Cultivos primarios de células madre derivadas de la grasa (ADSC) (pág. 100-103)
8. Variables de estudio (pág. 103-114)
9. Análisis estadístico (pág. 114)

## RESULTADOS.

**A. Modelo experimental de lesión de nervio periférico** (pág. 116)

**B. Parámetros clínicos:** úlceras / amputaciones-automutilaciones (pág. 116-118)

**C. Parámetros de recuperación funcional.** Actividad motora espontánea (pág. 118-123)

**D. Estudio de la huella plantar** (pág. 123-125)

**E. Resultados neurofisiológicos** (pág. 125-130)

**F. Resultados histológicos. Inmunohistoquímica** (pág. 130-154)

## DISCUSIÓN (pág. 155-170)

CONCLUSIONES (pág. 170-173)

BIBLIOGRAFÍA (pág. 174-189)

# INTRODUCCIÓN.

El cuerpo humano posee alrededor de 100 trillones de células, con aproximadamente 260 fenotipos diferentes, que se asocian en el espacio y el tiempo para formar tejidos y órganos. A pesar de la complejidad de nuestro organismo, existen sólo cuatro tipos básicos de tejidos: epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso. Asociados en diferentes proporciones, conforman los distintos órganos y aparatos de nuestra economía corporal (Campos, 2004).

***En la actualidad, es una asignatura pendiente poder ofrecer un tratamiento eficaz a las lesiones del nervio periférico, fundamentalmente, en las que existe una pérdida de sustancia nerviosa que impide la reparación directa. La mayor parte de nuestros nervios espinales son mixtos, estableciéndose ante tal tipo de lesión, un déficit motor de todos los grupos musculares dependientes de ese nervio y un déficit sensitivo que puede llegar a ser, incluso, más incapacitante.***

***Los tratamientos quirúrgicos de los que disponemos actualmente cuando hay un defecto nervioso son muy limitados y la mayor parte de ellos con malos resultados de recuperación funcional. Por tanto, es necesario investigar nuevas terapias orientadas a reparar las lesiones nerviosas periféricas y que puedan mejorar su mal pronóstico.***

***La Ingeniería Tisular nos abre la puerta de la esperanza para desarrollar terapias avanzadas que nos permitan resolver las lesiones producido en el seno de un tejido, como el nervioso, donde la capacidad de replicación de las neuronas es inexistente e imposible.***

**J. Garrido Gómez**

# EL NERVIO PERIFÉRICO.

## 1.1 ANATOMÍA DEL NERVIO PERIFÉRICO.

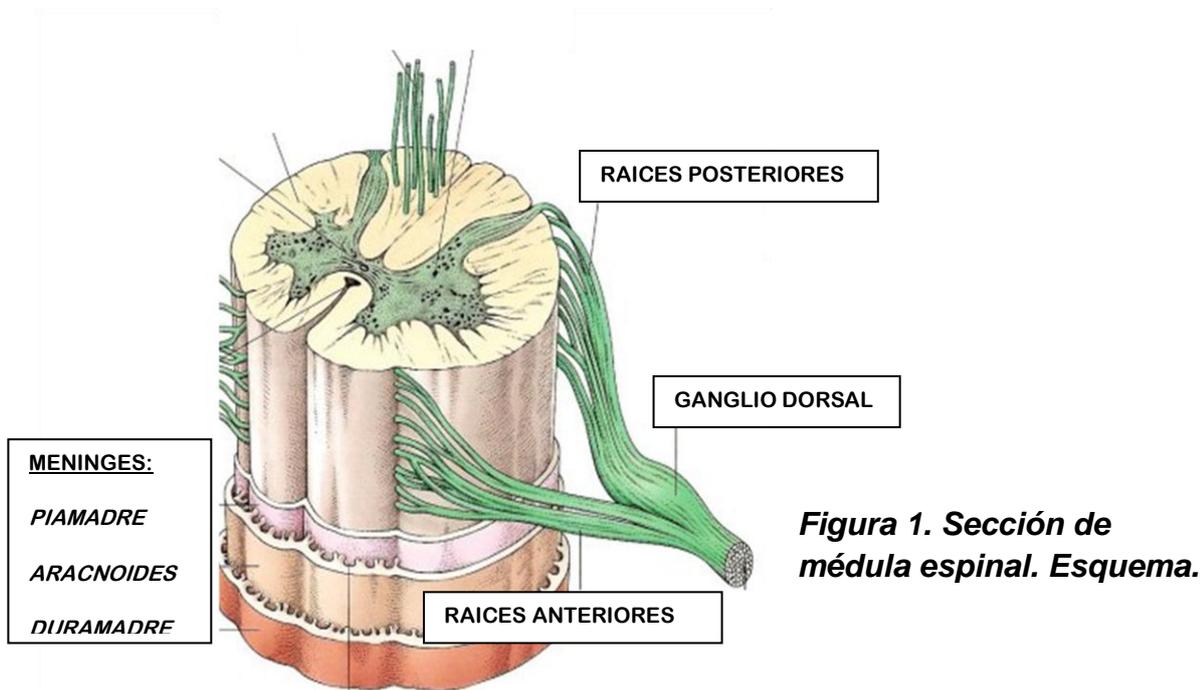
El sistema Nervioso Periférico está compuesto por 31 pares de RAICES NERVIOSAS, (y sus prolongaciones) y por 12 pares de NERVIOS CRANEALES.

Los 31 pares de raíces nerviosas se disponen de la siguiente manera: 8 pares cervicales, 12 pares dorsales, 5 pares lumbares, 5 pares sacros y 1 par coccígeo.

Hay que hacer notar que hay 8 pares cervicales y solo 7 vértebras. Ello es debido a que el primer par cervical emerge entre el occipital y la primera vértebra

cervical, el segundo entre la primera y segunda vértebras cervicales (C1 y C2), etc., hasta el octavo par dorsal sale entre C7 y D1. A partir de ese nivel, el primer par dorsal sale entre D1 y D2, y se continúa de igual forma hasta el quinto par lumbar, que sale entre L5 y S1. Las raíces sacras emergen por los correspondientes orificios sacros. El coccígeo sale por el hiato coccígeo.

Cada raíz nerviosa está constituida en realidad por dos raíces: una raíz dorsal o posterior (aférente), que contiene un ganglio sensitivo (Ganglio Dorsal); y una raíz ventral o anterior (eferente). Ambas se unen para formar una raíz única a nivel del agujero de conjunción (Figura 1). En el agujero de conjunción, la duramadre que recubre a las raíces se continúa con la cubierta del nervio periférico. A partir de ese momento a las raíces se denomina, excepto en la región dorsal, PLEXOS, porque, durante un trayecto de varios centímetros, existen abundantes comunicaciones entre sus distintos TRONCOS. Los plexos son: el cervical (C1-C4), el braquial (C5-D1) el lumbar (L1-L4) y el lumbosacro (L4-S1). (Figura 2)



**Figura 1. Sección de médula espinal. Esquema.**

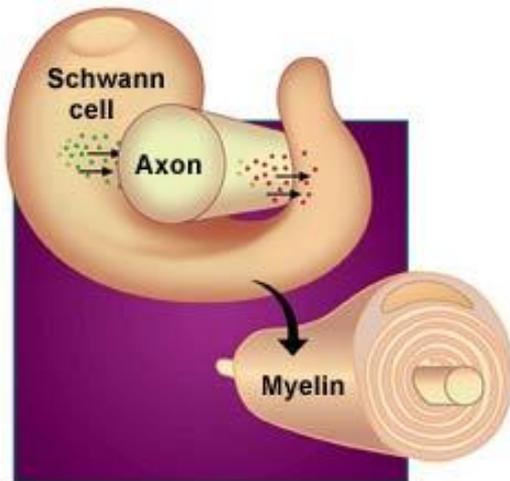
El sistema nervioso de nuestro organismo incluye todo el tejido nervioso y tiene por función principal la comunicación. Debido a su configuración estructural con prolongaciones muy largas y propiedades electrofisiológicas especiales, las células nerviosas están especializadas para ello. En la célula nerviosa, la neurona, las funciones celulares generales de **irritabilidad** (capacidad de la célula de reaccionar ante distintos estímulos) y de **conductividad** (capacidad de transmitir los efectos de la estimulación hacia otras partes de la célula, a la que se agrega la capacidad de transferir información a otras células) alcanzan su máximo desarrollo. (Matthews G, 1996).

La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, que tiene un cuerpo celular, un axón y frecuentemente muchas dendritas. Hay cuatro clases de neuronas: neuronas sensoriales, interneuronas, neuronas de proyección y neuronas motoras. Muchas están rodeadas y aisladas por células de la glía, llamadas neuroglia en el sistema nervioso central y células de Schwann en el sistema nervioso periférico. Las células de la glía, no participan directamente en la producción del impulso nervioso, sino que proporcionan la vaina de mielina que acelera la transmisión de las señales a través de las neuronas, además actúan como tejido de sostén, facilitan la nutrición de las neuronas y la eliminación de sus desechos metabólicos y sirven como guías para el desarrollo neuronal. (Gerhmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW, 1995)

El sistema nervioso de los vertebrados tiene subdivisiones que pueden ser distinguidas por criterios anatómicos, fisiológicos y funcionales. La principal, es la subdivisión en sistema nervioso central, el cerebro y la médula espinal; y sistema nervioso periférico, las vías sensoriales y motoras que llevan información hacia y desde el sistema nervioso central. Las vías motoras incluyen a su vez, el sistema nervioso somático, con control voluntario sobre el músculo esquelético y el sistema nervioso autónomo, que controla de forma inconsciente al músculo liso, al cardíaco y a las glándulas. El sistema autónomo, a su vez, se subdivide en sistema simpático y sistema parasimpático, que permiten una adecuada adaptación al estrés o cualquier otra situación. Cada nervio periférico está constituido por fibras nerviosas amielínicas y mielínicas, que pueden ser aferentes o eferentes, y estas a su vez, pueden ser motoras somáticas o motoras vegetativas autónomas simpáticas. La proporción de cada una de las fibras depende del nervio en cuestión, pudiendo variar proporcionalmente dependiendo de la función que desempeñe la zona inervada.

## 1.2. HISTOLOGÍA DEL NERVIIO PERIFÉRICO.

Las células de sostén del sistema nervioso periférico son las células de Schwann que se asocian a todas las fibras nerviosas periféricas. Estas células conforman la vaina de Schwann o neurilemas por la forma en que rodean a sus correspondientes axones. Todo axón del sistema nervioso desde las raíces dorsales y ventrales hasta las ramificaciones más distales de las fibras sensoriales o motoras está rodeado en la mayor parte de su longitud por un conjunto de células de Schwann. Los nervios periféricos se recubren de varias capas, siendo la compuesta por las células de Schwann la que se halla en más íntimo contacto con los axones. (Weiss, 1982) (Figura 2)



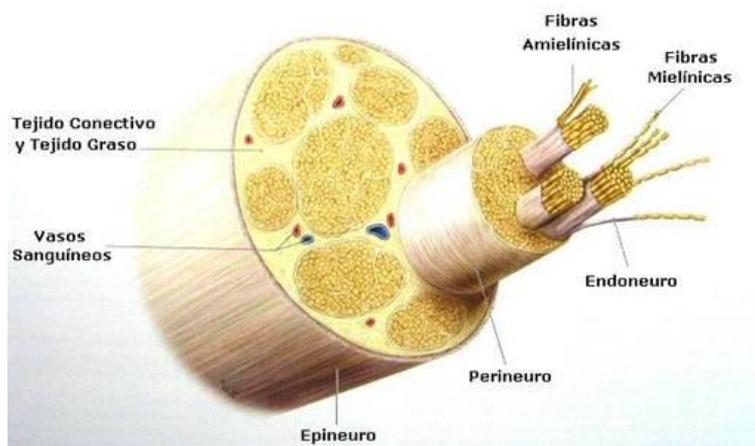
**Figura 2. Célula de Schwann rodeando a un axón. Su función principal es la de aportar nutrientes al axón y favorecer la conducción nerviosa mediante la producción de mielina. Interviene de forma directa en la regeneración nerviosa.**

La vaina de mielina de un nervio periférico está rodeada por el protoplasma de una célula de Schwann; a su membrana celular se añade una membrana basal, la cual envuelve el internodo, aislando así las fibras nerviosas unas de otras. La mielina de las fibras mielínicas no es continua; está interrumpida de manera periódica por estrechamientos llamados Nódulos de Ranvier. En estos nódulos no hay mielina y la vaina de Schwann se invagina y, no la cubre por completo en estos sitios, como ha demostrado Robertson con estudios de microscopía electrónica. (Robertson, 1962) (Figura 3)



**Figura 3: Discontinuidad de la vaina de mielina: Nódulo de Ranvier.**

Los nervios periféricos contienen cantidades importantes de tejido conectivo que protege y sostiene las delgadas y frágiles fibras nerviosas. Por su parte externa, el nervio está rodeado por una gruesa capa de tejido conectivo denso irregular, el **epineuro**. Dentro del nervio, las fibras nerviosas suelen estar agrupadas en fascículos definidos, separados por prolongaciones del epineuro. Los fascículos están rodeados por una capa de tejido conectivo circular, el **perineuro**, menos rico en fibras que el epineuro. Éste perineuro forma varias capas de laminillas concéntricas que, en conjunto, representan una barrera de difusión denominada **“vaina perineural”**, la cual se piensa, es la que permite obtener unas condiciones óptimas para que en el axón haya una adecuada capacidad conductora. Dentro del perineuro, los espacios entre las fibras nerviosas están ocupados por tejido conectivo laxo, llamado **endoneuro**. (Geneser, 2003) (Figura 4 y 5)



**Figura 4. Estructura histológica del nervio periférico.**



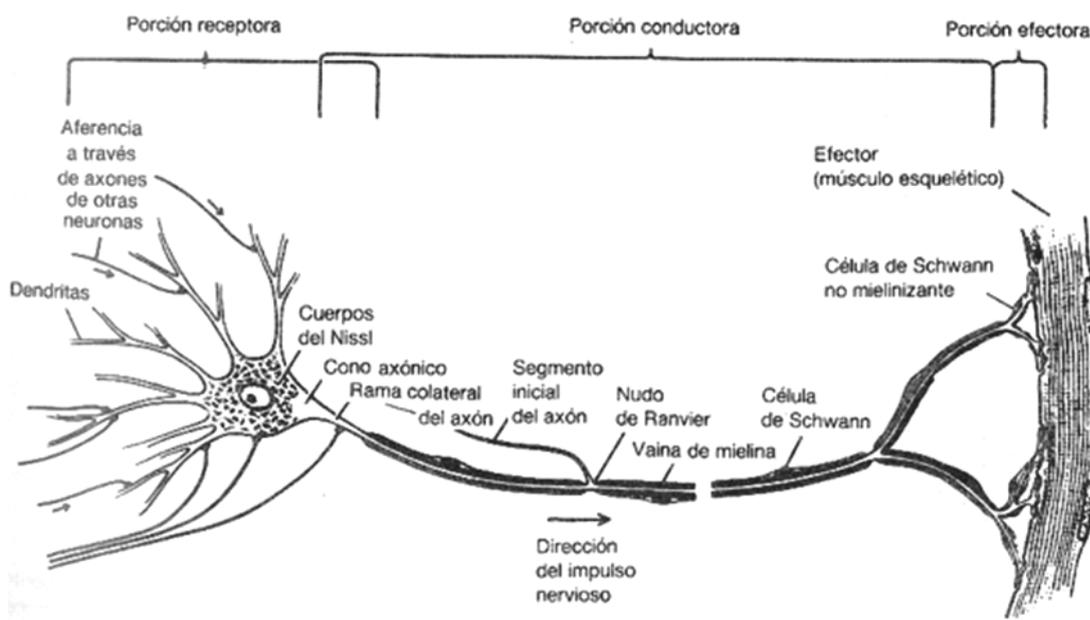
**Figura 5. Sección transversal Nervio Sural. Se pueden observar cada una de las estructuras descritas previamente. (Dra. González Alemán y Dr. Andrade, 2000).**

El aporte vascular del nervio procede de un sistema intrínseco y extrínseco que se origina en las arterias locales y regionales y que penetran en las vainas

epineurales y perineurales conectándose entre sí formando un plexo capilar indefinido dentro del endoneuro. El sistema de vascularización más importante del nervio es el intrínseco. Una tensión excesiva a lo largo del nervio puede comprometer significativamente el aporte vascular intrínseco del nervio. (Bora, 1980) (Figura 4 y 5).

La **Neurona** es el cuerpo de la célula nerviosa con todas sus prolongaciones. Todas las neuronas poseen un cuerpo celular o soma compuesto por el núcleo rodeado de cantidades variables de citoplasma. El citoplasma que rodea el núcleo se denomina Pericarión. A menudo existen numerosas prolongaciones cortas ramificadas, las dendritas y una prolongación larga, el axón o neuroeje, que en algunos casos alcanza más de un metro de longitud, es la estructura donde vamos a centrar la mayor parte del estudio. (Figura 6)

Si observamos con microscopía electrónica las neurofibrillas (estructura de microscopía óptica) de las neuronas, aparecen haces de filamentos de unas 10 nm de diámetro que se agrupan entre los corpúsculos de Nissl y en los axones y dendritas. Los filamentos se denominan Neurofilamentos, y forman parte del citoesqueleto y confieren sostén mecánico, sobre todo al axón, donde se encuentran en gran cantidad y dispuestos en paralelo.



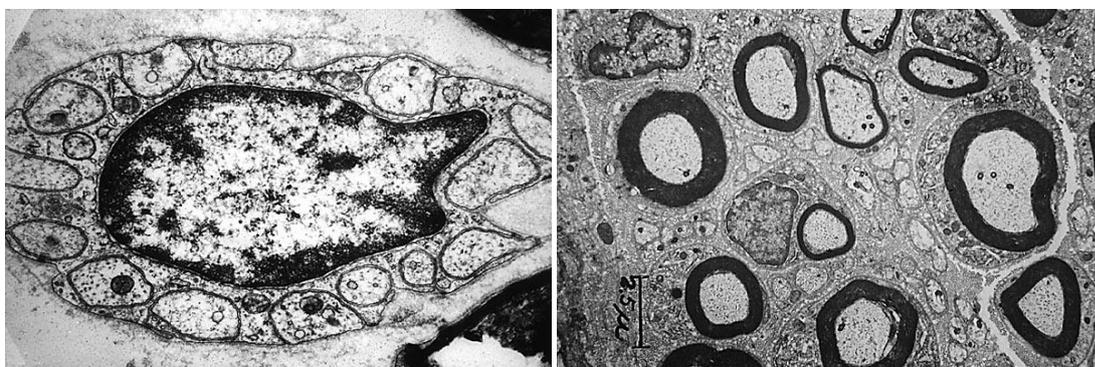
**Figura 6. Esquema de estructura microscópica de una neurona.**

Además de los neurofilamentos, a menudo se encuentran grandes cantidades de microtúbulos o neurotúbulos. Al igual que los neurofilamentos, los microtúbulos se suelen disponer en haces paralelos que circundan los corpúsculos de Nissl. Los microtúbulos no difieren en estructura de los que se encuentran en otros tipos celulares. A menudo se entremezclan con los neurofilamentos y, al igual que éstos, contribuyen a estructurar el citoesqueleto, a conferir rigidez y brindar estabilidad a la morfología de la célula. Ésto es especialmente importante en el axón donde haces paralelos de microtúbulos contribuyen a mantener la forma extendida, y además representan la base del transporte axónico. (Geneser, 2003).

Nunca sale más de un axón por cada neurona, y por lo general éste es mucho más largo y más delgado que las dendritas de la misma neurona, con un diámetro casi uniforme. El citoplasma del axón o axoplasma es continuación del citoplasma del pericarión y contiene mitocondrias, túbulos alargados de retículo endoplasmico liso, microtúbulos y gran cantidad de neurofilamentos, carece de corpúsculos de Nissl. Muchos axones están rodeados de una vaina de mielina rica en lípidos, ésta no forma parte de la neurona, sino que el axolema y la vaina de mielina están separadas por una hendidura de unos 20 nm de ancho. (Geneser, 2003).

### 1.3. FISIOLÓGÍA DEL NERVIO PERIFÉRICO.

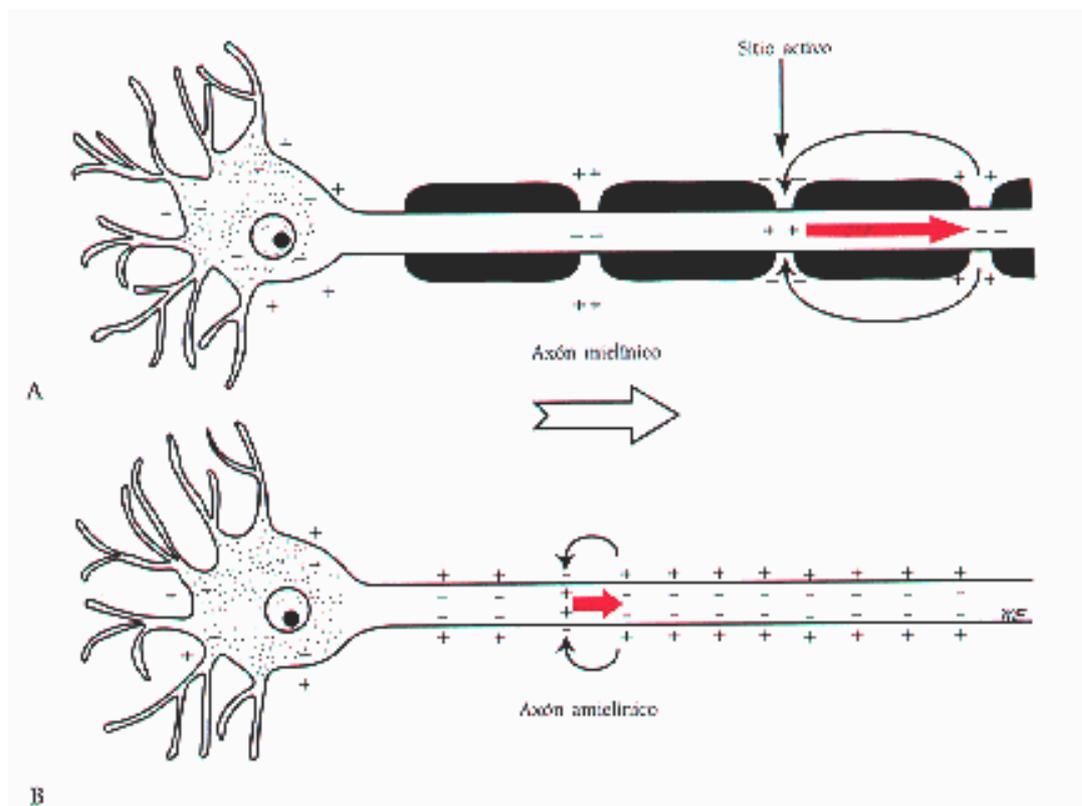
Las **fibras nerviosas amielínicas** sólo poseen una vaina de Schwann rodeando los axones sin presencia de mielina, ésto repercute directamente en la capacidad de conducción de impulsos nerviosos, que se produce con una velocidad inferior a 1 m/s. (Figura 7)



**Figura 7. Izquierda: imagen fibra nerviosa a mielínica. Derecha: fibras nerviosas mielínicas rodeadas de una capa de mielina oscura alrededor. (Álvarez Marín, 1995)**

Por otro lado, las **fibras nerviosas mielínicas**, se denominan así porque cada célula de Schwann forma un segmento de mielina a lo largo del axón, de forma que el segmento es discontinuo, por lo que existe una zona del axón de unos pocos

micrómetros libre de mielina, llamada Espacio de Ranvier. La mielinización permite una transmisión nerviosa más rápida, dado que la mielina aísla al axón entre los espacios de Ranvier, donde se encuentran canales iónicos de sodio. La apertura de canales iónicos dirigida por potencial tiene lugar a saltos entre un espacio de Ranvier y el siguiente, a ésta transmisión más rápida y a saltos se denomina **Transmisión Nerviosa Saltatoria**, que imprime un velocidad mayor a la transmisión de impulsos, llegando incluso a 120 m/s en las fibras más gruesas. (Figura 8)



**Figura 8. Esquema de conducción saltatoria en fibra nerviosa mielínica (A) y conducción no saltatoria o continua en una fibra amielínica (B).**

Existe una relación directa entre el calibre del axón o cilindroeje, el espesor de la vaina de mielina, la distancia entre los nodos de Ranvier y la velocidad de conducción del impulso nervioso. A mayor calibre del axón, mayor espesor de la vaina y mayor la distancia internodal, mayor será la velocidad de propagación del impulso. Las fibras nerviosas se clasifican en A, B y C dependiendo de su contenido en mielina y la velocidad de conducción. (Tabla 1)

	Mielina	Diámetro del axón	Velocidad de conducción
Fibras tipo A	+++/>++	3-20 $\mu\text{m}$	Hasta 20 m/s
Fibras tipo B	+	1-3 $\mu\text{m}$	Hasta 15 m/s
Fibras tipo C	- (amielínicas)	< 1 $\mu\text{m}$	Hasta 2 m/s

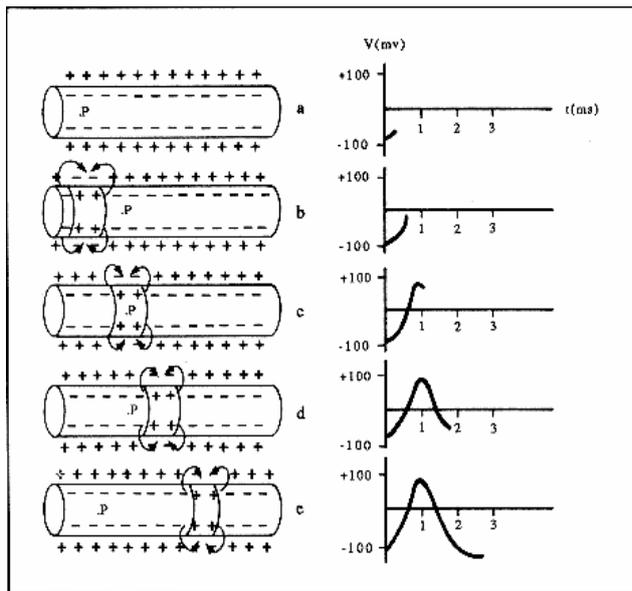
**Tabla 1. Clasificación de las fibras nerviosas.**

La transmisión del potencial de acción es debido al movimiento de cargas entre el interior y exterior del axón a través de las membranas que lo forman. El axón está constituido por una bicapa lipídica que separa el interior del exterior y solamente es posible la circulación de cargas a través de los canales que encuentran intercalados. Estas proteínas se controlan por ligandos o por voltaje.

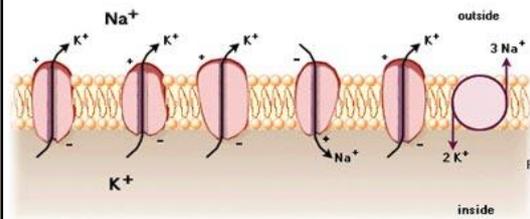
En el caso de que el control sea por ligando, el mecanismo de apertura para dejar pasar las cargas es debido a una sustancia (ligando); un ejemplo es el debido a la acetilcolina sobre el canal de acetilcolina que abre una puerta de un tamaño de 0.65nm que deja pasar todos los iones y moléculas de tamaño inferior. Esta puerta es de suma importancia en la transmisión de las señales de una célula a otra y de las células nerviosas a las musculares.

En el caso de las puertas que se mueven por voltaje, éstas se controlan por la diferencia de potencial eléctrico de la membrana celular. Si hay una fuerte carga negativa en el interior las puertas de sodio están cerradas, pero si pierde parte de la carga negativa se abren de forma brusca dejando pasar el sodio.

El potencial de acción se genera cuando el potencial de membrana de una célula se despolariza por encima de un determinado umbral, efecto que suele durar unos milisegundos. En este tiempo se produce un cambio muy rápido de la polaridad de la membrana de negativo a positivo (Despolarización) y vuelta a negativo (Repolarización), terminando con una fase de hiperpolarización antes de volver al nivel de reposo. La propagación del potencial de acción se produce cuando una parte de la membrana se despolariza y se abren los canales de sodio, momento en el que entran los iones de sodio. En este momento en la membrana adyacente se produce un efecto de despolarización y el proceso se repite provocando un desplazamiento del potencial de acción a través del axón.



**Figura 9. Izquierda: esquema representativo del flujo iónico a través de la membrana celular del axón durante las distintas fases del potencial de acción. Abajo: Permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$  durante el periodo de despolarización**



Además de la difusión de los potenciales de acción, a lo largo de la membrana axónica, tiene lugar un transporte axónico, es decir, el desplazamiento de sustancias dentro del axón. Solo el cuerpo celular puede sintetizar proteínas, como por ejemplo enzimas o receptores de axolema, por lo que es necesario un transporte a través de vesículas en el interior del axón, concretamente es en el pericarión donde se producen esas proteínas que luego son transportadas hasta las terminales axónicas. Existen dos tipos de transporte axónico, rápido y lento, ambos anterógrados (centrífugos), uno de unos 3mm/día y otro de unos 100-400 mm/día. Además el transporte rápido también es retrógrado (centrípeto), con el objeto de devolver componentes celulares desgastados al cuerpo para ser reutilizados. (Geneser, 2003).

## 1.4. LESIONES NERVIOSAS:

- Clasificación
- Principios de la regeneración nerviosa

### **Clasificación de las lesiones nerviosas.**

Existen diversas etiologías de las lesiones del nervio periférico, las más frecuentes son las heridas penetrantes, aplastamientos, tracción, isquemia y mecanismos menos comunes como las lesiones térmicas, eléctricas, por radiación, percusión y vibración. (Robinson; 2000, 2004).

En general, las lesiones por estiramiento o tracción son las más frecuentes en los traumatismos nerviosos, sobre todo en los accidentes de tráfico. Las laceraciones, por cristales, cuchillos, ventiladores, hojas de sierra, metales o por fracturas de huesos largos constituyen aproximadamente el 30 % de las lesiones nerviosas graves. Otro mecanismo de lesión nerviosa frecuente es la compresión, la cual ocasiona una deformación mecánica al nervio así como un proceso isquémico, ambos pueden producir lesiones histológicas y funcionales severas a un nervio aún cuando el factor causal se aplique de forma subaguda o crónica. (Stanec *et al*; 1997)

Las lesiones nerviosas fueron estudiadas por primera vez de forma sistemática durante la Guerra Civil Americana por el neurólogo S. Weir Mitchell. Muchos de los avances en el conocimiento sobre las lesiones nerviosas periféricas se han producido durante periodos de guerra. En un ambiente militar, la mayoría de lesiones nerviosas se deben a la metralla. (Maricevic y Erceg; 1997).

Hoy día en la práctica clínica las clasificaciones más comúnmente usadas son: la de Seddon y la de Sunderland. La clasificación de Sunderland es más compleja, pero es más útil. Seddon dividió las lesiones nerviosas en:

**Neuroapraxia**: la estructura nerviosa está intacta pero no puede transmitir impulsos. (praxis = hacer, ejecutar). Existe una disfunción fisiológica que provoca un bloqueo de la conducción nerviosa. Los axones se encuentran íntegros y no existe ninguna degeneración distal al sitio de lesión. Generalmente existe un área limitada de mielina dañada que, generalmente, es reparada por las células de Schwann y la función del nervio se restaura sin secuelas. (Seddon; 1943. Devries GH; 1993)

**Axonotmesis:** el axón se encuentra dañado o destruido, pero el tejido conectivo de sostén de los axones, el Perineuro, se encuentra íntegro. (tmesis= cortar).

**Neurotmesis:** el tronco nervioso está totalmente seccionado y no hay continuidad anatómica. La mayoría del tejido conectivo de sostén se encuentra dañado o interrumpido. (Seddon; 1943)

La axonotmesis incluye a su vez una amplia variedad de lesiones nerviosas que tienen diferentes pronósticos. La clasificación de Seddon fue modificada por Sunderland y está distribuida en cinco grupos. La gran ventaja de la clasificación de Sunderland es que subdivide la axonotmesis en tres subgrupos con diferente pronóstico y tratamiento cada una de ellas. Se trata de una clasificación por grados de lesión que se asocian a peor pronóstico de forma progresiva. (Figura 10)

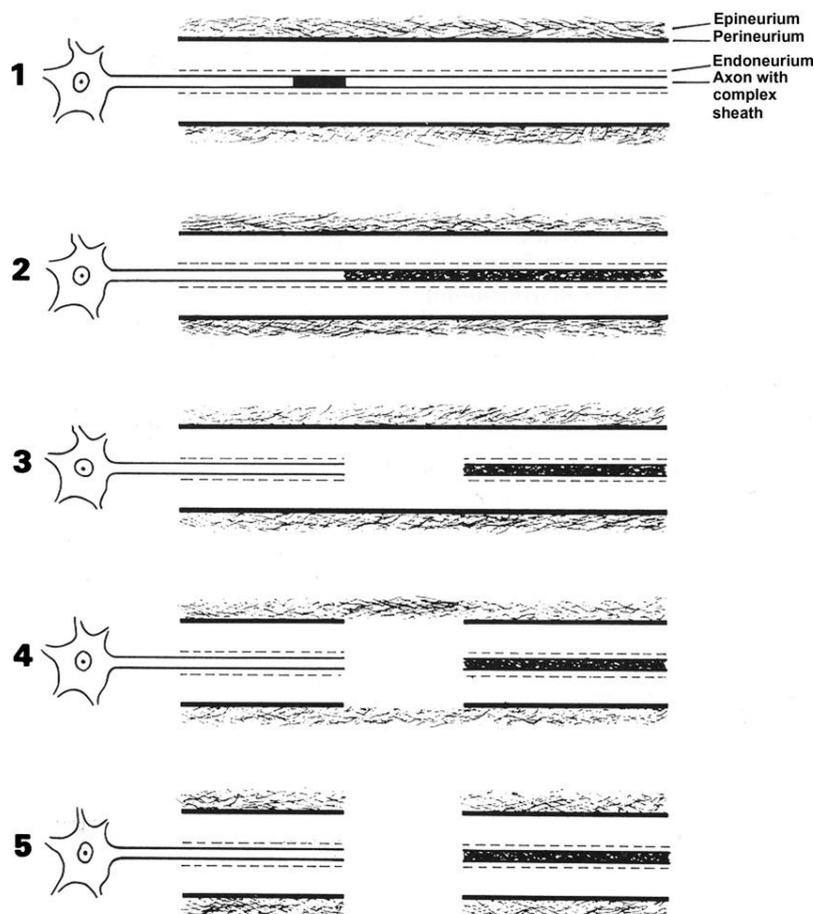
**Grado I de Sunderland:** es equivalente a la neuroapraxia de Seddon. Es la lesión más leve. Los axones están intactos pero no son funcionales. Hay déficit motor y sensitivo en la zona dependiente del nervio lesionado debido a la desmielinización. Generalmente la afectación motora es superior a la sensitiva. Clínicamente no se produce atrofia muscular, en contadas ocasiones es leve por el desuso. La parálisis motora puede prolongarse hasta 6 meses, pero la mayoría de lesiones se resuelven a los 3 meses (Dumitru *et al*; 2001). EMG con persistencia de conducción distal y sin actividad voluntaria. El periodo de recuperación espontánea oscila entre unas horas y unos meses, generalmente depende del tronco nervioso afecto, pero la recuperación de la función se produce alrededor de las 12 semanas. No precisa manipulación quirúrgica en ningún caso.

**Grado II de Sunderland:** existe una interrupción de los axones del nervio. En este caso el endoneuro y el perineuro están intactos. Existe una degeneración walleriana del axón afecto. Existe una atrofia muscular progresiva y reversible. EMG: Interrupción de conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria. Generalmente no precisa de manipulación quirúrgica para obtener una recuperación completa

**Grado III de Sunderland:** existe una axonotmesis, como en el grado II, pero el endoneuro se encuentra interrumpido y el perineuro intacto. Existe desmielinización, interrupción del axón y degeneración walleriana. Se produce una proliferación del tejido conectivo de sostén que resulta en una fibrosis intrafascicular. EMG: Interrupción de conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria. Se recomienda actitud expectante hasta alcanzar una recuperación espontánea, en algunos casos se precisa de manipulación quirúrgica para favorecer recuperación funcional.

**Grado IV de Sunderland:** existe una axonotmesis con lesión asociada de endoneuro y perineuro y sólo en epineuro está intacto. Existe desmielinización. Interrupción del axón y degeneración walleriana. Fibrosis intra y perineural. EMG: Interrupción de conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria. Si no se realiza ninguna intervención se produce un neuroma intraneural que se asocia a déficit motor y sensitivo. En casi todos los casos se recomienda reparación quirúrgica de la lesión.

**Grado V de Sunderland:** equivale a la neurotmesis de Seddon y existe una disrupción completa de todas las capas del nervio. Se produce desmielinización del segmento nervioso afecto. Se genera atrofia muscular progresiva. EMG: Interrupción de conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria. Siempre precisa de manipulación microquirúrgica para conseguir recuperación funcional. Son las lesiones de peor pronóstico (Sunderland, 1978).



**Figura 10. Clasificación de Sunderland de las lesiones de los nervios periféricos. 1978. Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore. Williams and Wilkins; 1978.**

## **Principios de regeneración nerviosa.**

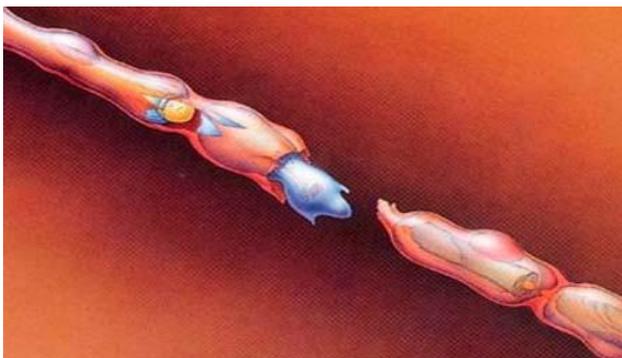
En muchas de las lesiones nerviosas, como las laceraciones, contusiones, y lesiones por elongación y compresiones severas, existe una interrupción anatómica de los fascículos axonales o del tronco nervioso completo. Cuando existe una solución de continuidad del axón se produce un proceso de degeneración axonal llamada Degeneración Walleriana o Secundaria. Se debe a la interrupción del flujo axoplásmico desde el núcleo o soma al axón (Koeppen, 2004; Stoll and Muller, 1999) (Figura 11).

La porción distal del axón degenera y se fragmenta. La mielina se transforma en grasa y es fagocitada por los macrófagos. Los restos del axón y la vaina de mielina forman ovoides que son gradualmente digeridos y desaparecen. Es lo que se conoce como cámaras de degradación (Chaudhry *et al*, 1992).

En la porción proximal a la lesión el proceso de degeneración se detiene en el primer internodo en caso de lesiones leves, pero se puede extender proximalmente en mayor grado dependiendo de la severidad de la lesión. En cuestión de horas después de la lesión los extremos de los axones lesionados se sellan y se hinchan con organelas celulares debido a que el transporte axonal anterógrado en el extremo proximal y el transporte axonal retrógrado en el extremo distal persiste durante varios días (Lunn *et al*, 1990) (Figura 12).



**Figura 11. Sección longitudinal de fibra nerviosa mielínica con visualización esquemática de nódulo de Ranvier.**

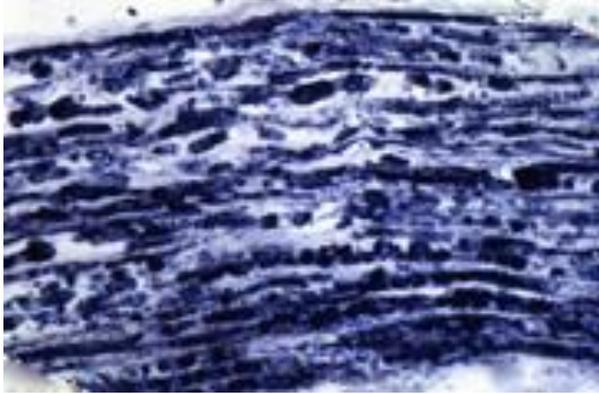


**Figura 12. Esquema de Degeneración Walleriana en el muñón proximal del nervio. Apreciar el “resealing” y el “swelling”. Degeneración escasa en cabo proximal que no se extiende más de un espacio intermodal.**

El resellado (resealing) es un prelude necesario para la regeneración axonal en el muñón proximal. Este proceso es calcio dependiente, ya que se requiere la entrada de calcio en el axoplasma (Yawo and Kuno, 1985). Potentes péptidos vasoactivos se acumulan en el extremo del axón lesionado, que junto con la degranulación local en el tejido circundante de los mastocitos y la angiogénesis generan una hiperemia que se mantiene durante muchas semanas después de la lesión (Hall, 2005).

Evidencias actuales indican que la degeneración axonal no es proceso pasivo sino un proceso activo programado. La pérdida de citoesqueleto comienza alrededor de los 7 días y se acompaña por un programa caspasa independiente de autodestrucción (Raff *et al*, 2002). La degeneración axonal es dependiente de un incremento local de las concentraciones de calcio que activan a enzimas proteolíticas calcio dependientes tales como fosfolipasas o calpainas. Son estos elementos los responsables de la disolución del citoesqueleto del axón (Hall, 2005).

En el extremo distal del axón, aunque el axón degenera y desaparece, la membrana basal se mantiene generando **tubos endoneurales**. Las células de Schwann proliferan y forran los tubos endoneurales (Schwann cell tubes o Bandas/Cordones de Büngner). Su objetivo es formar una matriz que favorezca el trasiego y el desarrollo los brotes axónicos durante el proceso de regeneración axonal (Figura 13).



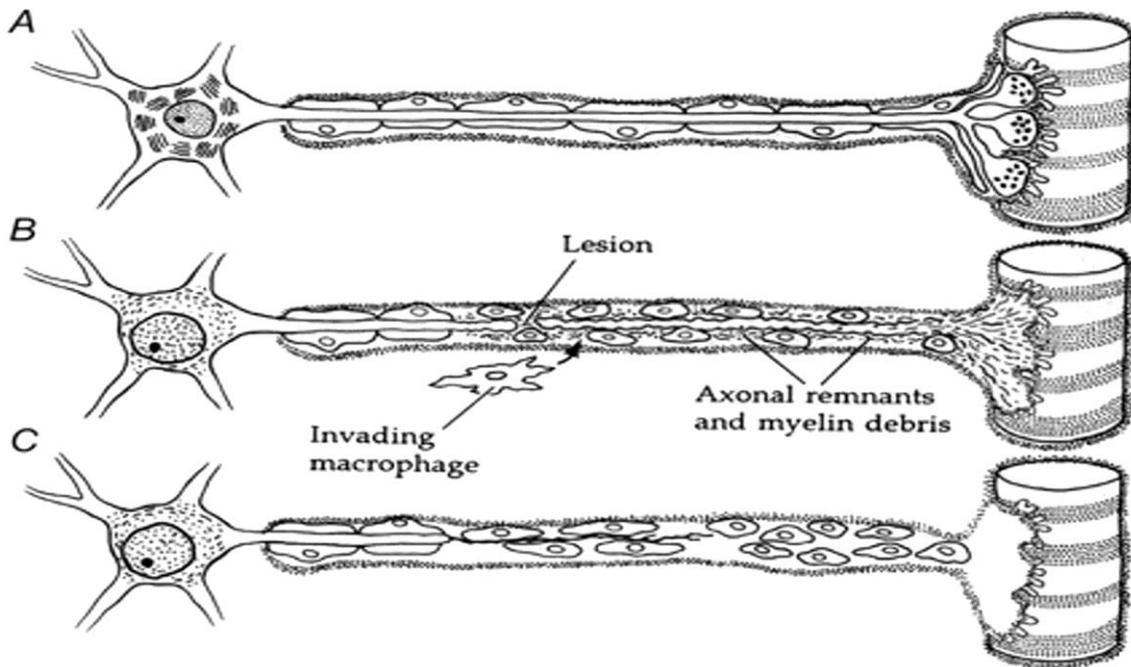
**Figura 13. Imagen histológica de sección longitudinal de nervio periférico. Degeneración Walleriana y Cordones de Bungner.**

La degeneración walleriana comienza horas después de la lesión nerviosa y es completada a las 6-8 semanas, dejando un muñon distal que comprende sólo los tubos endoneurales forrados por células de Schwann (Hall, 1989; Kang *et al*, 2003) (Figura 14).

Las células de Schwann no son permanentes, sino que involucionan y desaparecen si la regeneración axonal no se produce (Hall, 1999). Si existe interacción axonal hay una transformación activa de las células de Schwann atróficas en células mielinizantes activas (Sulaiman y Gordon, 2000). Los tubos endoneurales que no reciben los brotes de regeneración axonal se encogen y se obliteran por tejido conectivo de cicatrización.

En el caso de una interrupción completa del axón pero un tejido conectivo circundante intacto al menos parcialmente, axonotmesis, también existe degeneración walleriana. La reinervación depende del grado de desorganización interna del nervio lesionado y de la distancia hasta el músculo desde la zona de lesión.

En la neurotmesis, la lesión es completa de todas las capas que constituyen el nervio y el grado de desorganización interna es el máximo posible, lo que hace que sea imposible que se produzca una regeneración espontanea adecuada que permita la recuperación completa. Sin cirugía el pronóstico es pésimo.



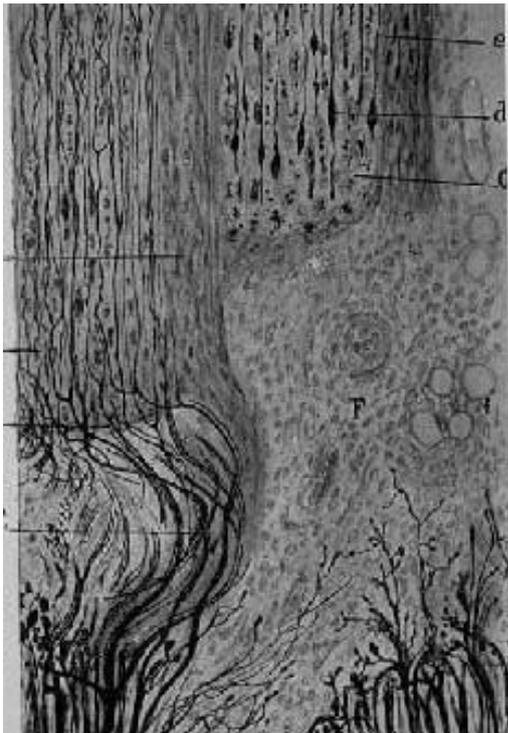
**Figura 14. Representación esquemática de Degeneración Walleriana. A. Motoneurona. B. Degeneración axonal proximal y distal a la zona de la lesión. Existe una proliferación y diferenciación de células de Schwann que fagocitan los restos axonales. El núcleo de la neurona se transloca y sufre una cromatolisis. C. Después de la eliminación de los restos degradados se forman las bandas de Bungner por las células de Schwann y se produce la regeneración nerviosa desde el muñón proximal hacia la fibra nerviosa.**

segmento entre la neurona y el lugar de la lesión (muñón o cabo proximal), la zona de la lesión propiamente dicha, el segmento entre la zona de la lesión y el órgano diana (muñón o cabo distal) y, por último, el órgano diana. El proceso de reparación se puede ver interrumpido en uno o varios de los niveles (Burnett y Zager, 2004; Seckel, 1990).

En el SNC, la recuperación funcional se acompaña por el proceso de plasticidad, que consiste en el uso de áreas intactas del cerebro para compensar la función de las áreas lesionadas; el SNC no lleva a cabo un proceso de reparación por sí mismo. La respuesta del SNP ante una lesión consiste en la reparación por sí mismo con el objetivo de conseguir una recuperación histológica completa que se asocie a una recuperación funcional. Por tanto, existe una diferencia esencial ante una lesión entre el SNC y el SNP (Burnett y Zager, 2004; Fenrich y Gordon, 2004).

Cuando existe una lesión nerviosa el proceso de reparación puede ocurrir a través de 3 mecanismos: remielinización, crecimiento de brotes colaterales que surgen desde axones indemnes y regeneración desde el lugar de lesión. (Zochodne y Levy, 2005)

El crecimiento de **brotes colaterales** puede favorecer la reinervación en lesiones nerviosas parciales y cuando hay muchos axones intactos. Este proceso suele ser muy efectivo. Cuando en la lesión nerviosa existe como máximo entre un 20 y 30% de axones afectados la recuperación se produce fundamentalmente por brotes procedentes de los axones intactos y ocurre entre los 2-6 meses (Figura 15).



**Figura 15. Collateral Sprouting.**  
**Reparación nerviosa mediante brotes axonales procedentes de axones intactos que no se han lesionado. Se aprecia continuidad axonal en la región periférica del fascículo.**

**Remielinización.** Ocurre en lesiones leves en las que no suele existir solución de continuidad, generalmente axonotmesis. Suele deberse a alteraciones bioquímicas en la mielina que conlleva alteraciones en la conducción eléctrica del nervio.

**Regeneración.** Ocurre cuando más del 90% de los axones se encuentran lesionados. El éxito de la regeneración desde el muñón proximal del nervio depende en un alto grado de la distancia entre la lesión y el órgano diana.

La regeneración axonal es un tedioso y delicado proceso con intrincadas maniobras de avance del brote axonal orquestadas por señales de transducción (Gallo et Letourneau, 2002). Los conos de crecimiento formados en el muñón

proximal emiten unas extensiones de morfología similar a un dedo llamadas Filopodia, que exploran y toman muestras del medio que los rodea, actuando así como sensores de larga distancia (Dahlin, 2006; Kater and Rehder, 1995). La movilidad de los conos de crecimiento al final de los brotes axónicos depende de los receptores en esos conos de crecimiento que reciben señales de orientación del microambiente en el que se encuentran.

Diversos autores han estudiado el beneficio sobre la regeneración nerviosa que podrían asociar fármacos (como el FK 506), oxígeno hiperbárico, hormonas, el ejercicio físico precoz, ultrasonidos, y terapia con laser con el objetivo de influir sobre estos factores neurotróficos y neurotrópicos con resultados poco concluyentes y muy diversos. (Anders *et al*, 2004; Gigo-Benato *et al*, 2005; Gordon *et al*, 2003; Gudemez *et al*, 2002; Mourad *et al*, 2001; Sarikcioglu and Oguz, 2001; Udina *et al*, 2002; Weber and Mackinnon, 2005)

Los axones que exitosamente entran en el tubo endoneural ubicado en el muñón distal tienen una buena oportunidad de alcanzar el tejido “diana”. El cono de crecimiento contiene múltiples filopodias que se adhieren a la lámina basal de la célula de Schwann y usan esta como guía. Las tasas comunicadas de regeneración axonal se encuentran en un rango comprendido entre 0,5 a 9 mm/día en las diferentes especies animales y utilizando diferentes técnicas para realizar la estimación. En la práctica clínica se suele utilizar la regla de 1mm/día o 1 pulgada/mes.

### **Papel de la célula de Schwann en el proceso de regeneración nerviosa.**

La célula de Schwann juega un papel indispensable en la regeneración nerviosa mediante el incremento en la síntesis de moléculas de adhesión celular y la elaboración de membrana basal que contiene proteínas de la matriz extracelular como Laminina y Fibronectina (Fu y Gordon, 1997).

Al mismo tiempo, la célula de Schwann se encarga de liberar factores neurotróficos para los receptores tirosin-Kinasa y son los responsables de la señal de activación genética (Funakoshi *et al*, 1993). Aproximadamente 30 minutos después de la lesión nerviosa el proceso intracelular de regeneración nerviosa se encuentra activado. Unos días después las células de Schwann comienzan a dividirse y a crear un pool de células hijas desdiferenciadas (Dahlin, 2006). Esas células hijas desdiferenciadas regulan al alza la expresión de *nerve growth factor* (NGF), otros factores neurotróficos, citocinas y otros elementos que permiten a la

células de Schwann la diferenciación y la proliferación previa a la llegada de los brotes de regeneración. Los receptores para NGF sobre las células de Schwann que revisten los tubos endoneurales en el muñón distal se incrementan. Estudios experimentales en nervio ciático demuestra que a los 7 días la lesión nerviosa provoca una expresión de receptores NGF, se estima que la densidad basal del receptor se incrementa 50 veces. La acción de NGF sobre esos receptores de las células de Schwann estimulan la regeneración axonal (Taniuchi *et al*, 1986).

Un segmento de nervio periférico que se congela y se descongela, de manera que, las células de Schwann se mueren, pero la lámina basal que las rodea permanece intacta. Cuando el nervio tratado de ésta forma, se transplanta al muñón proximal de un nervio axotomizado de otro animal, los axones se regeneran a través del nervio transplantado, pero sólo por una corta distancia. Estos axones migran acompañados de las células de Schwann presentes en el muñón proximal del nervio lesionado. Por otro lado, si las células de Schwann presentes en el nervio proximal se inactivan por agentes citotóxicos, se observa en los axones muy poca o ninguna regeneración. De la misma manera, si la lámina basal se desnaturaliza por calor, además de congelarla y descongelarla, los axones no penetran en el transplante hasta que las células de Schwann migran primero del muñón proximal a los remanentes extracelulares del transplante (Sketelj *et al.*, 1989).

Experimentos in vitro también resultan muy ilustrativos; cuando las células de Schwann crecen en condiciones que no forman la lamina basal, son capaces de promover el crecimiento axonal de las neuronas periféricas. De la misma forma, cuando las células de Schwann crecen en condiciones que depositan la lámina basal al medio y después se retira, la matriz extracelular que las células generaron sobre las placas de cultivo es también eficaz en promover el crecimiento axonal de las neuronas del SNP. En conclusión, éstos experimentos demuestran que tanto las células de Schwann, como la lámina basal son importantes para promover una regeneración axonal exitosa en SNP (Dent, 2003).

Cuando la proliferación celular y su diferenciación han sido llevados a cabo, las células secretan factores tróficos incluyendo factor de crecimiento nervioso, factores neurotróficos derivados del encéfalo, y factores ciliares neurotróficos, y ellos constituyen la señal que permiten sintetizar y secretar moléculas de la matriz extracelular como Colágeno tipo IV y Laminina, las cuales se sabe que modulan el crecimiento de las neuritas y también la producción de mielina, que es vital para la rápida conducción de los impulsos, y la expresión de moléculas de adhesión celular (Shen *et al*, 2001; Shamash *et al*, 2002).

El comportamiento de las células de Schwann en la regeneración nerviosa es influenciado por dos factores fundamentales, el primero, el programa genético intrínseco y, por otro lado, su ambiente extracelular (Shen *et al*, 2001).

## 1.5 TRATAMIENTO ACTUAL DE LAS LESIONES NERVIOSAS.

### TRATAMIENTO INICIAL O EN FASE AGUDA.

El diagnóstico de una lesión nerviosa periférica no siempre es fácil inmediatamente después de una lesión grave de un miembro. En la mayoría de casos el dolor nos dificulta el diagnóstico y la colaboración del paciente para la exploración, que suele ser escasa y limitada.

Es fundamental el conocimiento anatómico del recorrido del nervio, el origen de sus ramas motoras y sensitivas y de los músculos que inervan.

Como en cualquier otra lesión, el tratamiento del paciente con una potencial lesión nerviosa deberá comenzar por la valoración de sus funciones vitales. Deberán tomarse las medidas adecuadas de soporte cardiopulmonar, profilaxis antibiótica y profilaxis antitetánica.

Es muy importante el manejo del dolor en estos pacientes. Suele ser de origen neuropático. Generalmente requerirá analgésicos potentes para su manejo, fundamentalmente derivados opioides que se deberán asociar a antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la recaptación de Serotonina y anticonvulsivantes, fundamentalmente Gabapentina y Pregabalina (Dworkin *et al*, 2003).

Una herida abierta en la que se ha lesionado un nervio periférico debe lavarse y desbridarse cuidadosamente eliminando cualquier material extraño y tejido necrótico, bajo anestesia local, regional o general. Se deben tratar las lesiones vasculares, óseas y musculotendinosas en caso de que existan asociadas a la lesión nerviosa en el orden de prioridad especificado (Siemionow and Sari, 2004) (Figura 16).



**Figura 16: Herida incisocontusa en paciente de raza negra localizada en porción distal de pantorrilla izquierda producida con un hacha. Fractura abierta tipo IIIC de Gustillo de Tibia. Se realiza sutura vascular terminoterminal de arteria Tibial Posterior, referenciado de extremos del Nervio Tibial Posterior y colocación de fijador externo para tratar la lesión ósea. Reparación primaria de las lesiones musculotendinosas. (Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada)**

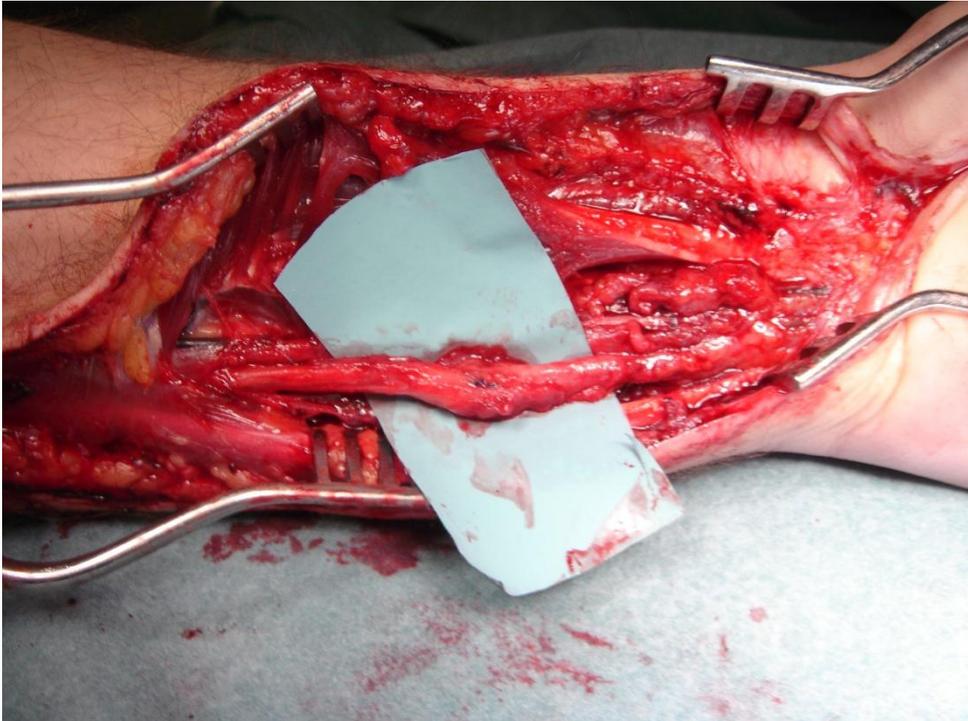
Si la herida es limpia y reciente, el estado del paciente es satisfactorio y se puede hacer una reparación en un ambiente tranquilo y sin prisas, con el personal y el equipo adecuados; se prefiere la reparación primaria inmediata del nervio. Por otra parte, si el estado general del enfermo no permite la reparación primaria, o si, las circunstancias provocan un retraso indebido, preferimos realizar la neurorrafia durante los primeros 3-7 días después de la lesión; en este caso, primero se cubre la herida con un apósito estéril y se observa la aparición de signos de infección (Siemionow and Sari, 2004).

Es importante que en el caso de que no exista separación importante de los cabos nerviosos se realiza una aposición termino-terminal sin tensión con el objeto de impedir la retracción de los cabos y hacer más fácil la reparación posterior. Si hay un defecto segmentario en el nervio se debe realizar sutura de los cabos del nervio lesionado a los tejidos blandos adyacentes para realizar una reparación posterior, procedimiento conocido como marcado del nervio. (Figura 17)

Una vez desaparecido el dolor inicial y cicatrizada la herida deberá empezarse la movilización activa de todas las articulaciones del miembro afectado. Todas las articulaciones deberán mantenerse flexibles evitando la retracción de tejidos blandos.

En una fractura cerrada que asocia disfunción del algún nervio periférico es razonable esperar la reinervación y se evitará la exploración quirúrgica inicialmente si esta va a ser tratada de forma incruenta. Se deben valorar periódicamente los

progresos funcionales del miembro lesionado mediante electromiogramas periódicos, velocidades de conducción nerviosa y valoración clínica. Si por el contrario, el déficit nervioso es consecuencia de la manipulación o inmovilización con escayola de una fractura cerrada en ausencia de déficit anterior, se recomienda la exploración inicial del nervio (Giddins *et al*, 1989).



**Figura 17: Exposición quirúrgica del Nervio Cubital a nivel del antebrazo distal. Neuroma en continuidad entre los extremos del nervio lesionado referenciado con sutura de monofilamento 3-0 en los extremos del nervio lesionado por una bala de 9 mm que se realizó en el acto quirúrgico inicial 3 meses antes. (Dr. Garrido Gómez / Dr. Lara García. Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora. Hospital Virgen de las Nieves. Granada)**

### **TRATAMIENTO REPARADOR DEFINITIVO DE LA LESIÓN NERVIOSA.**

El objetivo primario de la reparación de una lesión nerviosa es la correcta aproximación de los segmentos nerviosos con la esperanza de alcanzar una reinervación funcional completa de los tejidos (Rowshan *et al*, 2004).

Se han resaltado 4 principios técnicos para la adecuada coaptación de los extremos del nervio lesionado.

- Preparación de los muñones del nervio, se realizará con una hoja de bisturí del nº 11 o un bisturí de oftalmólogo. A continuación el cirujano deberá de identificar y separar los fascículos o grupos de fascículos. Recortar con ayuda de un neurótomo los extremos del nervio si están muy lesionados.
- Aproximación de los cabos calibrando el grado de tensión entre ambos extremos del nervio, lo cual dependerá del defecto que exista.
- Coaptación o neurorrafia de los extremos del nervio. Se debe de prestar especial importancia a la aposición de cada muñón con su extremo correspondiente, a cada fascículo o grupo fascicular con el opuesto para obtener los mejores resultados.
- Sutura de los extremos, con el objetivo de mantener la coaptación. Generalmente se realiza con suturas no reabsorbibles, pegamento o adhesivos de fibrina (Giddins *et al*, 1989).

La sutura de monofilamento de nylon de 9-0 es considerada la que mejor resiste las fuerzas de distracción. Sin embargo, la de 10-0 se rompe bajo tensión con facilidad y la de 8-0 tiene una tendencia a desgarrar los extremos del nervio reparado (Giddins *et al*, 1989).

Es preferible el uso de material irreabsorbible, ya que el material reabsorbible ha demostrado un incremento del edema perineural, lo que podría perjudicar el aporte sanguíneo a través de la vasa nervorum (Gorman and Dell, 1991).

- Los pegamentos de fibrina son una alternativa a la sutura microepineural. Esta alternativa a la sutura epineural fue descrita por el profesor Narakas en 1988, argumentó que era una técnica que acortaba en gran medida el tiempo de cirugía nerviosa, sin embargo, a su parecer, no era un gran avance porque no garantizaba la alineación satisfactoria de los fascículos (Narakas, 1988). Recientemente se ha demostrado que su uso puede esquivar la curva de aprendizaje que requiere un cirujano inexperto para la sutura nerviosa (Whitlock E, *et al*, 2010).

#### Material requerido para la sutura nerviosa: (Figura 18)

- Medios de aumento: microscopio quirúrgico o gafas lupa, siendo preferible el primero.
- Neurotomo, bisturí de pequeño calibre para seccionar el nervio.
- Instrumental microquirúrgico.
- Electrocauterizador bipolar.

- Sutura de nylon irreabsorbible.



**Figura 18: Material requerido para sutura nerviosa. Medio de aumento: microscopio quirúrgico. Neurotomo. Material microquirúrgico. Sutura de nylon. Departamento de Cirugía y sus especialidades. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.**

### **Técnicas quirúrgicas de reparación nerviosa:**

Las técnicas microquirúrgicas actualmente usadas para la reparación de lesiones nerviosas fueron descritas por primera vez por Millesi en los años 60 (Millesi, 1963). Después de 50 años las técnicas han cambiado, sin embargo los resultados clínicos de recuperación funcional tras una reparación nerviosa se han mantenido insatisfactorios. Han sido muchos los autores que han fracasado en su intento de conseguir una regeneración nerviosa satisfactoria a lo largo de la historia; en 1880, Gluck intentó unir ambos extremos del nervio lesionado ayudándose de matriz ósea desmineralizada. Más tarde, en 1890, Buenger, utilizó la arteria braquial de un cadáver humano para reparar la lesión de nervio ciático de un perro. Al principio del año 1900, Formatti y Nageotte usaron venas como injerto para reparar

la citada lesión nerviosa. En el 1920, Platt ejecutó un trabajo similar, pero en este caso el injerto venoso se asociaba a fascia muscular, que se dejaba en su interior. Durante la primera mitad del siglo XX, existen muchos documentos en los que se citan muy variopintas composiciones del conducto nervioso que se utiliza para resolver el defecto, así como gelatina, agar, hueso, metal, goma, aunque a ninguna de ellas se le reconoce un éxito clínico patente (Hudson and Evans, 2000).

Existen distintas posibilidades terapéuticas ante una lesión nerviosa. La utilización de cada una de ellas vendrá marcada fundamentalmente por la presencia o no de un defecto nervioso, el tiempo de evolución y si ha existido fracaso de una técnica de reparación nerviosa previamente.

## 1. NEUROLISIS EXTERNA:

Se trata de una técnica de descompresión del nervio.

La causa de compresión puede ser externa al nervio, en cuyo caso bastará la supresión del agente estenosante para que se recupere (Campbell, 2008).

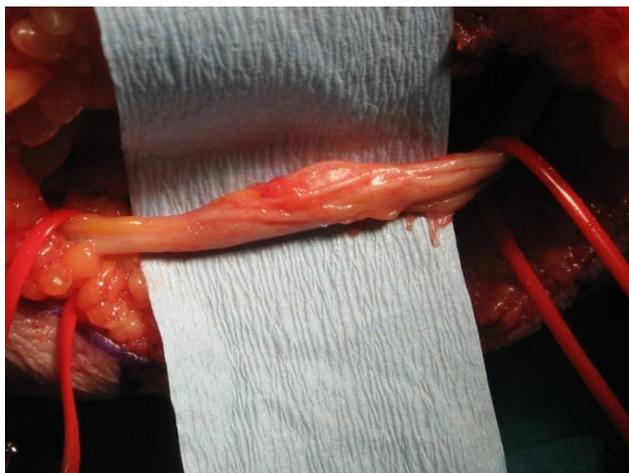
En la clínica diaria existen múltiples ejemplos, como la compresión del nervio Mediano por el Ligamento Anular del Carpo, o la compresión del nervio cubital en el codo por una artrosis de codo (Figura 19).

## 2. NEUROLISIS INTERNA:

A veces a la compresión externa se añade una reacción fibrosa epineural o interfascicular.

Consiste en la escisión del epineuro bajo microscopio y del tejido cicatricial que engloba todo el tejido cicatricial estenosante de los fascículos.

La indicación más frecuente son los neuromas que se hallan en las compresiones nerviosas y secciones parciales, las lesiones isquémicas segmentarias y las perineuritis por intervenciones previas sobre el nervio o englobamientos por fracturas.



**Figura 19: neuroma en continuidad en nervio cubital a nivel del codo por proceso compresivo en la Arcada de Osborne. Detalle de reacción fibrosa interfascicular. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada.**

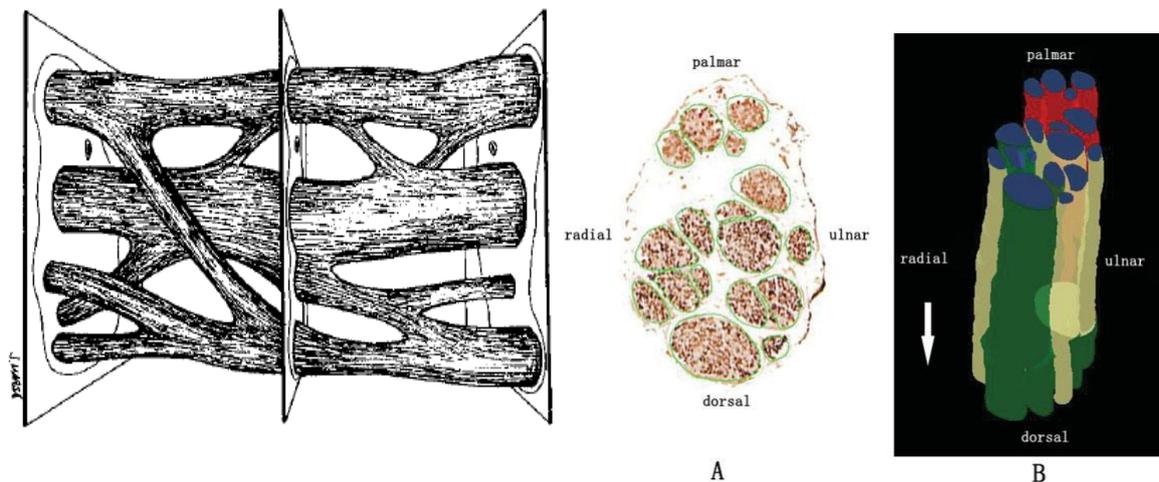
### 3. REPARACIÓN O NEURORRAFIA TERMINO-TERMINAL:

Para lesiones completas, los mejores resultados funcionales en la reparación nerviosa ocurren con la neurorrafia primaria termino-terminal, por lo que es la técnica de elección siempre que sea factible (Diao and Vannuyen, 2000; Campbell, 2008).

No se puede considerar sinónimo neurorrafia de anastomosis nerviosa, ya que este término se refiere a la unión de estructuras huecas.

Siempre es preferible la reparación primaria si se disponen de los medios adecuados, ya que su demora se asocia a retracción de ambos muñones y el consecuente incremento del gap o defecto entre ambos segmentos del nervio lesionado, aumentando de esa forma la probabilidad de necesitar otras técnicas de puenteo del defecto (Campbell, 2008),

El punto clave para la reparación nerviosa con éxito es establecer la continuidad con la alineación rotacional adecuada (Figura 20), es decir, de cada fascículo con el homónimo del otro extremo del nervio, y sin tensión (Campbell, 2008; Rowshan K, 2004).



**Figura 20:** ***Izquierda:** Esquema de distribución tridimensional de los fascículos en el interior de un nervio periférico. Representa la gran complejidad de la topografía interna que disminuye en las partes más distales del nervio. (Sunderland, 1945). **Derecha:** (A) Sección transversal de nervio Mediano a nivel del Pronador Redondo. Se aíslan cada uno de los 17 fascículos, de los cuales hay 6 motores, 6 sensitivos y 5 mixtos. (B) Imagen tridimensional un segmento de nervio Mediano a este nivel. En rojo los fascículos sensitivos, en amarillo los motores y en verde los mixtos. (Sun , 2009)*

Para la adecuada alineación rotacional de los segmentos nerviosos nos ayudaremos de los marcadores externos del nervio, como el trazo de la sección nerviosa, trayectos vasculares, comparación del calibre de los fascículos lesionados a la hora de enfrentarlos (Rowshan , 2004). Hoy día se están elaborando atlas de distribución tridimensional fascicular de los nervios que se lesionan con más frecuencia para facilitar afrontamiento de los fascículos lesionados durante la cirugía (Sun, 2009) (Figura 20).

Existen tres opciones técnicas de neurografía termino-terminal:

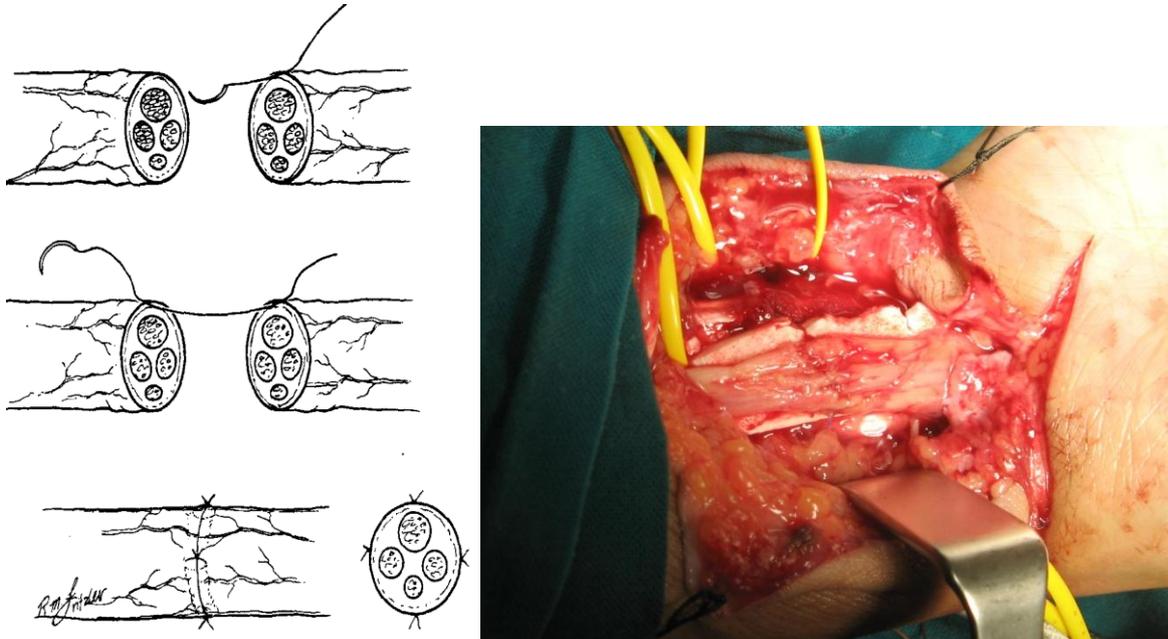
## **A. NEURORRAFIA EPINEURAL:**

Es el método tradicional de reparación de la sección nerviosa.

La coaptación se logra con sutura no reabsorbible de 8-0 a 10-0 en función del diámetro del nervio.

La primera sutura se realiza a través del epineuro proximal y distalmente a la zona de defecto y a continuación se anuda de forma que los extremos del nervio se enfrenten.

Se recomienda una segunda sutura en el extremo justo opuesto a la primera y a continuación suturar el resto del diámetro del nervio hasta que quede completamente sellado (Figura 21).



**Figura 21: Sutura epineural. Izquierda: esquema representativo de la técnica. Derecha: Sutura epineural en nervio Mediano. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada. Cortesía Dr. Hdez Cortés.**

## **B. NEURORRAFIA PERINEURAL O FASCICULAR:**

Consiste en la sutura de cada fascículo de forma individual (Figura 22).

Precisará de una neurolisis interna con el objetivo de disecar cada uno de los fascículos.

Técnicamente igual que la epineural con la única salvedad de que en este caso la sutura se realiza en el perineuro.

Posteriormente también se precisa de la sutura epineural para favorecer el aporte vascular.

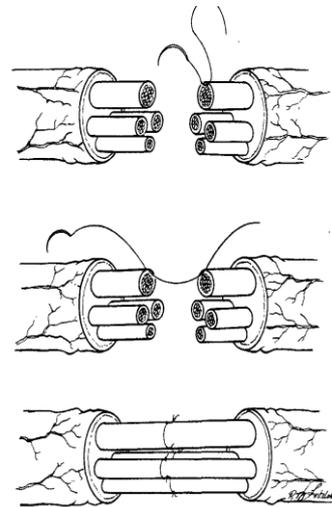
Aunque parece la técnica de reparación más minuciosa y anatómica, la disección extensa que precisa y la sutura intraneural permanente pueden favorecer la fibrosis y de esa forma afectar a la recuperación funcional del nervio (Tupper *et al*, 1988; Zhao Q, 1992).



**Figura 22: Izquierda.**

**A. Sutura perineural o intrafascicular. Maniobra de Triangulación. Sutura del fascículo más posterior del nervio. B. Resultado final sin sutura del epineuro.**

**Abajo. Esquema representativo de la técnica de sutura.**



### **C. NEURORRAFIA EPIPERINEURAL:**

Se trata de realizar una sutura enlazando el epineuro y el perineuro al mismo tiempo.

Utilizada por algunos autores en la actualidad. Está recobrando interés.

### **FACTORES DETERMINANTES DE LA REGENERACIÓN NERVIOSA.**

Varios factores importantes parecen influir en la regeneración nerviosa:

1. **Edad:** indudablemente influyen en la velocidad y el grado de regeneración nerviosa. Las neurorrafias tienen mayor éxito en los niños que en los adultos y tienen mayor probabilidad de fracasar en los enfermos ancianos. El potencial

de regeneración y la mayor plasticidad neuronal son los responsables de esa mayor tasa de éxito (Senes *et al*, 2009).

- 2. Separación entre los cabos nerviosos:** la naturaleza de la lesión es el factor que más influye sobre el defecto que queda entre los cabos nerviosos después de reseca neuromas o gliomas.

Si la sección del nervio se ha producido con un objeto cortante como una navaja o cuchillo, la alteración es pequeña tanto distal como proximalmente, y aunque los extremos se retraen, el defecto puede superarse fácilmente. Si por el contrario el defecto está producido por un proyectil de alta velocidad, las alteraciones de los cabos proximal y distal del nervio son grandes, además será necesario desbridar amplios segmentos de ambos muñones para exponer fascículos normales, generando una separación mayor aún.

La tensión en la línea de sutura es el factor más importante en el resultado de una neurorrafia (Millesi, 1963; Sunderland, 1978).

El aporte vascular del nervio procede de un sistema intrínseco y extrínseco que están conectados entre sí y que a su vez se origina en las arterias locales y regionales. El sistema de vascularización más importante del nervio es el intrínseco. Una tensión excesiva a lo largo del nervio puede comprometer significativamente el aporte vascular intrínseco del nervio (Bora, 1980).

Si el gap o defecto entre el extremo proximal y distal del nervio no se mantiene con una sutura sin tensión se deberá recurrir a técnicas de puenteo como el injerto nervioso o la transferencia nerviosa (Campbell, 2008).

- 3. Tiempo transcurrido entre el momento de la lesión y la reparación:** la resolución de la desmielinización segmentaria requiere entre 8-12 semanas, por tanto los déficit que persistan más allá de ese periodo indican la presencia de una lesión axonal (Mackinnon and Dellon, 1988; Rudge *et al*, 1974).

El periodo de tiempo que tarda en producirse una atrofia muscular irreversible, debido a la degeneración de la placa motora, oscila entre los 12 y los 18 meses, a partir de ese momento cualquier intervención produce muy poco o ningún beneficio (Campbell, 2008). Se debe procurar la llegada del cono de crecimiento antes de ese periodo. En condiciones óptimas el crecimiento axonal se produce a una velocidad de 1mm/día desde el sitio de lesión o desde el sitio de reparación quirúrgica.

Las células de Schwann y los tubos endoneurales se mantienen viables durante aproximadamente 18-24 meses después de la lesión nerviosa. Si durante ese periodo no se produce contacto del brote axónico con la placa

motora muscular, se produce la degeneración tanto de las células de Schwann como de los tubos endoneurales (Campbell, 2008).

Por tanto, teniendo en cuenta los dos factores anteriores, la sutura primaria en el momento agudo es óptima para obtener la mejor recuperación funcional. Si la herida es sucia o contaminada o se debe priorizar en la reparación de otras estructuras vitales, el momento óptimo de reparación oscila entre las 3 y 12 semanas (Myckatyn and Mackinnon, 2004; Siemionow and Sari, 2004).

4. **Nivel de lesión:** cuanto más proximal sea la lesión, más incompleta es la recuperación general de la función motora y sensitiva, sobre todo en las estructuras más distales (Siemionow and Sari, 2004; Campbell, 2008; Gregory *et al*, 2009).
5. **Estado de los cabos nerviosos:** el manejo meticuloso, la asepsia, el cuidado en la movilización, la conservación del riego sanguíneo neural, la evitación de la tensión y el aporte de un lecho adecuado con fibrosis mínima ejercen una influencia favorable sobre la regeneración nerviosa (Sunderland, 1952).
6. **Patología concomitante del paciente:** la existencia de otras patologías como la diabetes o la inmunodepresión dificultan el proceso de regeneración. El efecto de un proceso infeccioso es devastador para una reparación nerviosa, precisando probablemente la retirada del material implantado. El efecto del tabaco también ha sido estudiado con resultados poco concluyentes pero se piensa que enlentece el proceso ( Gregory *et al*, 2009).

#### 4. INJERTOS NERVIOSOS.

Es preferible un injerto nervioso cuando existe un defecto nervioso que no puede ser solventado sin tensión por una neurorrafia directa terminoterminal (Campbell, 2008). Hoy día los injertos nerviosos autólogos son considerados el *gold standard* para el tratamiento de lesiones nerviosas con defecto que no permiten la realización de una sutura terminoterminal (Pabari *et al*, 2010).

Los injertos nerviosos fueron descritos por Phillippeaux and Vulpian en 1870, y se utilizaron solo para aquellas lesiones con una gran pérdida de sustancia nerviosa.

Una de las principales críticas que se achacaron a los injertos nerviosos era la dificultad que tendrían los brotes axónicos para atravesar dos zonas de neurorrafia, y

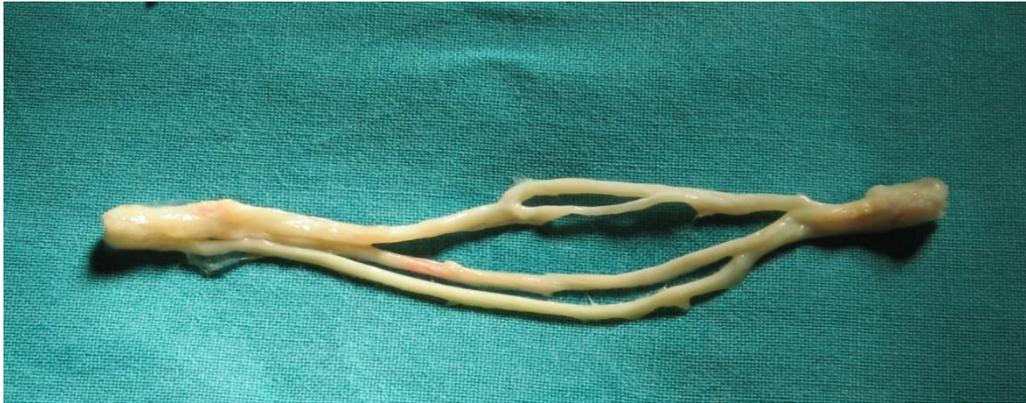
que la longitud excesiva del injerto haría fracasar el proceso de regeneración (Sunderland, 1945).

Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de dos neurorrafias para suturar el injerto nervioso proporciona mejores resultados funcionales que una única neurorrafia con tensión excesiva, debido a que la vascularización intrínseca del nervio es más favorable en el primer caso (Millesi, 1973; Myckatyn, 2004; Seddon, 1975).

Los axones normalmente entran en los injertos de forma aleatoria. Aquellos axones que interaccionan con una vía emparejada del otro extremo del nervio lesionado es más probable que se produzca la sinapsis con el tejido adecuado. Se produciría el contacto de los conos de crecimiento del nervio lesionado con el tubo endoneural del injerto que estaría “desocupado” de axones, y de esa forma se favorecería la regeneración nerviosa. Aquellos axones que no se hubiesen emparejado satisfactoriamente con el tubo endoneural correspondiente a su fascículo perderían su soporte trófico y se retraerían (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

Estudios recientes demuestran que un injerto nervioso motor “puro” permite una mejor regeneración que un injerto nervioso sensitivo “puro” apreciándose un mayor número de fibras nerviosas que atraviesan el injerto y de mayor tamaño (Nichols *et al*, 2004). Sin embargo, el uso de nervios motores para realizar un injerto nervioso resulta impensable debido a la comorbilidad generada, a menos que el injerto proceda de una extremidad insalvable (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

Generalmente se suelen utilizar nervios sensitivos puros para realizar los injertos nerviosos, forzando a los axones a crecer en el interior de unos tubos endoneurales de origen sensitivo hasta que contactan con el cabo distal del nervio. Los axones que atraviesan la sutura distal del injerto serán los que con más probabilidad sobrevivan, maduren y permitan la recuperación funcional (Myckatyn and Mackinnon, 2004).



**Figura 22: Arriba: Nervio Sural preparado para ser injertado una vez extraído de la zona donante. Abajo izquierda: disección del Nervio Sural en pantorrilla derecha (zona donante). Abajo derecha: interposición del injerto en la zona de defecto (zona receptora). La tijera muestra la zona de contacto entre el injerto y el nervio lesionado a nivel distal. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada**

La morbilidad en la zona donante es uno de los factores negativos de los injertos nerviosos autólogos. Normalmente deben cumplir una serie de criterios:

- El **déficit funcional** debe ser aceptable y bien tolerado.
- **Accesible**, lo contrario conllevaría una disección quirúrgica más amplia que acarrearía más morbilidad e incremento del tiempo operatorio que limitaría la preparación de la zona a injertar.
- **Calibre y longitud moderados**, debido a que la vascularización del injerto implantado se produce mediante inoculación longitudinal y secundariamente por los tejidos circundantes donde se sitúa. Un injerto nervioso muy grueso o muy largo puede sufrir una necrosis central inducida por la isquemia (Best and Mackinnon, 1999).

Estas características hacen que el nervio Sural sea el más utilizado para los autoinjertos. Otros nervios que se pueden utilizar son los nervios Peroneo Superficial y Profundo, Posterior y Lateral Cutaneo del antebrazo, nervios Intercostales, entre otros (Pabari *et al*, 2010).

El conocimiento de la topografía del nervio lesionado y su organización somatotrópica es importante para el cirujano debido a que los injertos en cable pueden ser dispuestos para hacer corresponder cada fascículo motor, sensitivo o mixto con su homónimo en cada extremo del nervio, mejorando así el pronóstico funcional (Myckatyn and Mackinnon, 2004) (Figura 22).

### **Injertos nerviosos vascularizados:**

Actualmente están ganando notoriedad por facilitar la regeneración axonal a través de los injertos que puentean la zona de herida y por limitar la zona de isquemia central del injerto en injertos de gran calibre o gran longitud (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

Esto hace que el injerto vascularizado presente una serie de ventajas, fundamentalmente, que disminuya la concentración de fibroblastos que infiltran la zona de lesión, incrementa la mielinización, la concentración de células de Schwann y el diámetro de las fibras nerviosas que se regeneran (Tark and Roh, 2001). Se ha demostrado una mejor recuperación funcional con los injertos vascularizados en roedores en comparación con los injertos no vascularizados (Kanaya *et al*, 1992).

Se ha demostrado su eficacia en humanos cuando es preciso un injerto nervioso de gran calibre y longitud que excede los 20 cm tanto en miembro inferior como superior. No sin embargo, en defectos pequeños (Hasegawa *et al*, 2004).

Los más utilizados en la actualidad son los injertos vascularizados de nervio Radial Superficial y el injerto vascularizado de nervio Femoral Cutaneo Superficial (Kashima *et al*, 2010).

### **Aloinjertos nerviosos:**

En teoría nos permitiría el aporte de tejido nervioso donante de forma ilimitada sin causar morbilidad en la zona donante.

Su uso, sin embargo, está limitado por la necesidad de agentes inmunosupresores requeridos para que sea eficaz. A diferencia del trasplante de otros tejidos, el uso de inmunosupresores sólo se extendería hasta que los axones y las células de Schwann del propio paciente poblasen el aloinjerto, lo cual se estima en aproximadamente unos 18 meses (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

La indicación de aloinjerto se limita a paciente que precisa de un injerto nervioso de gran calibre y/o tamaño que están inmunodeprimidos por otra causa y en pacientes que precisan tantos injertos nerviosos que agotan la posibilidad de autoinjertos (Mackinnon *et al*, 2001, 1996 y 1992).

Existen en el mercado injertos nerviosos de cadáver (AxoGen® nerve allograft). Son injertos descelularizados y procesados que se utilizan como almacén o soporte (Pabari *et al*, 2010).

Actualmente existen investigaciones en marcha para su uso en lesiones del plexo braquial y de la cola de caballo (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

## 5. TRANSFERENCIA NERVIOSA O NEUROTIZACIÓN.

Son técnicas que se utilizan casi exclusivamente para lesiones proximales, fundamentalmente lesiones preganglionares del plexo braquial.

Fibras nerviosas de un nervio son transferidas a un nervio denervado, con el objetivo de “neurotizarse” (inervar) el nervio. Los nervios motores se utilizan para restaurar la función motora y los nervios sensitivos para restablecer la función sensorial (Gregory *et al*, 2009).

Clásicamente, estas técnicas conllevaban el sacrificio de la función del axón donante, pero con las actuales técnicas termino-laterales no existe tal sacrificio (Gregory *et al*, 2009).

El proceso celular exacto que se produce aún no es totalmente conocido y es objeto de estudio y controversia. Las hipótesis de la regeneración mediante reparación ETS (“end to side” (terminolateral)) son:

- Invasión desde el muñón proximal seccionado del nervio lesionado
- Regeneración desde axones del nervio donante que fue dañado durante la preparación del nervio
- Regeneración desde verdaderos brotos axonales colaterales que surgen desde el sitio de reparación ETS. (Dvali and Myckatyn, 2008)  
Se piensa que los brotes axonales colaterales (*Collateral Sprouting*) surgen desde los nódulos de Ranvier justo proximal al nivel de coaptación entre los nervios. (Dvali and Myckatyn, 2008)

Los nervios donantes son seleccionados basándose en la proximidad de la unión neuromuscular al musculo diana para minimizar el tiempo de reinervación y

que la reparación se haga sin tensión. A veces son necesarios injertos nerviosos para llevar a cabo la neurotización (Tung *et al*, 2004).

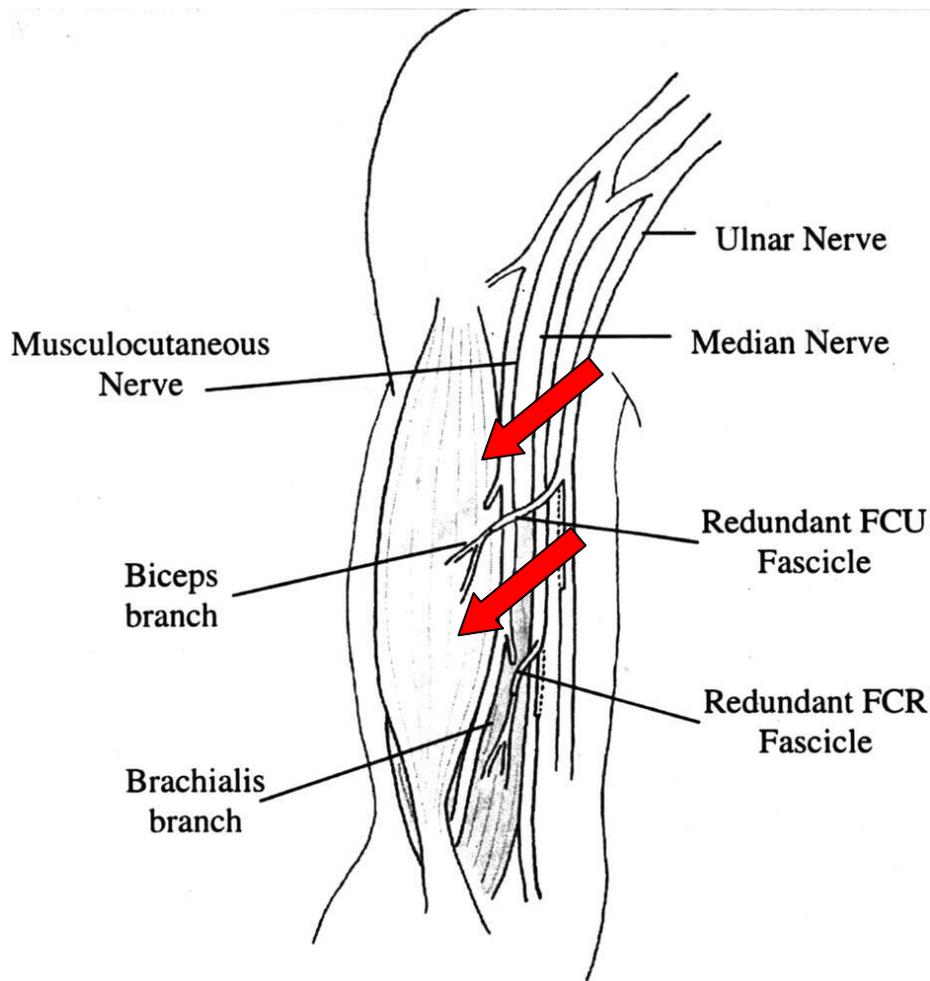
### **Indicaciones de neurotización:**

1. Lesiones del plexo braquial donde se precisa un nervio muy proximal o no es adecuado ningún nervio para el injerto nervioso.
2. Lesiones muy proximales que requieren una gran distancia para la regeneración
3. Evitar zonas anatómicamente complejas y lesionadas por el riesgo de producir más lesión
4. Traumatismo en una extremidad que asocia una gran pérdida de sustancia nerviosa
5. Lesiones nerviosas parciales con una pérdida funcional definida
6. Lesiones por avulsión de raíces de la médula espinal
7. Lesiones nerviosas donde el nivel de lesión es desconocido como las neuropatías idiopáticas, las lesiones por radiación y las lesiones nerviosas con varios niveles afectados  
(Tung *et al*, 2004)

La recuperación motora dependerá de que un número suficiente de axones alcancen el músculo diana y reinerven las fibras musculares en un periodo llamado “**crítico**” que se estima entre los 12 y los 18 meses, debido a la degeneración de la placa motora fundamentalmente (Tung *et al*, 2004).

Algunos cirujanos prefieren que los nervios donantes sean *intraplexus* ya que proporcionan mayor número de axones que los *extraplexus*, y por tanto incrementan la probabilidad de éxito. A pesar de esto algunos nervios *extraplexus* como los nervios intercostales y el nervio accesorio dan muy buenos resultados funcionales para la recuperación funcional del codo y el hombro (Terzis *et al*, 1999).

Existen múltiples posibilidad técnicas de transferencia nerviosa con el objetivo de recuperar la movilidad del miembro paralizado. En 1994, Oberlin *et al* describió una reparación muy distal mediante la coaptación del nervio Cubital en el brazo proximal directamente a la rama del Bíceps del nervio Musculocutaneo. Este autor ha sido avalado posteriormente en la rápida recuperación funcional que presentan estos pacientes que además no asocian comorbilidad en la zona donante. Tung *et al* han modificado la técnica de Oberlin promoviendo además la neurotización del musculo Braquialis con el objetivo de aumentar la fuerza de flexión del codo (Figura 23).



***Figura 23: Técnica de Oberlin modificada. Consiste en localizar los fascículos motores redundantes que inervan al FCR (Flexor Carpi Radialis), FDS (Flexor Digitorum Superficialis) y PL (Palmaris Longus) del Nervio Mediano y los fascículos motores redundantes que inervan al FCU (Flexor Carpi ulnaris) del Nervio Cubital. La rama del FCU serán transferida parcialmente a la rama del Bíceps y la rama del FCR será transferida a la del Brachialis, ambas procedentes del Musculocutaneo (nervio lesionado). Además los nervios residuales que quedan en su localización permiten la función de cada uno de los músculos inervados. (Tung et al, 2004)***

Existen otras técnicas de transferencia nerviosa para aumentar la movilidad de otras articulaciones del miembro superior, y en la actualidad, se están desarrollando otras que tienen el mismo objetivo con buenos resultados funcionales. Por ejemplo, la reinervación del Subescapular para permitir la abducción y rotación externa del hombro con el nervio Accesorio. Reinervación del nervio Axilar para permitir la Abducción del hombro (Deltoides inervado por rama motora del nervio Axilar) con los nervio Pectorales mediales, Rama tricipital del nervio Radial, nervio Intercostal, nervio Espinal Accesorio o nervio Toracodorsal (Tung et al, 2004).

## 6. INJERTOS NERVIOSOS SINTÉTICOS

En los últimos años ha existido un gran desarrollo de los injertos nerviosos sintéticos con el objetivo de poder resolver las lesiones nerviosas con defecto que no eran reparables con sutura nerviosa termino-terminal (neurorrafia directa) (Pabari *et al*, 2010).

En todos los casos en los que hay una lesión del nervio periférico con defecto o gap se considera que el *gold standard* para reparar esas lesiones consiste en la interposición de un injerto nervioso autólogo (Dahlin and Lundborg, 2001).

Tanto los conductos nerviosos como los aloinjertos tienen una clara ventaja sobre el injerto autólogo, primero porque evitan la cirugía de sustracción del nervio a injertar, y por tanto, la demora del proceso operatorio; y en segundo lugar porque se evita la morbilidad de la zona donante: cicatriz, dolor, formación de neuromas y pérdida permanente de la sensibilidad de esa zona (Ray and Mackinnon, 2009).

Los intentos de tubulización del nervio periférico para solventar los defectos en una lesión nerviosa son muy tempranos. En 1880, Gluck intentó unir ambos extremos del nervio lesionado ayudándose de matriz ósea desmineralizada. Más tarde, en 1890, Buenger, utilizó la arteria braquial de un cadáver humano para reparar la lesión de nervio ciático de un perro. Al principio del año 1900, Formatti y Nageotte usaron venas como injerto para reparar la citada lesión nerviosa. En el 1920, Platt ejecutó un trabajo similar, pero en este caso el injerto venoso se asociaba a fascia muscular, que se dejaba en su interior. Durante la primera mitad del siglo XX, existen muchos documentos en los que se citan muy variopintas composiciones del conducto nervioso que se utiliza para resolver el defecto, así como gelatina, agar, hueso, metal, goma, aunque a ninguna de ellas se le reconoce un éxito clínico patente (Taras *et al*, 2005).

Es después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se reanuda el interés por el problema y resurge el interés por el uso de vasos o conductos que sirvan de guía a la regeneración nerviosa, ya sea su composición sintética o natural. Hay que destacar como autor a Chiu que durante la década de los 80 y 90, realizó varios ensayos obteniendo éxito desde una perspectiva clínica. En uno de sus estudios demostró que la reparación nerviosa primaria era superior en resultados a la reparación nerviosa haciendo uso de injertos venoso, describiendo un proceso de fibrosis extensa en el segundo caso como responsable de los malos resultados (Chiu, 1990). Se mostró que en las lesiones nerviosas de 3 cm o menos de nervios cutáneos había una buena recuperación de la sensibilidad, siendo objetivada mediante el test de discriminación entre dos puntos (2pd) y mediante el "Ten Test" (escala de sensibilidad propioceptiva, nociceptiva y termoceptiva) (Chiu, 1990).

Brunelli realizó ensayos similares, pero en este caso utilizó pared venosa como conducto, y en cuyo interior depositó musculo estriado, con el objetivo de evitar el colapso del tubo, encontrando como sorprendente resultado, que histológicamente y funcionalmente, la recuperación era mayor cuando había una interposición de fibras musculares en el defecto nervioso superior a 3 cm, postulándose que la presencia de fibras de origen muscular potenciaba el crecimiento axonal (Brunelli *et al*, 1993).

Santiago Ramón y Cajal, como pilar fundamental, con las grandes aportaciones realizadas en el campo de las neurociencias, haciendo destacar su postulado sobre el concepto de **neurotropismo**. Cajal establece que agentes químicos desde el muñón distal del nervio, podrían atraer al muñón proximal, debido a un proceso de regeneración axonal, que estaría mediado por agentes neurotrópicos segregados después de una lesión por los extremos del nervio. Los experimentos realizados por el neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal, mostraron que después de una lesión, las fibras dañadas en la médula espinal adulta empiezan a crecer y ramificarse por un cierto tiempo, pero después, éstos brotes se paralizan por los obstáculos insuperables con que se encuentran, hasta que se retraen y desaparecen. Es decir, que la condición traumática es suficiente para sacar a los axones de su “letargo”, ya que las neuronas intentan regenerarse mostrando conos de crecimiento y arborizaciones. De acuerdo con Cajal, esta condición se frustra, primero, por falta de sustancias capaces de generar una vigorosa capacidad de crecimiento, y segundo, por la ausencia de sustancias capaces de atraer y dirigir a los axones a su destino. (Ramón y Cajal, 1928). En 1911, Tello, llevo a cabo unos experimentos, en los que se cortaba la corteza cerebral y se transplantaba un fragmento de nervio ciático previamente dañado entre 8 y 12 días antes. Se observaba que fibras de varios puntos de la corteza convergían y penetraban en el trasplante a los 12-14 días. Sin embargo, a los 40 días el trasplante disminuía de volumen, se encontraba penetrado por tejido conectivo y en proceso de atrofia y reabsorción, posiblemente, porque las sustancias tróficas habían dejado de secretarse. Por lo tanto, concluyeron que “estos experimentos” confirman que el crecimiento de los axones depende de la presencia de una “comida especial”, la cual es producida en proporciones efectivas únicamente por las células de Schwann de los nervios”, es decir, se demostró que las neuronas pueden crecer si se encuentran en un medio ambiente permisivo (Taras *et al*, 2005)

Años después, el concepto de neurotropismo de Cajal fue rebatido por Weiss, postulando que era más importante una **guía** que contactara entre ambos extremos del nervio lesionado, que el neurotropismo, como factor fundamental para la regeneración nerviosa en una lesión de nervio periférico (Weiss, 1944).

Fue en los años 80, cuando mediante sofisticados experimentos, se demostró, que ambos factores, **neurotropismo** (postulado por Cajal) y **guía de**

**contacto** (postulado por Weiss) eran importantes en la regeneración del nervio periférico, lo que constituye la base para el desarrollo de diferentes técnicas y métodos que se aúnan con el mismo objetivo, favorecer el crecimiento y desarrollo axonal, que va a permitir obtener óptimos resultados clínicos e histológicos en una lesión de nervio periférico (Taras *et al*, 2005).

Éstas aportaciones permitieron introducir técnicas de microcirugía asociadas a conductos de silicona en la reparación de nervio cubital y mediano a nivel de muñeca, donde existían lesiones de 3-4 mm, comparándose éstas con la reparación primaria mediante sutura termino-terminal tradicional, de forma que los resultados más precoces no mostraban diferencias en la sensibilidad y actividad motora de los nervios después de un año de seguimiento. Con lo cual se postuló que estas técnicas de microcirugía y uso de conductos de silicona serían más útiles en defectos nerviosos en los que exista pérdida de sustancia, demostrándose parcialmente en los sucesivos ensayos (Lundborg y Dahlin, 1989).

En la actualidad, se están desarrollando varias investigaciones en el desarrollo de conductos nerviosos que estimulan la regeneración nerviosa en lesiones de mayor envergadura. Distintos materiales biodegradables han demostrado la capacidad para facilitar la regeneración nerviosa (Taras y Jacoby, 2008).

Existen algunas marcas que han comercializado sus propios conductos sintéticos elaborados con distintos materiales, reabsorbibles y no reabsorbibles, que han sido aprobados por la F.D.A. (*Food and Drugs Administration*) y por la *Conformit Europe-Approved* (tabla 2). Según la FDA y la CE y basándose en los datos clínicos, el precio, la longitud y la composición del tubo, el tubo de PGA (Poliglycolide Acid) (Neurotube®) es el más adecuado en este momento en el mercado para su uso clínico en la reparación de lesiones nerviosa periféricas y lesiones de pares craneales (Meek y Coert, 2008).

Composición	Conducto Nervioso	Datos clínicos. Autores.	Uso clínico.	Longitud del defecto	Seguimiento (meses)	Resultados
Colágeno tipo I	NeuraGen® Integra NeuroSciences  Degradación: 48 meses  NeuroMatrix NeuroFlex Collagen Matrix, Inc. Degradación: 7 meses	Lohmeyer <i>et al.</i> , 2009  Bushnell <i>et al.</i> , 2008  Farole <i>et al.</i> , 2008  Ashley <i>et al.</i> , 2006  Taras <i>et al.</i> , 2005; 2008	Nervios digitales  Nervios digitales  Nervios linguales y nervios alveolares inferiores Lesiones del plexo braquial en el nacimiento Nervios: cubital, mediano, radial, interóseo posterior, digital común, nervios radiales superficiales.	>18 mm  >20mm  15mm  >20mm	12  12-22  12-30  24	4/12 excelentes 5/12 buenos 1/12 pobres 2/12 ninguno 4/9 excelentes 4/9 buenos 1/9 prometedores 4/9 buenos 4/9 buenos 4/5 buenos  1/5 pobres En estudios clínicos
Acido Poliglicólico	Neurotube®  Synovis Degradation: 6 meses	Rosson <i>et al.</i> , 2009  Dellon <i>et al.</i> , 2006  Navissano <i>et al.</i> , 2005  Battiston <i>et al.</i> , 2005  Kim <i>et al.</i> , 2001	Nervio espinal accesorio, nervio mediano y cubital Nervios digitales en pie para transferencia del pulgar Nervio facial  Nervios digitales  Neuroma del nervio plantar medial	>40 mm  25-30mm  >30mm  >40mm  20mm	4-66  30  7-12  6-74  10	6/6 recuperación motora Recuperación sensorial 1/7 muy bueno 4/7 bueno 2/7 prometedores  13/17 muy buenos 3/17 buenos  1/17 pobres Dolor resuelto
Poli-DL-lactico-Caprolactona	Neurolac ©  Polyganics Degradación: 16 meses	Bertleff <i>et al.</i> , 2005	Nervios Digitales	>20mm	12	Recuperación sensorial

**Tabla 2: Sumario de la FDA/CE de conductos nerviosos y resultados clínicos en humanos (Pabari et al, 2010).**

## TIPOS DE CONDUCTOS NERVIOSOS SINTÉTICOS:

### A. COLÁGENO.

Se trata de una proteína que ha sido la más comúnmente usada como biomaterial en el sistema nervioso. Existen 13 tipos de colágeno, el más presente en nuestro organismo es el tipo I, se localiza fundamentalmente en la piel y en los huesos y también es el colágeno predominante en el nervio periférico (Meek y Coert, 2008).

El colágeno tipo I de la piel bovina y el tipo IV han sido los principales componentes de esas guías nerviosas. El periodo de degradación oscila entre 1 y 9 meses (Itoh *et al* 2002).

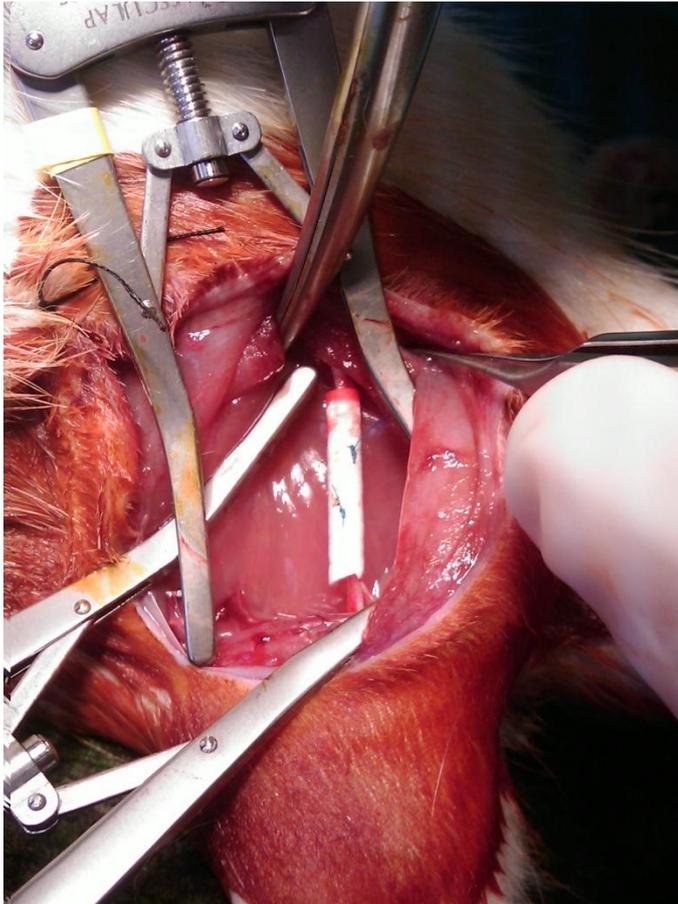
Se ha probado que los conductos fabricados con colágeno tipo I constituyen un soporte y una guía tisular para la regeneración nerviosa in vivo. Se han descritos casos de reacción de cuerpo extraño, a pesar de que son estructuras con una baja inmunogenicidad y han demostrado biocompatibilidad *in vivo*. Este material se ha utilizado para varias aplicaciones biomédicas: piel artificial, apósitos biológicos, desarrollo de fármacos, sustitutos meníngeos y conductos nerviosos (Miyata *et al*, 1992).

### **A.1. NeuraGen ®:**

Es un conducto nervioso semipermeable elaborado con colágeno tipo I.

Los estudios clínicos en pacientes realizados por Ashley *et al.*, en los que se utilizaron estos conductos nerviosos en 5 de 7 lesiones de plexo braquial obstétricas para tratar lesiones con defecto de aproximadamente 2 cm o mayores. Cuatro de los cinco pacientes mostraron una buena recuperación dos años después de la intervención (Ashley *et al.*, 2006).

Casi de forma simultánea, un estudio realizado por Lohmeyer *et al.*, en lesiones nerviosas localizadas en miembros superiores en 11 pacientes con un defecto superior a 18 mm a los que se colocaron estos tubos nerviosos y con un seguimiento de 12 meses sólo de la recuperación sensitiva: 4 pacientes mostraron excelentes resultados, 1 pobres resultados y 1 sin recuperación sensitiva alguna (Lohmeyer *et al.*, 2007).



**Figura 24: Conducto nervioso de colágeno tipo I (NeuraGen) implantado en nervio ciático de rata con defecto nervioso de un cm. Cirugía Experimental.**

## **A.2. NeuroMatrix®, NeuroFlex®.**

Se obtienen de colágeno tipo I purificado procedente de tendón de Aquiles bovino.

Ambos son el mismo tipo de tubo, son flexibles y resistentes al colapso. El periodo de reabsorción se estima en torno a 4-8 meses.

No hay publicaciones hasta el momento con estos conductos (Meek y Coert, 2008).

## **B. POLIESTER ALIFÁTICO SINTÉTICO.**

Es un polímero biodegradable derivado de poliéster alifático sintético como el ácido poliglicólico, láctico y sus copolímeros que se usan como biomateriales en aplicaciones médicas como la fabricación de suturas y fijaciones en cirugía ortopédica (Meek y Coert, 2008).

La FDA ha aprobado dos conductos elaborados con este material para la práctica clínica:

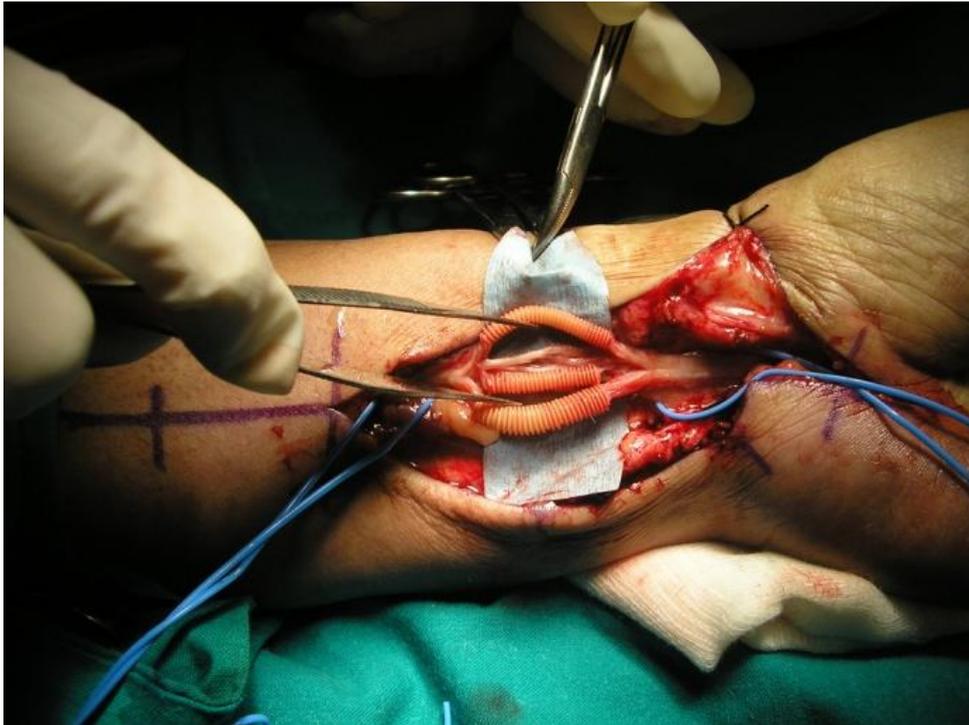
## **B.1. NeuroTube® (Ácido poliglicólico)**

Es el material con el que se elabora la sutura de Vicryl®. Se trata de un material poroso que permite la penetración de oxígeno para la regeneración nerviosa. El tubo en este caso es flexible, lo que permite disponerlo en la articulaciones y adherido a tendones. Es corrugado, lo que evita el colapso del tubo. La luz del tubo se suele rellenar de suero heparinizado. Su ficha técnica informa de la reabsorción completa del tubo a los 6 meses mediante un proceso de hidrólisis (Meek y Coert, 2008).

Según la FDA, en base a los estudios clínicos desarrollados hasta el momento, el conducto nervioso de ácido poliglicólico (PGA) (NeuroTube®) debe ser la elección para la reparación de lesiones nerviosas periféricas con defecto. Hay obvias ventajas de este tubo tanto en su longitud, precio y el aval de los datos clínicos publicados (Meek y Coert, 2008).

En los datos revisados hasta la fecha de lectura de esta tesis doctoral no hay datos concluyentes, dependiendo de la fuente consultada los resultados son mejores con PGA o con Poli-DL-Caprolactona. Sin embargo, en un estudio realizado por Shin *et al* en 2009, en el que se comparó la eficacia de los tubos comercializados actualmente en el mercado, se obtuvieron una serie de conclusiones importantes:

- La mayoría de los estudios de regeneración nerviosa a través de un conducto nervioso son muy cortos en el tiempo, llegando a un máximo de 12 semanas de seguimiento.
- Existe una gran dificultad para estudiar la recuperación motora basada en la medida de la fuerza muscular directa, peso del músculo y histomorfometría del musculo del animal.
- PGA tuvo la peor recuperación de potencial de acción del musculo y de máxima fuerza de contracción isométrica del musculo inervado (Shin *et al*, 2009).



**Figura 25: Colocación de NeuroTube® en fascículos de nervio mediano por neuroma de amputación en una sección parcial producida por un arma blanca que pasó desapercibida. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada. Dr. Hernández Cortés.**

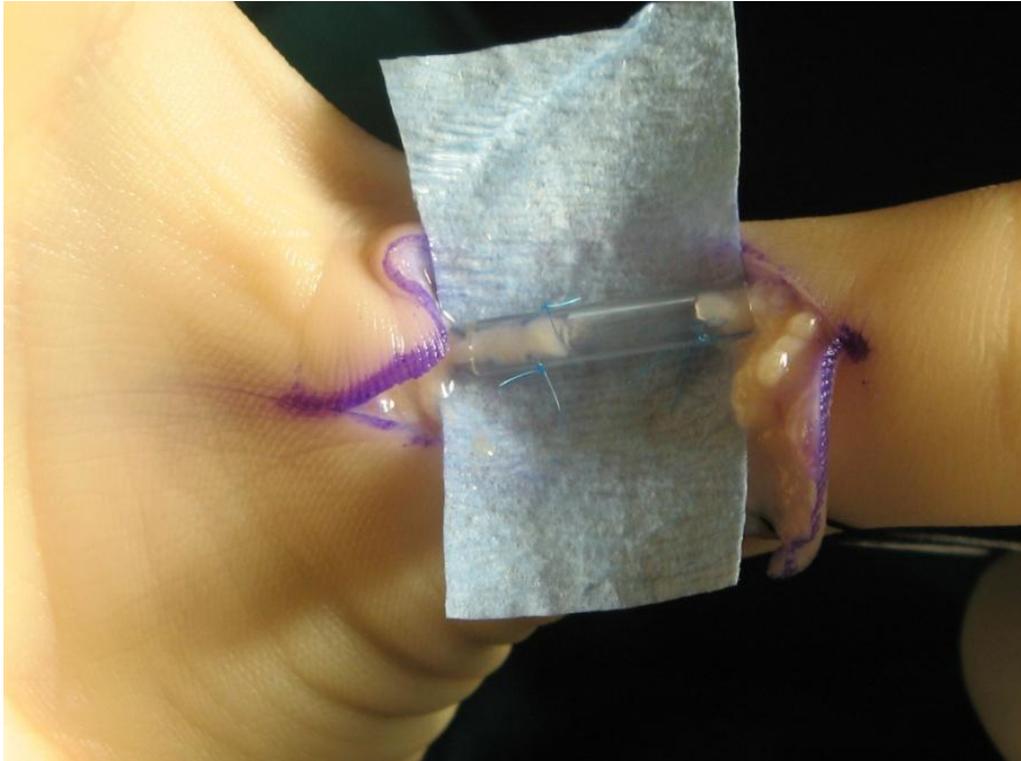
Con respecto a la biocompatibilidad del material se han realizado varios estudios que demuestran que la reabsorción del tubo se produce de forma aleatoria entre 1 mes y los 10 meses postimplante. Algunos autores declaran la ausencia completa de tubo después de los 6-8 meses, con una fragmentación casi completa a partir del mes (Keeley *et al*, 1991).

Este conducto nervioso ha sido evaluado por otros muchos autores en la práctica clínica con buenos resultados en la recuperación sensitiva, pero escasos estudios de recuperación funcional motora. (Meek y Coert, 2008)

## **B.2. NeuroLac ® (Poli-DL-Lactico-Caprolactona)**

Se trata de un conducto nervioso constituido por este material, que tiene la propiedad de degradarse totalmente en el plazo de un año, mostrando muy baja probabilidad de producir reacción de cuerpo extraño y gran capacidad de regeneración nerviosa a su través, según la marca fabricante (Meek y Coert, 2008). Sin embargo en estudios posteriores se ha demostrado que este tubo produce una reacción de cuerpo extraño que le hace fracasar al proceso de regeneración nerviosa (Hernández Cortés y Garrido Gómez, 2010) (Figura 26).

Este conducto nervioso mantiene sus propiedades de fuerza y flexibilidad durante un periodo de 8-10 semanas y empieza a perder su masa a partir de las 10 semanas. No es citotóxico y es hemocompatible (Meek *et al*, 2004).

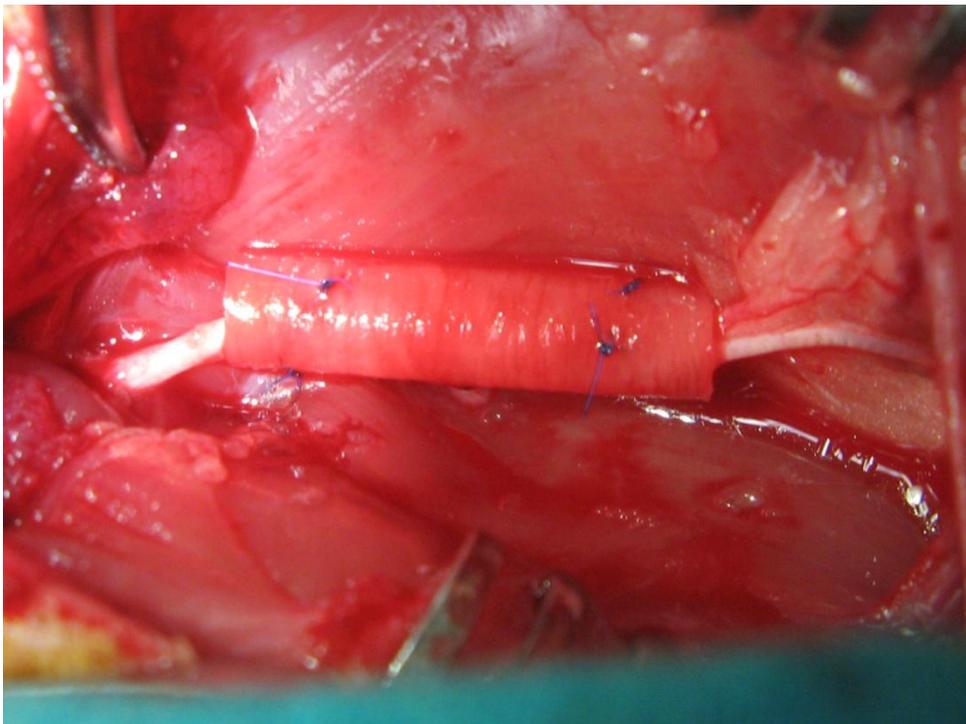
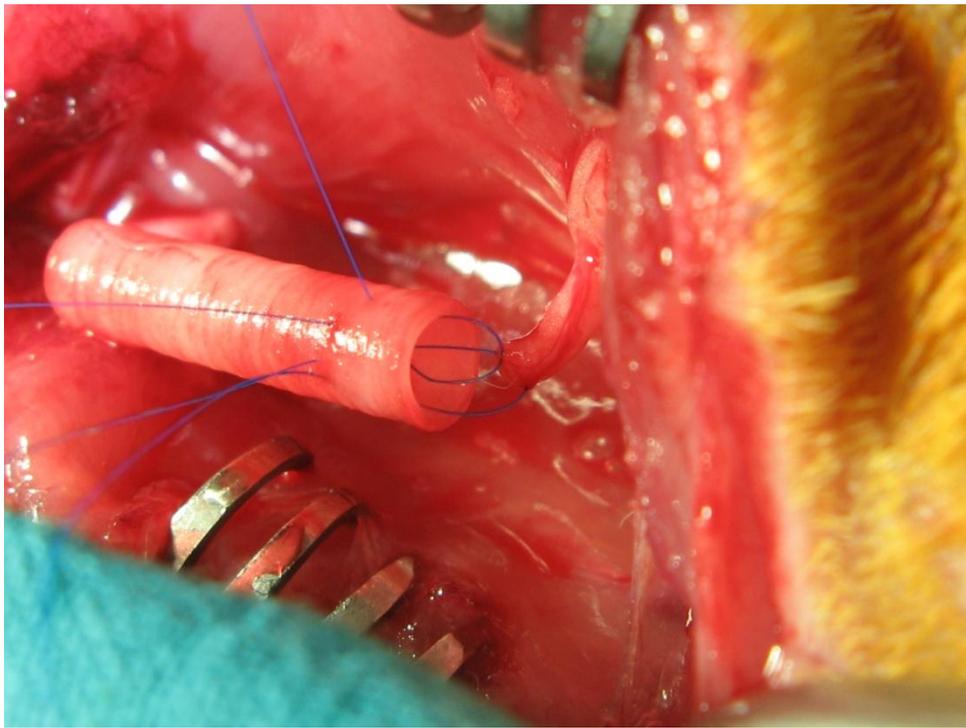


**Figura 26: Conducto nervioso de Poli-DL-Lactico-Caprolactona (NeuroLac®) colocado en colateral digital medial del dedo pulgar después de una lesión nerviosa con un defecto aproximado de un cm. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada. Dr. Hernández Cortés.**

## **TÉCNICA QUIRÚRGICA DE IMPLANTACIÓN DE UN CONDUCTO NERVIOSO SINTÉTICO.**

En primer lugar se identifican los extremos del nervio lesionado y se aíslan manejando con cuidado al nervio con unas pinzas sin dientes. Si es necesario se homogenizarán los cabos con ayuda de un neurótomo. A continuación, se seleccionará el conducto nervioso más conveniente al diámetro del nervio lesionado. Se introducirá uno de los extremos del nervio en el interior del conducto sintético y se realizará un sutura epineural entre el nervio y el conducto como en el caso de las neurorrafias termino-terminales. Pasa la sutura desde fuera hasta dentro del conducto al menos a 1 mm de su final. Posteriormente, se pasa una sutura transversalmente a través del epineuro a 2 mm del extremo seccionado desde dentro hasta fuera. El muñón del nervio seccionado debería ser arrastrado al interior

del conducto nervioso al apretar la sutura y realizar la lazada (Taras y Jacoby, 2008) (Figura 27).



**Figura 27: Arriba: Implantación de conducto nervioso. Detalle de sutura epineural-conducto sintético. Abajo: conducto nervioso implantado con cuatro suturas epineurales por extremo. Dos anteriores y dos posteriores. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada.**

## 7. TRATAMIENTOS PALIATIVOS.

Se realiza en aquellos casos en los que la recuperación espontánea no ha ocurrido o cuando la intervención quirúrgica ha fallado y persiste el déficit funcional que presentaba el paciente previamente (Gregory *et al*, 2009).

En definitiva el objetivo de los tratamientos paliativos es mejorar la estabilidad articular y permitir el movimiento que los grupos musculares paralizados no ejecutan. (Gregory *et al*, 2009).

Los procedimientos primarios en la reconstrucción periférica son la artrodesis y las transferencias tendinosas, además han aparecido técnicas innovadoras como las transferencias de músculo libre llegando a ser otra posible opción. Hay también una parte limitada de amputaciones, osteotomías, liberación de contracturas articulares y musculares. Por otro lado, también sería obligatorio incluir en los tratamientos paliativos los colgajos sensitivos, que se realizan raramente con el objetivo de mantener la sensibilidad en determinadas zonas anatómicas.

Se han descrito numerosos procedimientos para mejorar la función de miembros superiores y de miembros inferiores, es fundamental el estudio pormenorizado de cada paciente para determinar cuál de los procedimientos le producirá un mayor beneficio ante distintas posibilidades técnicas (Gregory *et al*, 2009).

Actualmente, estas técnicas son mucho más utilizadas en miembros superiores, ya que la extremidad superior es mucho más funcional que la inferior y en ella las lesiones nerviosas son mucho más frecuentes. El objetivo, sería por tanto, restaurar la estabilidad y/o movilidad del hombro y además restaurar la flexión del codo y la función de la mano, en el caso del miembro superior (Gregory *et al*, 2009).

### **Algunos de los procedimientos más realizados:**

#### **A. Artrodesis de hombro:**

El papel de la artrodesis de hombro es doble.

*En primer lugar*, en lesiones totales del plexo braquial, mediante estabilización del hombro permite al cirujano concentrar todos los injertos nerviosos y las transferencias posibles en restaurar la función del codo y de la mano.

*En segundo lugar*, en parálisis proximales del plexo donde los elementos estabilizadores del mismo han fallado y le generan al paciente dolor, subluxación o luxación escapulohumeral completa (Rouholamin *et al*, 1991).

## **B. Transferencias tendinosas al hombro.**

Se realiza fundamentalmente en parálisis parciales del hombro, donde la transferencia de algún tendón podría restaurar la movilidad.

También existen varias posibilidades:

- Trapecio a la inserción deltoidea en el Húmero (**Técnica de Bateman**)
- *Latissimus dorsi* y *teres major* al humero posterolateral para mejorar la rotación externa. (**Técnica de L'Épiscopo**)
- Avance anterior de la porción posterior del Deltoides para sustituir al segmento anterior no funcional.
- Transferencia del vientre largo del Tríceps al acromion.

Hay descritas otras técnicas de transferencia, pero la decisión de cual realizar depende de la naturaleza exacta de la parálisis (Alnot, 1996).

## **C. Transferencias tendinosas para restaurar la flexión del codo.**

La flexión del codo juega un papel fundamental en la funcionalidad del miembro superior y su restauración puede mejorar sustancialmente la movilidad de un paciente con una parálisis. Por ello, la reanimación de la flexión del codo es considerada una de las prioridades de la reparación primaria (García López *et al*, 2004).

Existen varios procedimientos en función del nivel de la lesión. Se ha de tener en cuenta también el alineamiento de la extremidad, la estética y fundamentalmente, el arco de movilidad preexistente.

### **Objetivos:**

- Obtener movilidad con arco funcional de 60-120°.
- Fuerza de flexión suficiente
- Función simultánea de supinación activa
- Mantener una flexión suave contrabalanceada por los extensores

### **Técnicas:**

#### **1. Transferencia del Dorsal Ancho:**

Unipolar: conserva la inserción humeral del dorsal ancho y transfiere a bíceps la espinotorácica.

Bipolar: la inserción humeral se secciona y se fija en coracoids. La inserción espinotorácica se une al tendón del Bíceps. Además proporciona la estabilización de la articulación glenohumeral.

Generalmente, esta transferencia se asocia a una isla cutánea que proporciona una superficie de deslizamiento muscular fisiológica.

Es la flexoplastia de elección por su escasa morbilidad, por su efecto sobre el hombro y sobre la supinación.

**2. Transferencia del Pectoral Mayor.**

**3. Transferencia de Epitrocleares.** (Grupo flexor pronador): Técnica de Steindler

**4. Transferencia del Pectoral Menor:** se debe asociar a otras técnicas como la de Steindler.

**5. Transferencia del Tríceps:** tiene el inconveniente de que se pierde la extensión del codo. No contribuye a la estabilización del hombro.

**6. Transferencia de Esternocleidomastoideo:** muy inestético, para obtener una correcta flexión hay que dejar la cabeza girada hacia el lado opuesto, apenas se utiliza.

**7. Transferencia libre de Gracilis** (García López *et al*, 2004).

**D. Transferencias tendinosas para restaurar la movilidad de la muñeca y la mano.**

Se puede deber a la lesión de alguno de los troncos nerviosos principales del antebrazo: nervio radial, nervio mediano, nervio cubital. Cada uno de estos nervios puede lesionarse a varios niveles y va a producir déficit sensitivo y motor que van a generar parálisis de distintos grupos musculares. Existe gran cantidad de técnicas que posibilitan la mejora de la movilidad de muñeca y mano y que permiten la realización, al menos en parte, de las actividades de la vida diaria.

## PARÁLISIS DEL NERVO RADIAL:

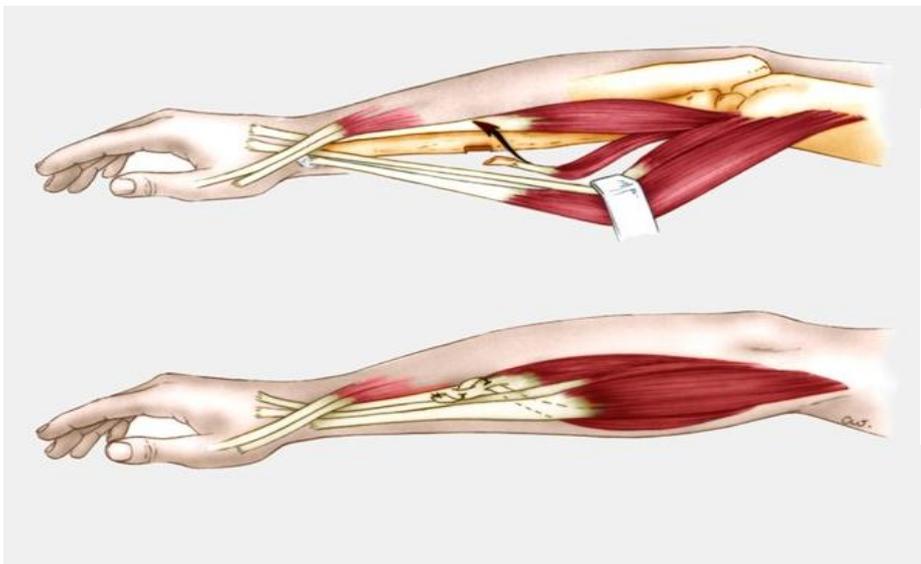
No suele existir afectación de la función del tríceps, por lo que está conservada la extensión del codo; sin embargo la parálisis motora consiste en la pérdida de la extensión de la muñeca, la extensión y abducción del pulgar y extensión de articulaciones metacarpofalángicas. Dependiendo si se trata de una lesión alta o baja; estará o no conservada la extensión de la muñeca (Figura 28).



**Figura 28:** Paciente con parálisis del nervio radial en miembro superior izquierdo. Cortesía Dr. Hdez Cortés.

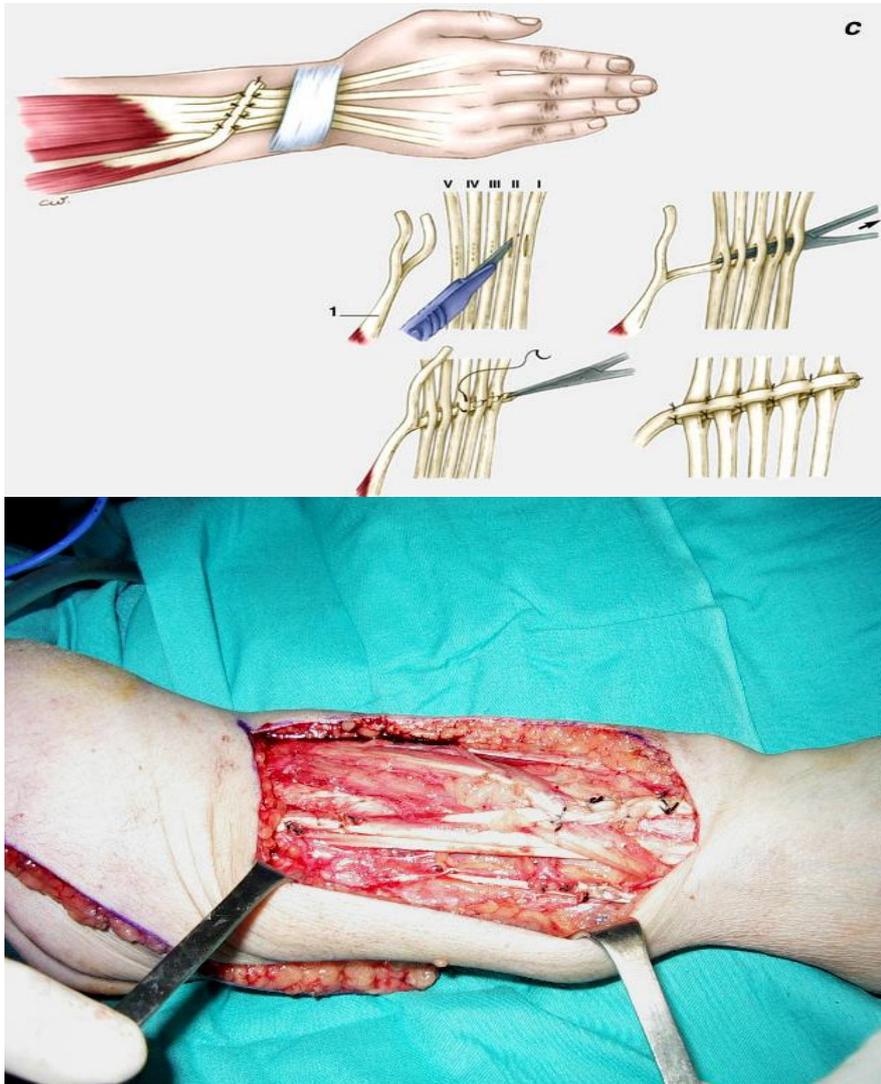
En estos casos la cirugía consistirá en:

**Transferencia del pronador redondo (PR) al primer y segundo radial externo (SER):** para recuperar la extensión de la muñeca (Figura 29).



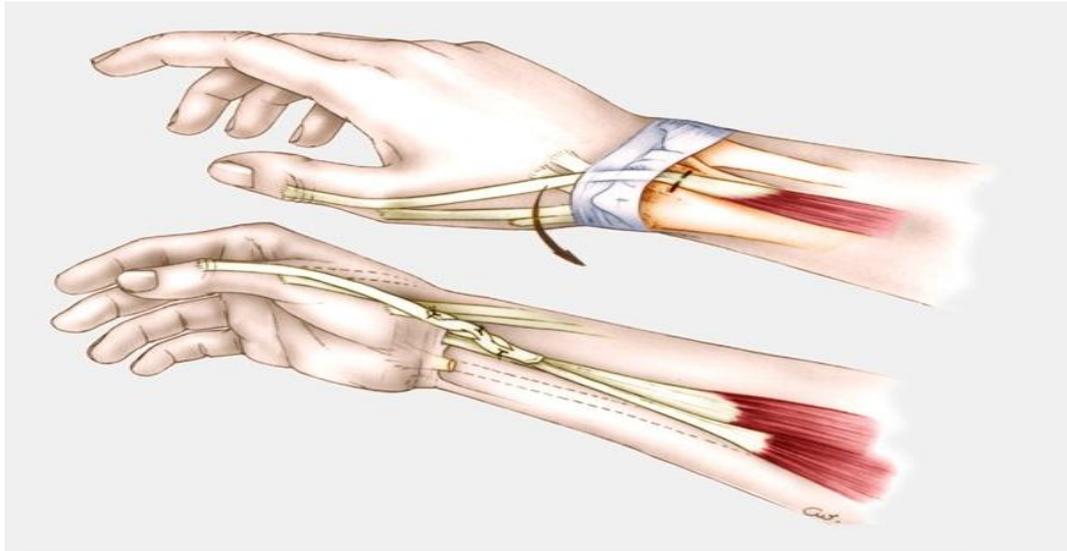
**Figura 29:** Transferencia de Pronador Redondo al primer y segundo radial externo.

**Transferencia del flexor radial del carpo (FRC) al extensor común de los dedos:** permite la extensión de la muñeca y de las metacarpofalángicas (Figura 30).



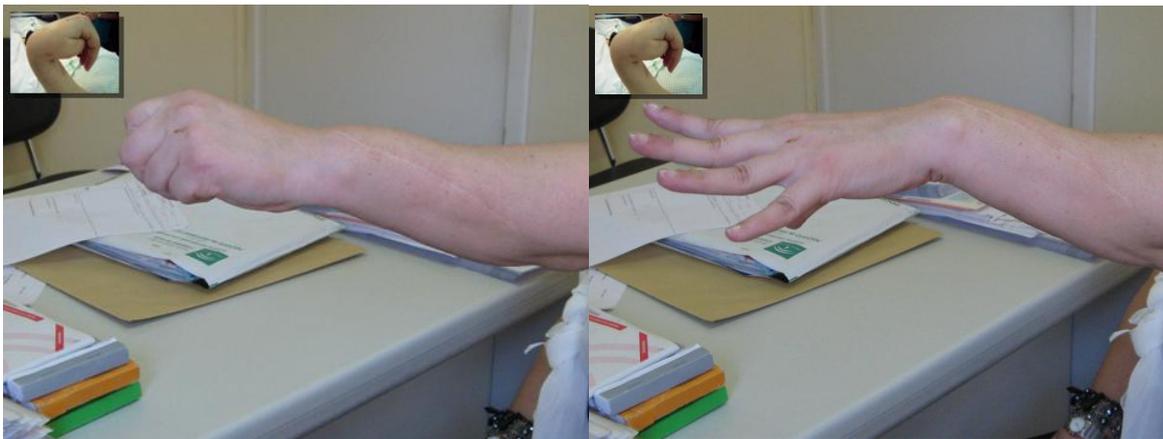
**Figura 30: Transferencia de FRC al extensor común de los dedos. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada.**

**Transferencia del palmar menor (Pm) al extensor largo del pulgar (ELP)** redirigido por fuera de su tercer compartimento extensor: permite recuperar la extensión y abducción del pulgar.



**Figura 31: Transferencia de Palmar menor a Extensor Largo del Pulgar. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada.**

Existen otras posibilidades técnicas paliativas pero éstas son las más utilizadas hoy día. Ésta técnica permite buenos resultados funcionales para el paciente. (Figura 32)

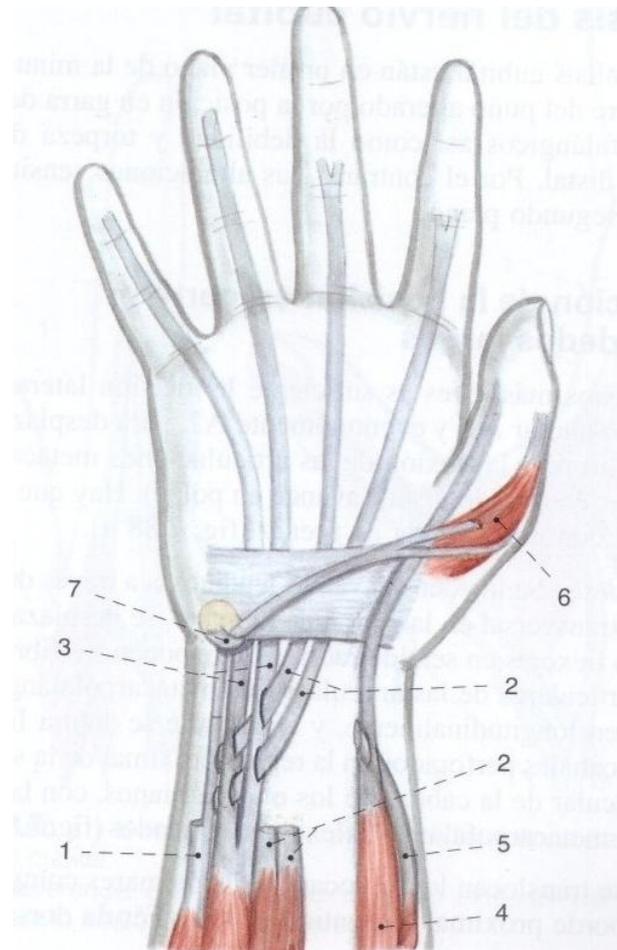


**Figura 32: Recuperación de la extensión digital (MTCF), de la extensión de la muñeca y de la extensión y abducción del pulgar. Servicio C.O.T. Hospital Clínico. Granada. Cortesía Dr. Hernández Cortés.**

### PARALISIS NERVIO MEDIANO:

La parálisis completa del nervio Mediano conlleva la pérdida de la pronación del antebrazo, flexión de la muñeca, flexión de los dedos 1º, 2º y 3º, la oposición del pulgar y la sensibilidad en su territorio de distribución.

En este caso se utilizarían tendones y músculos movilizados por otros nervios diferentes al nervio mediano con el objetivo de permitir la movilidad deficiente de aquellas zonas de la mano paralizadas. Existen muchas posibilidades de transferencia tendinosa y/o muscular con el fin de paliar el déficit motor que presenta el paciente (Figura 33).



**Figura 33. Técnica de Bunnell en una parálisis alta del nervio mediano.**

1. **Tendón del músculo cubital anterior alargado con injerto libre.**
2. **Tendones del flexor superficial del 2º y 3er dedo.**
3. **Tendones del flexor profundo del 4º y 5º dedo.**
4. **Flexor largo del pulgar.**
5. **Segundo radial externo.**
6. **Abductor corto del pulgar.**
7. **Polea (hueso pisiforme).**

Dentro de las transferencias tendinosas como tratamiento paliativo de la parálisis del Mediano habría que destacar la **Oponentoplastia**. Esta técnica consiste en la realización de una o varias transferencias tendinosas con el objetivo de restablecer la oposición del pulgar, que se considera una de las principales pérdidas motoras de la mano. El primer paso necesario para realizar la oponentoplastia, al igual que otra técnica de transferencia tendinosa, es la elección del músculo adecuado, que permita suplir la función perdida. En el caso de la oponentoplastia, la transferencia se hace con el objetivo de que el pulgar pueda adoptar la posición adecuada para permitir la prensión. La fuerza de la pinza es proporcionada por el

*flexor pollicis longus* y el *aductor pollicis*. Si es posible, el músculo con que se realizará la transferencia deberá de ser sinérgico con el músculo al que se reemplaza, esto permitirá que la rehabilitación de aprendizaje para usar ese músculo sea más rápido. Se deberán evitar los músculos reinervados para la realización de una transferencia en el contexto de una lesión nerviosa. Si es posible, se debe usar una unidad de tendón-músculo que permita alcanzar la inserción sin realizar ningún injerto tendinoso, lo cual reducirá sustancialmente la probabilidad de adherencias.

Dentro de estas condiciones citadas, se podrían citar una gran cantidad de unidades musculares para realizar la transferencia tendinosa en la oponentoplastia, sin embargo, varios autores coinciden que el *flexor digitorum superficialis* del 4º dedo y el *extensor carpi ulnaris* ofrecen la mejor combinación de movilidad del pulgar y reemplazo de la pérdida de fuerza tenar.

## PARALISIS NERVIO CUBITAL:

Dependiendo de la zona donde se ubique la lesión nerviosa encontraremos distintos déficits sensitivos y motores. Generalmente, la zona de lesión más frecuente del nervio cubital es a nivel de la muñeca. A ese nivel se produce una parálisis de los músculos intrínsecos inervados por el cubital (cuarto interóseo dorsal, segundo y tercero interóseos volares, músculos hipotenares, lumbricales tercero y cuarto). La atrofia de los músculos inervados por el cubital y la garra de los dedos meñique y anular suelen confirmar la sospecha de parálisis de los músculos inervados por este nervio. Sin embargo, si la lesión se localiza proximal al codo, pueden faltar la garra de estos dos dedos porque la parte del flexor profundo de los dedos que se dirige al anular y al meñique también está denervado.

En el caso de la afectación de este nervio las opciones técnicas paliativas están encauzadas fundamentalmente a:

### 1. Corrección de la posición en garra de los dedos largos.

Se puede conseguir de distintas formas, en los casos más leves, mediante la incisión lateral del ligamento anular A1.

O bien la capsuloplastia de acortamiento de la placa volar MCF del cuarto y quinto dedo, aislada o, generalmente, asociada a la

Operación del lazo de Zancolli, se realiza en los casos más graves. Consiste en seccionar el flexor superficial o sus bandeletas y pasarlas hacia proximal sobre la polea proximal A1 suturándolos sobre el tendón restante.

Transferencia de tendones según Brand, mediante alargamiento del tendón del músculo segundo radial externo con un injerto libre de tendón de cuatro partes. Las bridas se introducen en los espacios interdigitales hasta palmar y se pueden unir a la brida colateral, la vaina de los flexores o con el periostio de la falange proximal.

## **2. Fortalecimiento de la presión distal.**

En el pulgar debe eliminarse la hiperextensión de la articulación metacarpofalángica, con la cual está ligada una mejor extensión de la articulación interfalángica. Esto se puede conseguir mediante una artrodesis de la articulación metacarpofalángica del pulgar.

Además, para mejorar la circunducción se puede realizar una oponentoplastia asociada.

## **3. Separación del meñique.**

Predomina la función del extensor del meñique. Cuando está en hiperextensión la articulación metacarpofalángica del meñique, se desinserta este tendón, se dirige en sentido palmar entre las cabezas del 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> metacarpianos, de forma que quede palmar al ligamento metacarpiano transversal profundo, y se sutura al ligamento anular A1 en la falange proximal del meñique.

## **2. INGENIERÍA TISULAR. MEDICINA REGENERATIVA.**

### **2.1. CONCEPTOS. INTRODUCCIÓN.**

### **2.2. CÉLULAS MADRE.**

A. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

B. CÉLULAS MADRE FETALES

C. CÉLULAS MADRE ADULTAS

### **2.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PROCEDENTES DE LA GRASA**

### **2.4. BIOMATERIALES.**

### **2.5. LA INGENIERÍA TISULAR EN LAS LESIONES DEL NERVIJO PERIFÉRICO.**

### **2.1. CONCEPTOS. INTRODUCCIÓN.**

Una enfermedad infecciosa, genética o degenerativa, o bien, un daño físico, químico o una interrupción del flujo sanguíneo, pueden dar lugar a una pérdida de células de un tejido u órgano. Esta pérdida celular puede conllevar a una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano; y por consiguiente, conducirla al desarrollo de enfermedades o secuelas físicas que merman la calidad vital de la persona. Por tanto, es importante tratar de regenerar y restablecer la función normal de dichos tejidos u órganos. Estos dos objetivos, regeneración y restablecimiento de la función normal de un tejido u órgano dañado, son los fines de la Medicina Regenerativa (Fodor, 2003).

Aproximadamente hace tres décadas nace la **Ingeniería Tisular** como un intento de reparación de órganos y tejidos. El término ingeniería tisular ha sido definido por la *National Science Foundation* como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de tejidos normales y

patológicos para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la actividad de los tejidos u órganos dañados o perdidos.

La Ingeniería Tisular, nos brinda la capacidad de regenerar tejidos del propio paciente a partir de células extraídas del mismo, lo que convierte a esta disciplina en una de las de mayor potencialidad dentro del campo de la medicina regenerativa.

La pérdida de estructura o función de los tejidos y órganos ha supuesto un motivo de preocupación continua que se intenta solventar mediante trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular (Falke y Atala, 2000). Si bien, desde el punto de vista médico, la utilización de órganos para trasplantes ha supuesto una alternativa real para muchos pacientes, en la actualidad esta técnica se ve limitada por el escaso número de donantes. Esta creciente necesidad de órganos, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para la reparación/reconstrucción de órganos y tejidos, tratando al mismo tiempo de solventar el problema inmune asociado a todo trasplante.

La **Medicina Regenerativa** es nueva disciplina que trabaja con una metodología propia e incluye tres campos fundamentales: la Regeneración Tisular Guiada, la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular, cuyas herramientas básicas son células, soportes y señales (Nolan, 2008; Park y cols., 2008; Jayasinghe, 2008; Ikada, 2006).

### **1. Regeneración Tisular Guiada.**

Consiste en la reparación de defectos tisulares utilizando la capacidad de regeneración del propio tejido o de los tejidos circundantes. Normalmente, la regeneración tisular guiada induce el crecimiento y la diferenciación celular mediante la utilización de factores de crecimiento o soportes más o menos activos que incorporen o no diferentes señales moduladoras del proceso de reparación.

### **2. Terapia Celular.**

La terapia celular utiliza la célula como medicamento. En general, las células que se pueden utilizar en terapia celular son de origen autólogo (del propio individuo) o heterólogo (de un donante), pudiéndose aplicar de forma sistémica o local (terapia in situ).

### **3. Ingeniería Tisular.**

La creación de “equivalentes tisulares o constructos” de diseño a medida en el laboratorio es uno de los retos más innovadores y al mismo tiempo más complejos de la medicina actual. La ingeniería tisular, basada en el conocimiento de los

procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario, pretende simular todos los pasos que conducen a la obtención de un tejido vivo, metabólicamente activo, con capacidad de adaptación. Por ello precisa, no sólo disponer de los componentes básicos (las células y las matrices extracelulares), sino además, del conocimiento de los factores a los que este tejido va a estar sometido, como fuerzas biomecánicas, estrés y envejecimiento que, además, han de ir sincronizados con el resto de las estructuras corporales (Ikada, 2006).

En estos momentos, la consecución de tejidos artificiales en laboratorio es una de las metas que permitirán acelerar el proceso de regeneración de los tejidos dañados. Estos tejidos, al ser colocados en el lugar del implante *in vivo*, encontrarán el medio ambiente adecuado para diferenciarse y constituir un tejido definitivo o adulto similar al que se pretende sustituir, como es el caso del tejido nervioso.

En general, la ingeniería tisular utiliza tres fuentes para generar un equivalente tisular: células madre, biomateriales y factores de crecimiento (Ikada, 2006). Por su importancia para el desarrollo de esta tesis doctoral, a continuación expondremos brevemente las dos primeras.

## **2.2. CÉLULAS MADRE.**

En general, se define una célula madre, como toda célula capaz de llevar a cabo la división asimétrica, esto es, una célula madre es capaz de generar otra célula con idénticas características a la célula original (y que permanece como célula madre) y una segunda célula que se diferenciará para originar una célula adulta (Rao y Mattson, 2001). Las principales características de las células madre son la capacidad de autorrenovación y automantenimiento, un escaso nivel de diferenciación y la capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares.

En ocasiones, las células madre pueden sufrir apoptosis y no participar más en desarrollos posteriores. Este es el caso de tejidos como el nervioso donde la renovación de células diferenciadas (neuronas y células gliales) es muy escasa. En otras situaciones, las células madre pueden transdiferenciarse, término referido a las células que no siguen su proceso de diferenciación ortotípico, sino que pueden diferenciarse hacia otros tipos de células adultas (Marañés, 2010; Thowfeequ *et al*, 2007). La capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, se denomina plasticidad (Bianchi y cols., 2001).

El número de células madre y el proceso de diferenciación están regulados según las demandas de cada momento, manteniéndose una cantidad adecuada de células precursoras indiferenciadas y de progenie diferenciada. Además, las células precursoras indiferenciadas que resulten de los procesos de división, pueden

permanecer quiescentes hasta estadios tardíos del desarrollo o estar disponibles para situaciones de estrés (Rao y Mattson, 2001).

Atendiendo a su origen, las células madre se pueden clasificar en células embrionarias, fetales y células adultas.

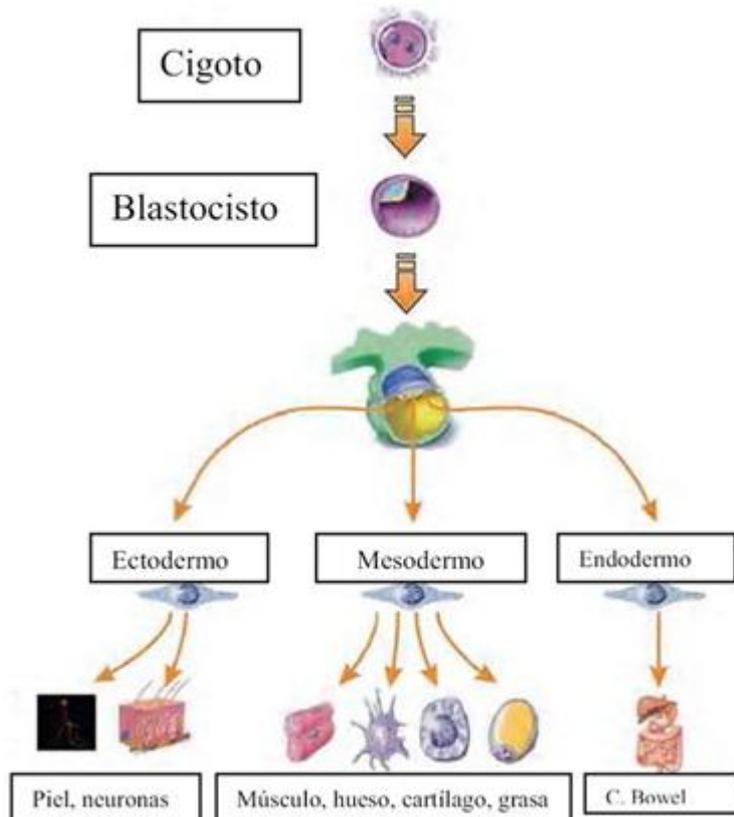
## **A. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.**

El encuentro del material genético paterno y materno durante el proceso de fecundación, se continúa con una serie regulada de divisiones mitóticas denominadas segmentación, formándose un número cada vez mayor de células denominadas blastómeros, las cuales poseen peculiaridades que las hacen singulares. Desde el punto de vista morfológico, estos blastómeros no van acompañados de crecimiento, sino que cada vez se convierten en células de menor tamaño. Sin embargo, estas células, al igual que el cigoto del cual proceden (figura 34), son totipotenciales, es decir, poseen todas las capacidades para originar el desarrollo embrionario completo (embrión y cubiertas). En la especie humana, después de la tercera división mitótica (estadio de 8 a 12 células), las divisiones se vuelven asincrónicas y las células se transforman en pluripotenciales, formando una masa compacta de 32 a 128 células llamada mórula.

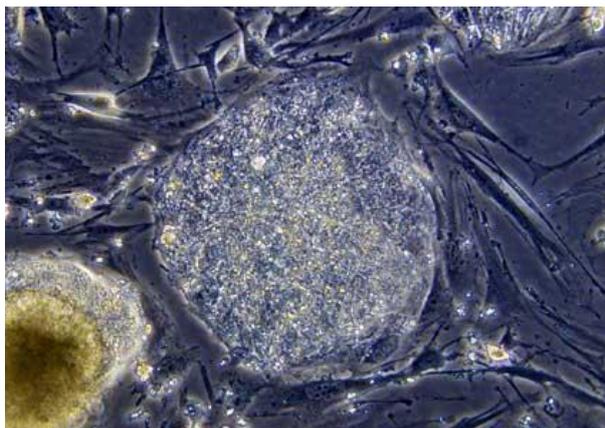
Conforme la mórula avanza a lo largo de la trompa de Falopio, las células continúan dividiéndose, formándose una esfera hueca llamada blastocisto, en cuya pared podemos distinguir “trofoblasto” y “embrioblasto”. Las células de la masa celular interna del blastocisto (embrioblasto) son células madre pluripotentes (Stocum, 2001) ya que pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células y tejidos que constituyen un organismo adulto, pero no se consideran totipotenciales pues carecen de la capacidad de originar tanto membranas extraembrionarias como de contribuir a la formación de la placenta, función que asume el trofoblasto. Estas células procedentes de la masa celular interna del blastocisto han sido utilizadas por distintos autores para la generación de líneas de células madre embrionarias, las cuales están sometidas a numerosos problemas de carácter ético y legal.

Para conseguir la propagación *ex vivo* de las células madre embrionarias (figura 35) y para mantenerlas en estado indiferenciado, son indispensables la presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y una lámina sustento de fibroblastos murinos (Williams y cols., 1998). La diferenciación *ex vivo* de células madre embrionarias humanas, se puede lograr tras la retirada del LIF o de la capa de sustento de fibroblastos. Seguidamente, se inicia la formación de agregados en suspensión que se denominan cuerpos embrionarios. La formación de cuerpos

embrionarios también sucede si no se utilizan frascos de cultivo adherentes en los que se favorezca una suspensión celular. Los cuerpos embrionarios son capaces de dar lugar a tipos celulares de las tres líneas germinales (Sadiq y Gerber, 2004), y se componen de células diferenciadas y precursoras provenientes de diversas líneas distribuidas al azar, que se parecen a embriones postimplante precoces (Henningson y cols., 2003).



**Figura 34. Esquema del desarrollo desde cigoto hasta célula adulta madura (neurona, músculo, hueso...)**



**Figura 35. Cultivo de células madre embrionarias rodeadas de fibroblastos. 20X**

**(Yaich LE, 2007)**

### **C. CÉLULAS MADRE FETALES.**

Diversos estudios han demostrado que el feto es una fuente importante de células madre, aunque son numerosos los problemas éticos y legales que se asocian a su uso. Entre otras, en el feto existen numerosos tipos de células multipotenciales, destacando, por ejemplo, las de la médula ósea, que pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas, así como células unipotenciales, desconociéndose hasta la fecha la existencia de células pluripotenciales fetales (Ciriza *et al*, 2010; Androutsellis-Theotokis *et al*, 2010).

### **D. CÉLULAS MADRE ADULTAS.**

Las células madre adultas son aquéllas que proceden de un individuo adulto, incluyendo el niño y el recién nacido. Estas células residen en nichos específicos o compartimentos tisulares, cuya función es el mantenimiento de la integridad tisular (Vats y cols., 2002). Se consideran además, directamente implicadas en la reparación tisular ante una agresión o lesión, siendo las encargadas de la regeneración de cada uno de los tejidos existentes en un organismo adulto.

En general, las células madre adultas presentan capacidad de diferenciación hacia un único tipo celular diferenciado (células madre **unipotenciales**) o hacia diferentes tipos celulares pertenecientes a una misma familia de células procedentes de la misma hoja embrionaria (células madre **multipotenciales**). Sin embargo, estudios recientes demostraron que algunas células adultas pueden comportarse en determinadas circunstancias como células madre **pluripotenciales** mediante el proceso conocido como **transdiferenciación** (Thowfeequ *et al*, 2007).

Los fenómenos de reparación tisular implican el reemplazo de los tipos celulares dañados con el fin de reponer otras células que permitan mantener la función e histoarquitectura tisular. Existen tres teorías para explicar los fenómenos de reparación tisular en los individuos adultos:

1) **Teoría de la desdiferenciación.**

Propuesta en 1971 por Toole y Gross, en base a los estudios realizados en anfibios para explicar la regeneración completa de una extremidad tras su pérdida traumática. Estos autores afirman que esta regeneración completa ocurre por un proceso de desdiferenciación de las células presentes en el tejido dañado. Esta teoría partía de la base de la no existencia de las células madre dentro de los tejidos adultos o de su no participación dentro de los procesos de reparación tisular. Las células diferenciadas dañadas durante el trauma inicial, revierten a un estado indiferenciado más primitivo antes de su proliferación y posterior rediferenciación para restaurar los tejidos perdidos (Stocum, 1998; Tsai y cols., 2002).

2) **Teoría de la transdiferenciación.**

Esta teoría ofrece una explicación alternativa. Propone que cada tejido en el individuo adulto contiene un único tipo de células madre específicas cuya función se limita al mantenimiento y reparación del tejido en el que residen (Donovan y Gearhart., 2001). La transdiferenciación ocurre durante la reparación tisular cuando las células progenitoras tisulares específicas derivadas de un órgano, son “reprogramadas” para formar tejidos de otro órgano (Forbes y cols., 2002; Poulsom y cols., 2002).

La mayoría de los autores, sin embargo, consideran que el término transdiferenciación debería reservarse para aquellas células adultas que, en un momento dado, son capaces de diferenciarse hacia células adultas de distinta estirpe sin necesidad de pasar por un estadio intermedio indiferenciado (Thowfeequ *et al*, 2007).

3) **Activación de células quiescentes precursoras de reserva.**

Propone que existen poblaciones precursoras de reserva en los compartimentos tisulares conectivos y que estas poblaciones están formadas por: células progenitoras tisulares específicas, células madre de línea germinal y células madre pluripotenciales.

a) **Células progenitoras tisulares específicas.**

Se ha postulado que estas células residen en los tejidos del cuerpo y que están implicadas en el mantenimiento “rutinario” de esos tejidos. Ejemplos característicos de ello son las células epiteliales basales de la mucosa gastrointestinal (Bjerknes y Cheng, 2002), las células satélite del músculo estriado (Grounds y cols., 1992; Beauchamp y cols., 2000), así como las células epiteliales de la capa basal de la epidermis. Por otra parte, sugiere que las otras dos poblaciones de los compartimentos tisulares (células madre pluripotenciales y células madre de línea germinativa), experimentarían activación, proliferación y diferenciación para colaborar con las células progenitoras tisulares cuando fuera necesario, en la restauración o reemplazo de los tejidos perdidos o dañados (Young, 2004).

En particular, estos últimos autores, han desarrollado durante años y hasta la actualidad, diferentes trabajos para demostrar la existencia de células madre pluripotenciales y células madre de línea germinativa dentro de los tejidos (figura 36). En estos trabajos se apoyan los fundamentos de esta tercera teoría.

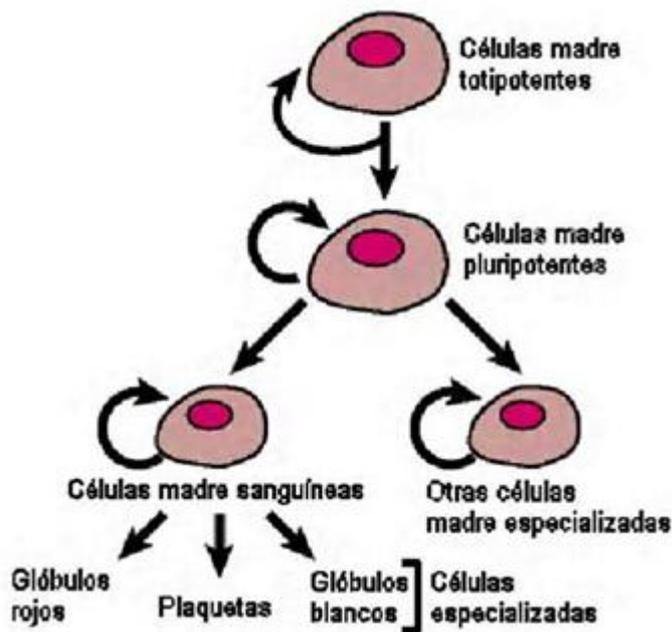
#### **b) Células madre de línea germinal.**

Diversos estudios sugieren la presencia de una población de células madre de línea germinal en los tejidos humanos. Estas células se propagan más de 200 veces sin perder el potencial de diferenciación (Young, 2000; Young y cols., 2001a y b), permanecen quiescentes en medio sin suero y en ausencia de factor inhibidor de leucemia (LIF), no expresan marcadores de célula madre embrionaria como el antígeno específico del estado embrionario, antígeno carcinoembrionario o molécula de adhesión carcinoembrionaria y, en presencia de factores proliferantes, muestran inhibición por contacto en la confluencia y un cese de la proliferación cuando una única capa de células cubre la superficie de cultivo (Young y cols., 2001a).

#### **c) Las células madre pluripotenciales derivadas de tejidos adultos mesenquimales humanos (células madre mesenquimales o MSC).**

Se diferencian de las anteriores en que expresan marcadores de célula madre indiferenciada y generan tipos celulares de las tres líneas germinales (Young y cols., 2004b). Cuando el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células pluripotenciales para restaurar el estado tisular previo a la lesión (Weissman y cols., 2001) (figura 36).

Finalmente, estos autores proponen que la activación de células quiescentes precursoras, junto con la desdiferenciación y la transdiferenciación, podrán dar una explicación a los procesos de reparación tisular (Young y cols., 2004b).



**Figura 36: Esquema de diferenciación desde célula madre totipotenciales, pluripotenciales, células madre específicas de un órgano hasta células maduras en el tejido sanguíneo (Glóbulos blancos, hematíes, plaquetas)**

### 2.3. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

La generación de tejidos artificiales requiere células con potencialidad y proliferación alta y que sean accesibles como lo son las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADSC) (De Ugarte *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2006; Schäffler y Büchler, 2007), que son las células que utilizaremos como fuente de células troncales en la presente tesis doctoral. En este apartado describiremos sucesivamente el tejido adiposo y las características fundamentales de las ADSC existentes en su seno.

#### TEJIDO ADIPOSO COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

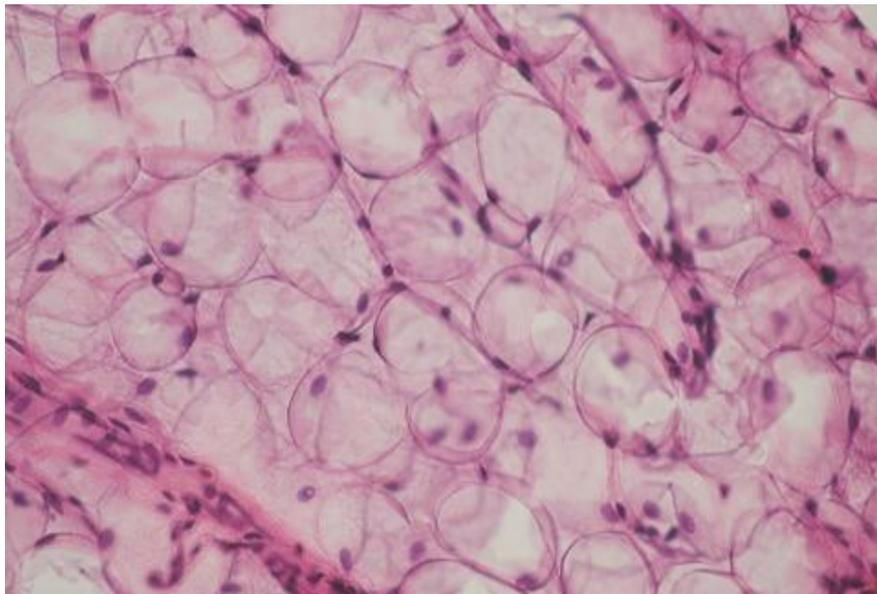
El tejido adiposo es una forma especializada de tejido conectivo que tiene una función importante en la homeostasis energética. En todo el tejido conjuntivo laxo aparecen células adiposas (adipocitos) individuales o reunidas en grupos. El tejido en el que los adipocitos constituyen el tipo celular primario recibe el nombre de tejido adiposo.

Las células adiposas tienen como función principal almacenar sustancias lipídicas de reserva. Los elementos celulares asociados al tejido adiposo lo conforman predipocitos, fibroblastos, células de tejido muscular liso, células

endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos, así como una fuente no bien conocida de células madre mesenquimales indiferenciadas denominadas ADSC (Caspar- Bauguil *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2003).

Existen dos clases de tejido adiposo, el tejido adiposo unilocular o grasa amarilla, cuyas células poseen una sola gota de lípidos almacenados, es la variedad más común. La segunda variedad que es menos frecuente tanto en distribución como en cantidad, es el tejido adiposo multilocular o grasa parda que se encuentra de manera particular en el recién nacido. Las células adiposas uniloculares del tejido adiposo amarillo son muy grandes, aproximadamente tienen una dimensión de más de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro a causa de la gran cantidad de lípidos que acumulan. A veces, es posible encontrar pequeñas gotas de lípidos en la porción engrosada del citoplasma, susceptible también a poseer glucógeno. El lípido que se encuentra en la gran vacuola central se halla compuesto sobre todo por una mezcla de glicéridos de ácidos grasos (Figura 37).

El tejido adiposo unilocular se divide en lóbulos poco definidos por medio de tabiques de tejido conectivo. Con la excepción de estos tabiques interlobulares, el estroma está compuesto sobre todo por delicadas fibras de reticulina que también forman íntimas mallas que rodean a los capilares. La grasa blanca ha sido considerada en general como un tejido escasamente vascularizado. Sin embargo, cada célula adiposa, se halla en contacto por lo menos con un capilar.

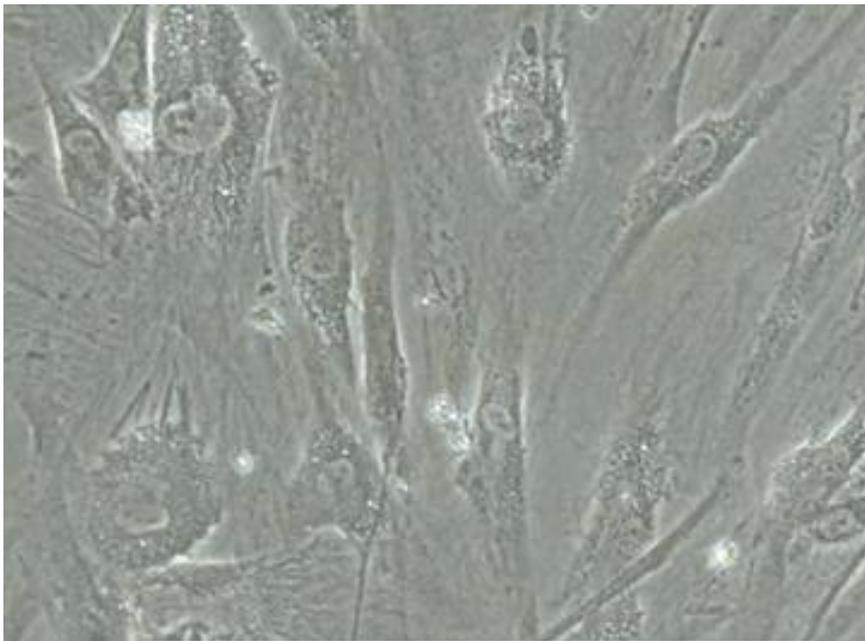


**Figura 37.**  
**Imagen**  
**histológica de**  
**tejido adiposo.**  
**Adipocitos**  
**uniloculares**  
**con gran**  
**vacuola**  
**central de**  
**grasa.**

Las células de grasa son células totalmente diferenciadas y no tienen división mitótica. Las nuevas células de grasa, en consecuencia, que se desarrollen en un

momento dado en el interior del tejido conectivo, son resultado de la diferenciación de células más primitivas. Aunque las células de grasa, antes que acumulen lípido se asemejan a fibroblastos, es probable que provengan directamente de células mesenquimales indiferenciadas que se encuentran en su seno. El tejido adiposo, por tanto, se renueva a partir de células troncales mesenquimales existentes en el mismo y, según distintos autores, se considera dicho tejido como posible fuente importante de células troncales para la ingeniería tisular.

Según Matsumoto, el tejido adiposo también contiene un grupo de células llamado fracción vascular estromal (FVE), que puede aislarse por medio de centrifugación con previa digestión enzimática en colagenasa (Matsumoto *et al.*, 2008) (Figura 38).



**Figura 38. Cultivos celulares bidimensionales de células madre de la grasa, 20x.**

Así mismo, Schäffler y Büchler sugieren que la FVE contiene varias poblaciones celulares, entre las cuales figuran poblaciones de células troncales mesenquimales multipotentes y pluripotentes (ADSC) (Schäffler y Büchler, 2007).

## E. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ADSC)

La obtención de las células madre procedentes de la grasa (ADSC: adipose derived stem cell) es relativamente sencilla debido a que pueden utilizarse procedimientos quirúrgicos simples con anestesia local (Schäffler y Büchler, 2007). Mediante liposucción pueden llegar a obtenerse poblaciones celulares mayores de 100 millones en 250 a 500 ml por procedimiento (De Ugarte *et al.*, 2003). (Figura 39)



**Figura 39: Izquierda: esquema representativo de la técnica de liposucción. Derecha: imagen intraoperatoria de una liposucción abdominal en una mujer. Hospital ASISA La inmaculada. Cortesía Dr. Lara García.**

Por estas razones, las ADSC son una de las fuentes celulares autólogas más prometedoras para su utilización en medicina regenerativa (Oedayrajsingh –Varma *et al.*, 2006; Casteilla *et al.*, 2005).

Hasta el momento, las ADSC han sido diferenciadas a varios tipos de tejidos en modelos bidimensionales que incluyen la diferenciación de ADSC a cartílago (Wei *et al.*, 2007), tejido adiposo (Yoshimura *et al.*, 2008), hueso (Weinzierl *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005) y neuronas (Lin *et al.*, 2008).

Nuestro grupo de investigación (Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada), ha desarrollado recientemente un novedoso biomaterial compuesto por fibrina humana y agarosa (Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009; Alaminos *et al.*, 2006 y 2007), que ha sido utilizado con éxito para generar córneas y mucosa oral humanas, utilizando células epiteliales y del tejido conectivo. Dichas células han mostrado adecuados índices de adhesión y diferenciación en estos biomateriales. Además, recientemente se demostró que las células ADSC podían

transdiferenciarse a adipocitos, osteocitos, condrocitos e incluso neuronas tanto en un modelo bidimensional como en **matrices tridimensionales de fibrina-agarosa** (Nieto-Aguilar *et al.*, 2010).

La utilización de este modelo generado mediante ingeniería tisular, podría tener importantes aplicaciones en el ámbito de la estomatología, cirugía ortopédica, cirugía plástica y reparadora y cirugía maxilofacial.

## **2.4. BIOMATERIALES**

Los biomateriales son compuestos de origen natural o sintético, sólidos o líquidos, que se utilizan en dispositivos médicos o en contacto con sistemas biológicos. En general, los biomateriales son sustancias farmacológicamente inertes utilizadas para ser incorporadas o implantadas dentro de un sistema vivo para reemplazar o restaurar alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales o tejidos humanos. Los biomateriales, como campo de estudio, han experimentado un crecimiento constante en aproximadamente medio siglo de existencia y se utilizan, entre otros, en medicina, biología, química e ingeniería. La generación de nuevos biomateriales para su aplicación en medicina es un proceso multidisciplinar en el que convergen los principios del diseño, de la física, la química, la ingeniería industrial, la ingeniería química y las ciencias de los materiales (Grodzinski *et al.*, 2006).

En ingeniería tisular, la generación de tejidos artificiales de naturaleza conectiva como hueso, cartílago, dermis, lámina propia de la mucosa oral, etc., requiere la utilización de algún tipo de material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo (Ma *et al.*, 2005). Para ello se utilizan varios tipos de biomateriales. La función de estos en ingeniería tisular es la de actuar de manera similar a la matriz extracelular natural. Esto es, promover la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis de las células. Generalmente, las matrices extracelulares para la generación de tejidos por ingeniería tisular están compuestas por diferentes tipos de biomateriales. Estos compuestos deben cumplir ciertos requisitos básicos, entre ellos:

- 1. Ausencia de toxicidad**
- 2. Biocompatibilidad**
- 3. Ausencia de potencial carcinogénico**
- 4. Tolerancia a la esterilización** previa a su uso.

5. Deben contar con **propiedades mecánicas** como la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad; que permitan fabricar diferentes

formas o estructuras tridimensionales sólidas (Yang *et al.*, 2001; Hutmacher *et al.*, 2001).

6. Deben **permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento** (Walgenbach *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2007).

7. Deberán de servir de **vehículo** para transportar las células utilizadas como fuente de obtención al sitio del tejido afectado (Walgenbach *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2007).

Los biomateriales de uso en ingeniería tisular se dividen en tres grupos principalmente: Biogénicos o biológicos; sintéticos y semisintéticos.

Los materiales **biogénicos** incluyen matrices acelulares como: colágeno, alginato, agarosa, glicosaminoglicanos y fibrina (Saadeh *et al.*, 2001; Bumgardner *et al.*, 2003; Seol *et al.*, 2004; Solchaga *et al.*, 2002;). Los **sintéticos** incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, poli dimetil- siloxano, los de tipo aromático con base de poli – éter como el poliuretano termoplástico, poli etileno-tereftalato, poli etileno-tetrafluorado, poli vinilideno-fluorado y varios hidrogeles . (Neuss *et al.*, 2008; Ishaug *et al.*, 1997; Behravesch *et al.*, 1999;) Finalmente, los materiales **semisintéticos** son una combinación de materiales biogénicos y de polímeros sintéticos (Munirah *et al.*, 2008).

Además, atendiendo a su estructura, los principales biomateriales para uso en ingeniería tisular pueden clasificarse como fibrosos, poliméricos y mixtos:

a.- **Biomateriales fibrosos.** Los biomateriales fibrosos más conocidos son, probablemente, el colágeno y la fibrina.

El **colágeno tipo I** es un biomaterial fibroso soluble en medios ácidos que es sintetizado fundamentalmente por los fibroblastos y que constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular del tejido conjuntivo. Por este motivo, este biomaterial es perfectamente biocompatible y permite el crecimiento celular tanto en su interior como en su superficie. Los geles de colágeno tipo I, polimerizables mediante la adición de sustancias tampón de pH alto, se han utilizado con gran frecuencia en el campo de la oftalmología, la dermatología y la odontología (Reichl y Muller-Goymann, 2003).

La **fibrina** es un producto generado a partir del fibrinógeno, componente muy abundante en el plasma sanguíneo y responsable de la generación del coágulo sanguíneo. Por ello, la posibilidad de obtener este producto con carácter autólogo y su biocompatibilidad hacen que este biomaterial se haya utilizado con frecuencia en

biomedicina, especialmente, para la generación de piel artificial para uso en dermatología y en cirugía plástica (Meana *et al.*, 1998; Llames *et al.*, 2006).

b.- **Biomateriales poliméricos**. Los más conocidos son aquéllos que constan de largas cadenas de monómeros de hidratos de carbono como la glucosa. Algunos de ellos son:

- La **agarosa**, obtenida a partir de la pared de ciertas algas marinas del grupo *Rhodophyceae*, sobre todo *Gracillaria sp.* y *Gellidium sp.*, utilizada en ingeniería tisular en el campo de la traumatología (Stevens *et al.*, 2005).

- La **gelatina**, fácil de purificar a partir de ciertos tejidos animales.

- El **quitosán**, biomaterial obtenido a partir de la quitina existente en el exoesqueleto de los crustáceos marinos tales como los cangrejos o las gambas. Aunque permiten el crecimiento celular en su interior, el distante origen filogenético de los artrópodos hace que en ocasiones se comporte como un biomaterial de difícil biointegración en seres humanos.

- Otros biomateriales como el **ácido hialurónico o el alginato**, que aunque son biocompatibles, son degradados por el organismo tras un periodo de tiempo más o menos largo, aunque esta degradación no es enzimática (no existen enzimas en el organismo que sean capaces de degradar directamente estos polímeros).

c.- **Biomateriales mixtos**. La combinación de diferentes tipos de biomateriales permite controlar algunos de los problemas asociados a cada uno de ellos. Entre las diferentes combinaciones existentes, los biomateriales mixtos de fibrina y agarosa han demostrado su utilidad en la generación de tejidos humanos artificiales para su posible uso clínico en oftalmología, odontología y cirugía maxilofacial (Alaminos *et al.*, 2006, 2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009 (1) y 2009 (2); González-Andrades *et al.*, 2009; Serrato *et al.*, 2009; Ionescu *et al.*, 2010).

## 2.5. LA INGENIERÍA TISULAR EN LAS LESIONES NERVIOSAS PERIFÉRICAS.

Las lesiones del nervio periférico, a menudo, requieren, como explicamos previamente, el uso de injertos nerviosos autólogos que se asocian a comorbilidad de la zona donante y que están limitados respecto a la cantidad de injerto del que disponemos. Por tanto, varios autores entre los que nos encontramos el Grupo de Ingeniería Tisular, están desarrollando estrategias alternativas para crear y

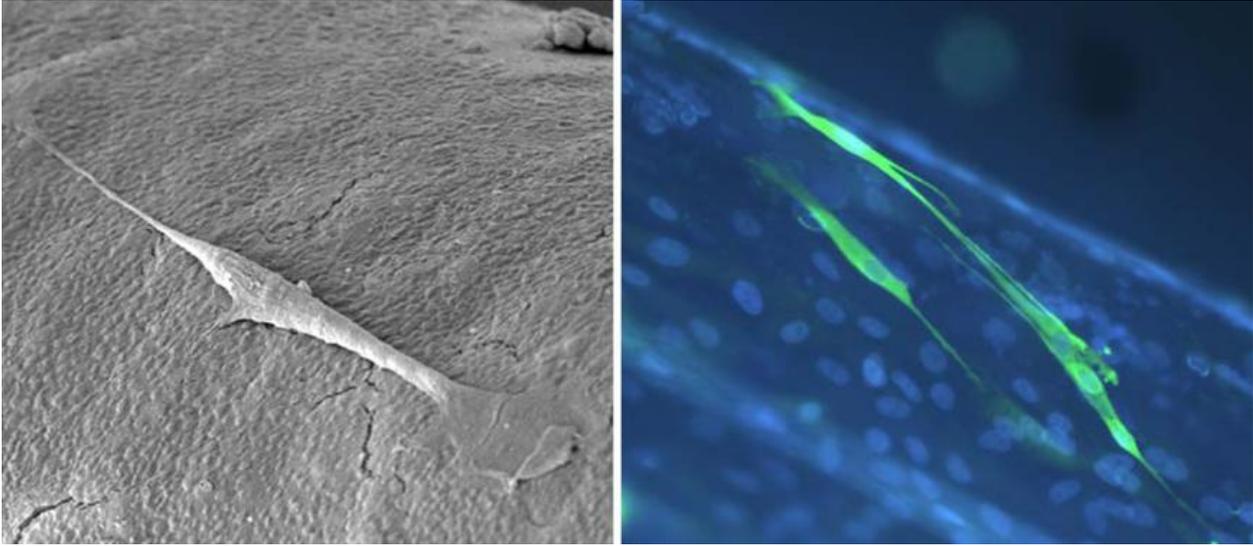
desarrollar nuevos implantes basándose en el auge de la Ingeniería Tisular (Di Summa *et al*, 2010).

Se han realizado varios intentos de generar conductos de materiales biodegradables que permitan la regeneración axonal sin interferir en el proceso de crecimiento y maduración (Mohanna *et al*, 2005).

Di Summa y colaboradores han realizado recientemente un estudio en el que han comparado conductos sintéticos realizados a partir de fibrina en cuyo interior contiene células de Schwann obtenidas de un cultivo celular procedente de nervio ciático con el mismo conducto, pero que contiene en este caso, células madre procedentes de la grasa y de la médula osea diferenciadas a células de Schwann. Los mejores parámetros de regeneración fueron obtenidos con los conductos nerviosos combinados con el cultivo de células de Schwann, sin embargo, los resultados con célula madre diferenciadas fueron significativamente peores. Por otro lado, los autores concluyen que los conductos que contenían células de Schwann procedentes de la diferenciación de células madre procedentes de la grasa o de la médula osea tienen unos valores mejores en los parámetros de regeneración axonal que el conducto nervioso sin nada en su interior (Di Summa *et al*, 2010).

Las ADSC pueden diferenciarse a células de Schwann-like presentando una morfología, un fenotipo y características funcionales iguales a las células de Schwann primarias, por tanto, las ADSC podrían sustituir a las células de Schwann como componente de los conductos nerviosos sintéticos desarrollados mediante ingeniería tisular (Jiang *et al*, 2008).

No sólo hay diversidad en el contenido de conducto nervioso, sino también existe en la composición y estructura tridimensional de los conductos. Siguiendo la teoría de Weiss, muchos autores han desarrollado constructos tridimensionales que favorezcan el contacto entre ambos extremos del nervio lesionado (Weiss, 1944). Se han desarrollado constructos a partir de fibra de vidrio (Figura 40) (Bunting *et al*, 2005), quitosan/ácido poliglicólico (Jiao *et al*, 2009), Silicona (Kim *et al*, 2007), Keratina (Apel *et al*, 2008) y otros materiales más comunes como Colágeno.



***Figura 40: Izquierda: Célula de Schwann adherida a fibra de vidrio. Derecha: Célula de Schwann adherida a fibra de vidrio. Inmunotinción S100 positiva. (Bunting et al, 2005)***

## OBJETIVOS.

# OBJETIVOS.

## OBJETIVO GENERAL:

Demostrar la utilidad terapéutica de un nuevo modelo de conducto nervioso desarrollado mediante ingeniería tisular a partir de células mesenquimales del tejido adiposo (ADSC) y biomateriales de fibrina-agarosa en un modelo experimental de lesión nerviosa periférica con defecto nervioso crítico de un centímetro.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Establecer un **modelo experimental de lesión de nervio periférico en el que exista un defecto nervioso** que impida la reparación directa en animales de laboratorio, útil para la evaluación de protocolos de ingeniería tisular y medicina regenerativa.
- 2.- Generar distintos tipos de **conductos neurales** elaborados mediante **técnicas de ingeniería tisular con biomateriales de fibrina y agarosa y con células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSC)** para tratar lesiones nerviosas en modelos experimentales.
- 3.- **Evaluar los resultados clínicos y funcionales** de la aplicación de la ingeniería tisular del nervio periférico mediante estudios neurofisiológicos y estudios de comportamiento y motricidad estandarizados para las lesiones periféricas en el modelo animal escogido.
- 4.- **Evaluar los resultados histológicos e inmunohistoquímicos** de la aplicación de la ingeniería tisular del nervio periférico mediante estudios de regeneración nerviosa estandarizados para las lesiones periféricas en el modelo animal escogido.

# MATERIALES Y MÉTODOS.

# MATERIALES Y MÉTODOS.

## TIPO DE ESTUDIO.

Estudio experimental aleatorizado y controlado.

## SUJETOS DE ESTUDIO.

En este trabajo se utilizaron 50 ratas de la raza Wistar (*Ratus ratus*) de 250–300 g de peso con 12 semanas de edad. Todos los animales se han adquirido del Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada y se mantuvieron en los estabularios disponibles en el Departamento de Cirugía y sus Especialidades de la Universidad de Granada y en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Licinio de la Fuente) siguiendo todos los protocolos de bienestar animal y la legislación vigente al respecto.

## GENERACIÓN DE UN MODELO DE LESIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.

En todos los animales, se procedió a generar una lesión del nervio ciático izquierdo bajo anestesia general. En cuanto a la técnica anestésica, se utilizó el siguiente protocolo:

- Atropina subcutánea 0,05 mg por kg peso de la rata.
- Acepromacina 1 mg intraperitoneal por kg peso de la rata.
- Ketamina 150 mg intraperitoneal por kg peso de la rata.

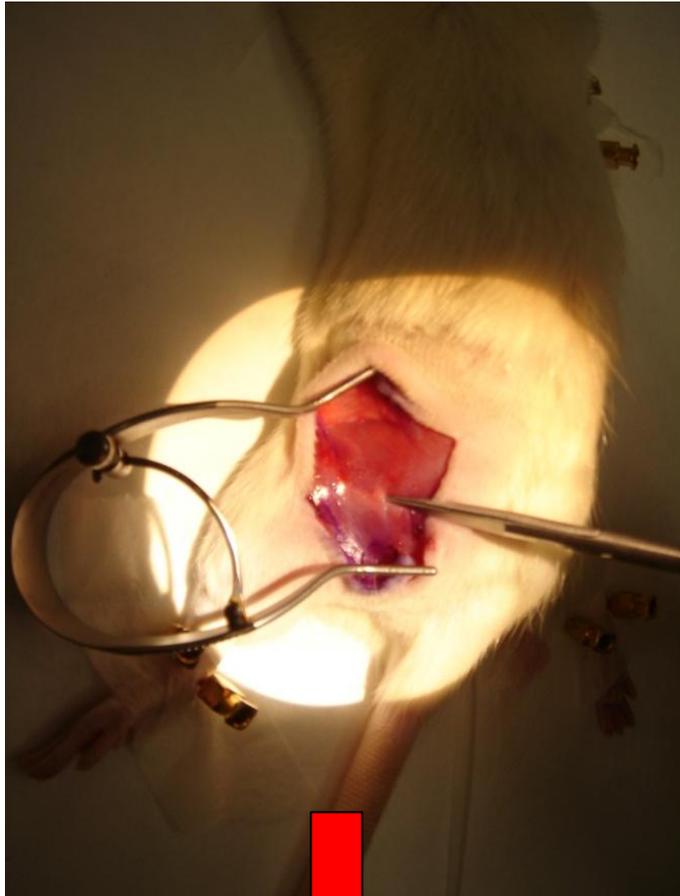
Una vez anestesiados, a cada animal se le realizó un abordaje lateral del fémur, abordándose a través del septo intermuscular entre bíceps y cuádriceps, exponiéndose el fémur e, inmediatamente debajo, el nervio ciático. A continuación, se generó un defecto del nervio proximal a la ramificación del nervio ciático al grupo muscular *gastrocnemius*, y aproximadamente a un centímetro distal a la salida de la raíz de la escotadura ciática coincidiendo, en la mayoría de casos, con el tercio medio de la diáfisis del fémur (figura 40). De este modo, en todos los animales se extirpó un segmento de nervio ciático de aproximadamente 1 cm de longitud.

Tras el daño neurológico, todos los animales fueron sometidos a estrictos cuidados postoperatorios, incluyendo analgesia, desde el mismo momento en que se produce la lesión traumática hasta el momento de ser sacrificadas.

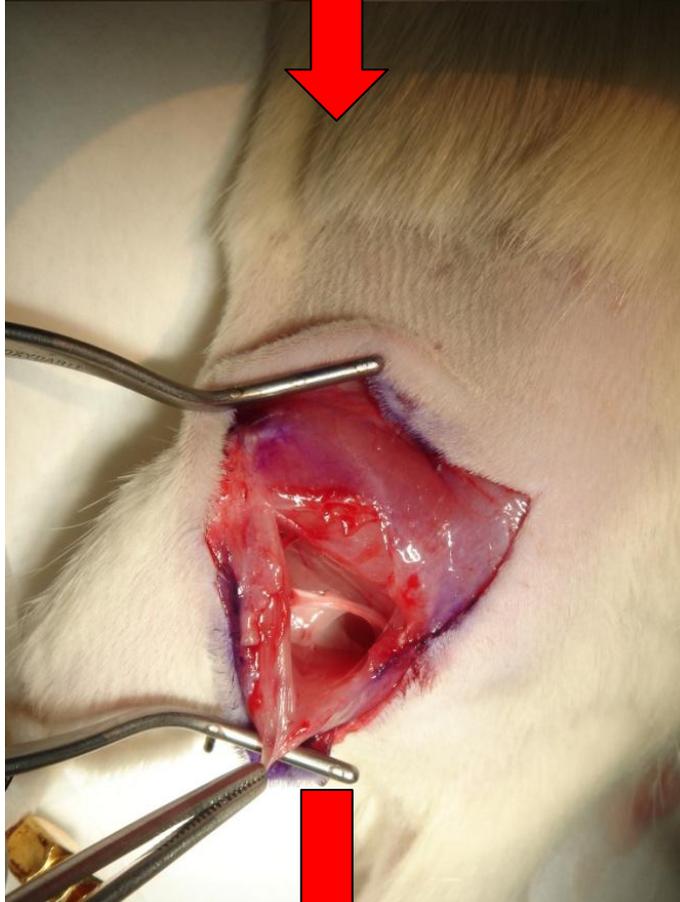


**Figura 40: Técnica quirúrgica para el abordaje del nervio ciático de la rata.**

- 1. Incisión en “palo de golf” paralela a la diáfisis femoral izquierda con inclinación caudal en el eje de la rodilla homolateral.**



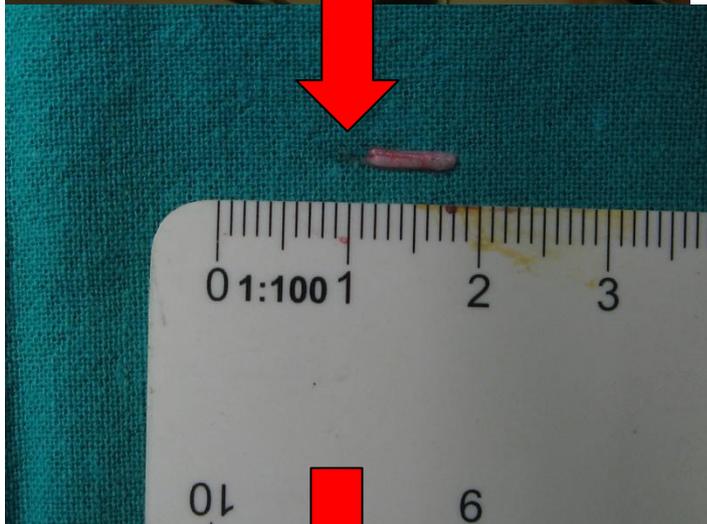
**2. Separación de la piel de la rata. Punta de la tijera marca el septo intermuscular entre Cuadriceps y Bíceps femoral. Se realiza disección con tijeras separando los vientres musculares.**



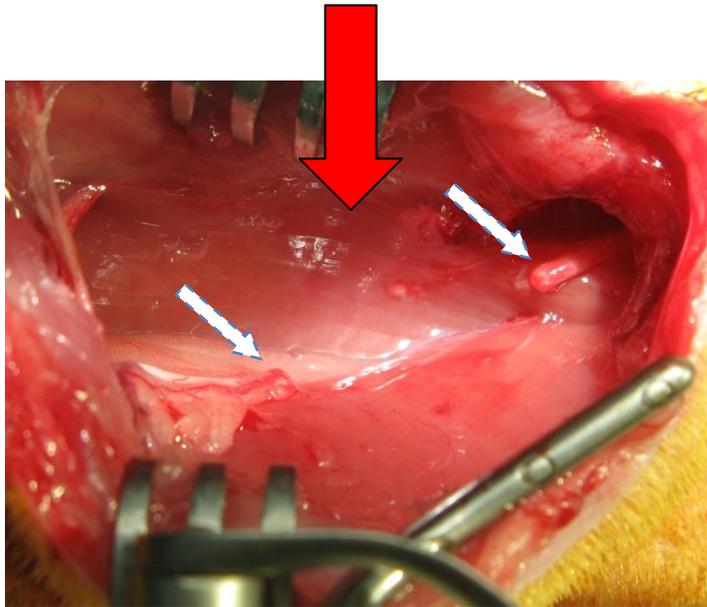
**3. Exposición del nervio ciático de la rata entre el cuádriceps (arriba) y el bíceps femoral (abajo).**



**4. Exposición completa del nervio ciático con separación del tronco nervioso de los tejidos circundantes. División de la porción del nervio ciático en su porción caudal en ramas motoras y sensitivas que se dirigen a la porción distal de la pata.**



**5. Comprobación de la extirpación de un centímetro de nervio ciático. Imagen posterior a la retracción que sufre el nervio una vez seccionado totalmente.**



**6. Exposición de los cabos (flechas) del nervio seccionado una vez realizada la extirpación de 1 cm de nervio. Detalle de la retracción de los cabos que hace que el defecto resultante sea superior a 1 cm.**

## GRUPOS DE ESTUDIO

En la presente Tesis Doctoral se consideraron 4 grupos de experimentación, según el tipo de tratamiento aplicado tras la generación de la lesión nerviosa periférica:

Grupo 0 (CONTROL 1). Lesión del nervio ciático sin gesto de reparación quirúrgica (n=4).

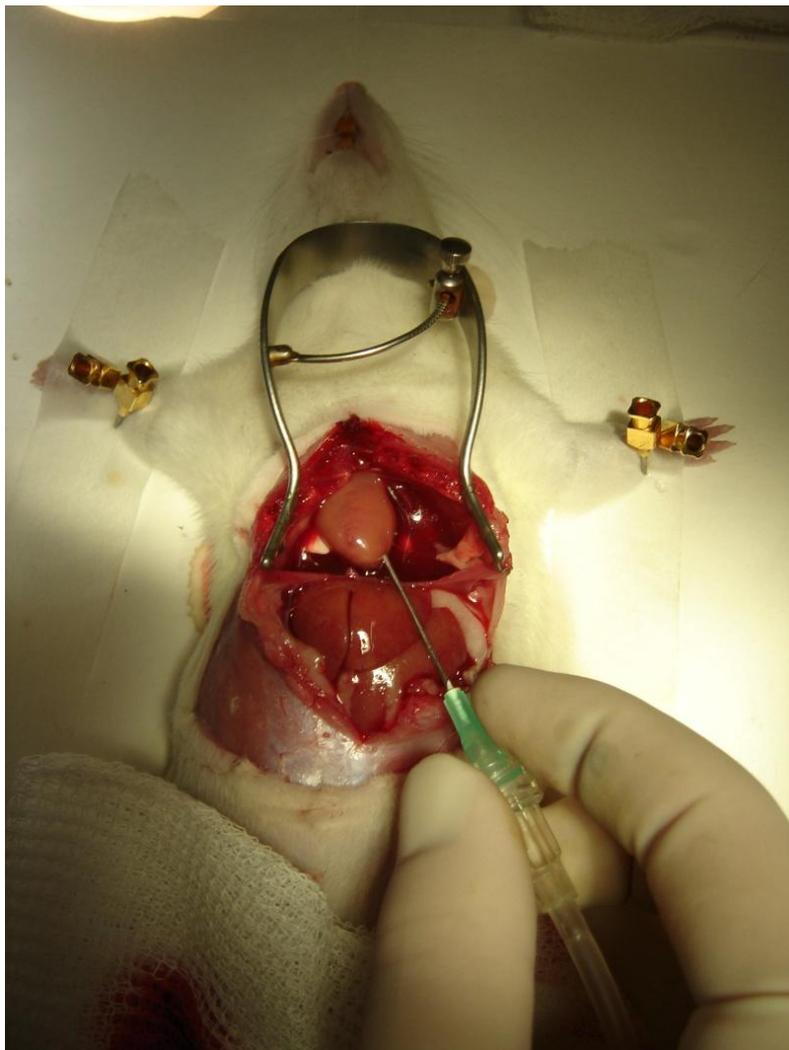
Grupo 1 (CONTROL 2). Lesión del nervio ciático y reparación microquirúrgica mediante un tubo de colágeno relleno de suero heparinizado suturado a ambos extremos del defecto (n=12).

Grupo 2. Lesión del nervio ciático y reparación microquirúrgica mediante un tubo de colágeno relleno de biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa suturado a ambos extremos del defecto (n=11).

Grupo 3. Lesión del nervio ciático y reparación microquirúrgica mediante un tubo de colágeno relleno de células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSC) inmersas en biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa suturado a ambos extremos del defecto nervioso (n=10).

Grupo 4. Animales de experimentación que se utilizaron para conocer los valores de movilidad espontánea y que se utilizaron como controles. De forma, que hubo un grupo de 4 animales que fueron sometidos a estudios de actividad motora espontánea con el objetivo de conocer los valores basales de movilidad, que posteriormente servirían para ser comparados con los obtenidos en los demás grupos (n=4).

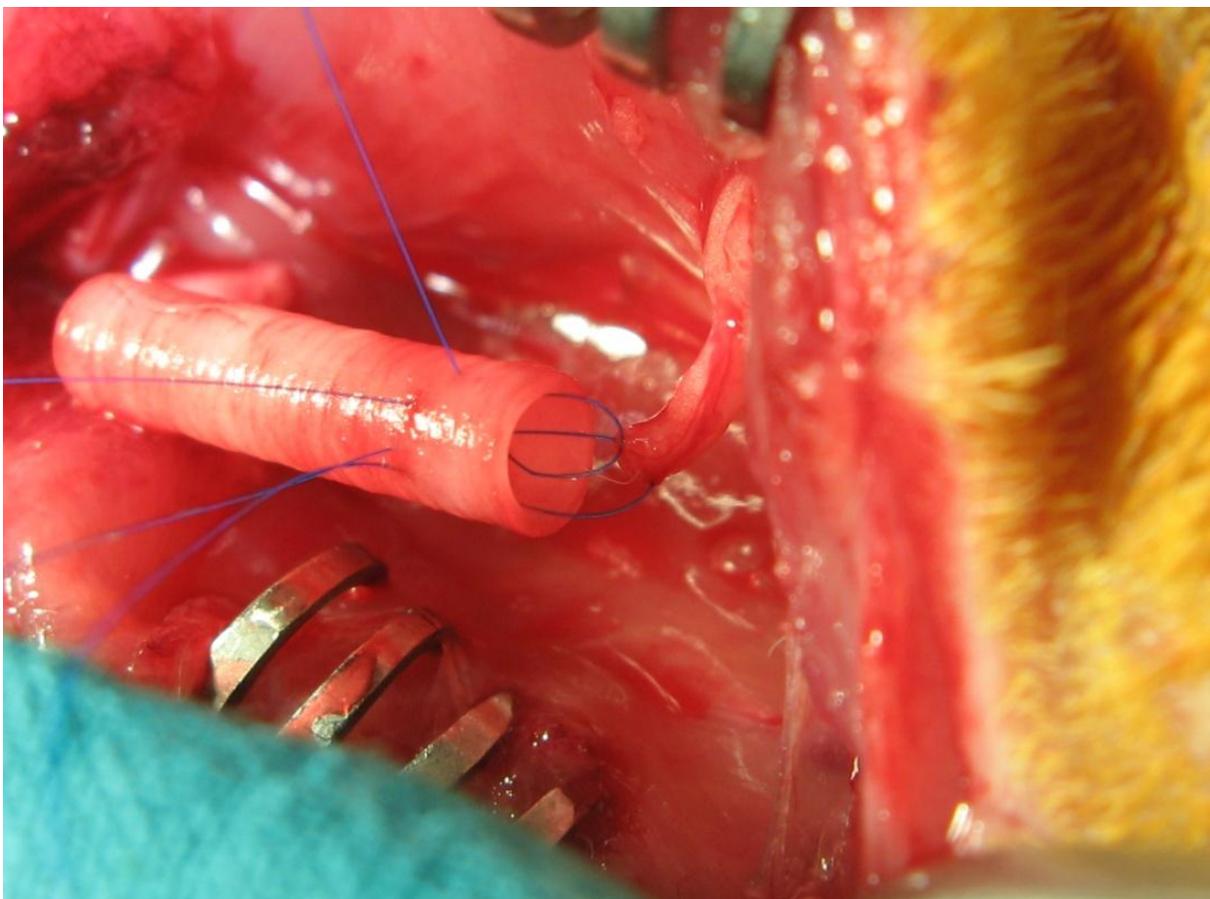
Todos los animales se mantuvieron durante 3 meses después de la intervención con comida y bebida *ad libitum*. Antes de la intervención y durante las 24 hr posteriores a la misma se administró profilaxis antibiótica (Cefuroxima intramuscular 30mg/kg peso/12 hr). Al mismo tiempo, se instauró una pauta de analgesia con Amitriptilina intramuscular (15 mg /kg/24hr) procediéndose a su sacrificio mediante inyección intracardiaca de ClK (Cloruro potásico) 1 M bajo anestesia general (Figura 41).



**Figura 41: Técnica de sacrificio empleada en las ratas del estudio. Tóracolaparotomía en línea media bajo anestesia general. Disección del mediastino. Exposición del septo y ventrículo izquierdo cardiacos. Punción directa sobre ventrículo izquierdo de KCl (Cloruro Potásico Braun Sol 14,9% env 20 ml, B.Braun Medical, España).**

## REPARACIÓN MICROQUIRÚRGICA DEL DEFECTO NERVIOSO (GRUPOS 1 A 3)

Una vez realizado el defecto nervioso, a cada muñón del nervio seccionado se realizaron dos suturas con monofilamento de poli-hexa-fluoro-propileno (Pronova Biopharma TM, Lysaker, Norway) de calibre 9-0, uniendo el epineuro del nervio con el conducto nervioso sintético e introduciendo aproximadamente 2 mm del cabo nervioso seccionado en el interior de un tubo de colágeno reabsorbible de uso clínico (NeuraGen®, Integra Lifescience corporation, Plainsboro, New Jersey, USA), de tal forma que se favorezca el contacto entre los brotes axonales procedentes del muñón y el material que contenga el tubo (Figura 42). Estos tubos de colágeno liofilizado se utilizan de rutina en clínica humana para la reparación de defectos nerviosos como alternativa al autoinjerto nervioso.



**Figura 42: Implantación del conducto nervioso. Detalle de las 2 suturas tubo-epineuro que existe en el extremo proximal del nervio lesionado.**

En los grupos 2 y 3, el tubo de colágeno reabsorbible que se implantó en los animales había sido previamente tratado en el laboratorio, introduciéndose en el interior de su luz un biomaterial con o sin células, según se describe más adelante.

## GENERACIÓN DE HIDROGELES DE FIBRINA – AGAROSA TRIDIMENSIONALES (GRUPOS 3 Y 4)

En aquellos casos en los que se utilizaron tubos de colágeno reabsorbible con biomateriales en su interior, se procedió a generar hidrogeles de fibrina y agarosa al 0,1%, tal como se describe a continuación (Alaminos *et al.*, 2007, 2008).

Para la generación de un hidrogel de 10 ml de volumen, se mezclaron los siguientes componentes en el orden que se indica:

- ❖ 7,6 ml de plasma sanguíneo humano. Este producto se utilizó como fuente de fibrinógeno.
- ❖ 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- ❖ 150 µl de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España).
- ❖ 1 ml de Cl<sub>2</sub> Ca 1% (p/v) para inducir la polimerización del plasma y la conversión del fibrinógeno en fibrina.
- ❖ 0,5 ml de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma – Aldrich Ref. A9045) disuelta al 2% (p/v) en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión.

Una vez generada la mezcla, ésta se introdujo cuidadosamente en la luz de un tubo de colágeno reabsorbible Neuragén® de 1,5 cm de longitud y 3 mm de diámetro, prestando especial atención a la ausencia de burbujas o espacios vacíos en la luz de dicho tubo. Posteriormente, se dejaron polimerizar en reposo los tubos conteniendo los hidrogeles (alrededor de 10 minutos después de su elaboración), cubriéndose a continuación con medio de cultivo DMEM (Figura 43 y figura 44).



**Figura 43: Imagen de conducto nervioso sintético de colágeno NeuraGén™ relleno de hidrogel de Fibrina-Agarosa y ADSC (adipose derive stem cell) inmerso en medio DMEM. Detalle de la longitud del conducto, 15mm.**



**Figura 44: Imagen de conducto nervioso sintético de colágeno NeuraGén™ relleno de hidrogel de Fibrina-Agarosa.**

## GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ADSC (GRUPO 3)

Para obtener las células madre del tejido adiposo de las ratas incluidas en el grupo 3 del estudio, se procedió a extirpar pequeños fragmentos de tejido graso del área inguinal mediante una pequeña incisión oblicua bajo anestesia general y en condiciones de asepsia, guantes estériles, mascarilla, gorro, bata estéril y material quirúrgico estéril.

Una vez obtenida la muestra, ésta se introdujo inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

(Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 kg/ml de estreptomicina) y antimicóticos (1,25 kg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra. La composición del medio de cultivo DMEM se muestra a continuación en la tabla 3. Estas muestras de tejido adiposo se utilizaron íntegramente para la generación de cultivos celulares de células madres derivadas de la grasa.

COMPONENTE	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
<b>SALES INORGANICAS</b>	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.265
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	—
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0.0001
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—
KCl	0.4
MgCl•6H <sub>2</sub> O	—
MgSO <sub>4</sub>	0.09767
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—
NaCl	6.4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.109
NaHCO <sub>3</sub>	3.7
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—
<b>AMINOACIDOS</b>	
Glycine	0.03
L-Alanine	—
L-Arginine•HCl	0.084
L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	—
L-Aspartic Acid	—
L-Cystine•2HCl	0.0626
L-Glutamic Acid	—
L-Glutamine	0.584
L-Histidine•HCl•H <sub>2</sub> O	0.042
L-Isoleucine	0.105
L-Leucine	0.105
L-Lysine•HCl	0.146
L-Methionine	0.03
L-Phenylalanine	0.066
L-Proline	—
L-Serine	0.042
L-Threonine	0.095
L-Tryptophan	0.016
L-Tyrosine•2Na•2H <sub>2</sub> O	0.10379
L-Valine	0.094
<b>VITAMINAS</b>	
Choline Chloride	0.004
D-Pantothenic Acid•½Ca	0.004
Folic Acid	0.004
Hypoxanthine	—
Linoleic Acid	—
myo-Inositol	0.0072
Niacinamide	0.004
Pyridoxine•HCl	0.004
Riboflavin	0.0004
Thiamine•HCl	0.004
Thioctic Acid	—
Thymidine	—
Vitamin B-12	—
<b>OTROS</b>	
D-Glucose	4.5
Phenol Red•Na	0.0159
Pyruvic Acid•Na	—
Putrescine•HCl	—

**Tabla 3: Composición de los medios de cultivo celular DMEM. Valores expresado en gr/litro de medio de cultivo.**

A la llegada de las muestras al laboratorio, éstas se lavaron dos veces en solución fisiológica salina PBS (*phosphated buffered saline*), procediéndose a su fragmentación mecánica para obtener explantes de pequeño tamaño previamente a su digestión. Después, los explantes de tejido se sometieron a digestión enzimática en solución de colagenasa tipo I de *Clostridium hystolyticum* al 3% (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) durante seis a ocho horas a 37° C en agitación. Finalmente, las células aisladas fueron obtenidas mediante centrifugación y cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich Co.) y antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 kg/ml de estreptomycin) y antimicóticos (1,25 kg/ml de anfotericina B) en frascos de cultivo tipo Falcon para generar cultivos celulares bidimensionales

El medio de cultivo se renovó cada tres días. Una vez que las células alcanzaron un estado subconfluyente, los cultivos se tripsinizaron utilizando tripsina (Sigma Aldrich. Ref T4799) y se subcultivaron en nuevos frascos de cultivo celular. Todas las células empleadas en este trabajo pertenecieron a los primeros cuatro subcultivos.

En los animales correspondientes al Grupo 4 de estudio, en los que se utilizarán biomateriales con células madre mesenquimales ADSC en su interior, se añadieron 10.000 células ADSC cultivadas por ml de gel de fibrina y agarosa justo antes de inducir la gelificación mediante adición de calcio y la introducción en los tubos de colágeno.

## VARIABLES DEL ESTUDIO.

En cada animal, se recogerán periódicamente las siguientes variables:

- **Parámetros clínicos.** Se estudió la presencia de úlceras neurotróficas y de amputaciones o automutilaciones que aparecían en la pata problema de cada animal. De manera, que en el caso de las **úlceras**, se asignaron los siguientes valores:

Valor 0: ausencia de úlceras neurotróficas.

Valor 1: úlcera neurotrófica de tamaño  $\leq 2$  mm.

Valor 2: úlcera neurotrófica de tamaño  $> 2$  mm.

Al mismo tiempo, se valoró la presencia de **amputaciones o automutilaciones** en la pata del animal, siendo imposible determinar su origen, es decir, si fue autoinducido por el propio animal, o bien, si se trata de una amputación secundaria a la lesión nerviosa inducida previamente. De forma, que a se asignaron los siguientes valores:

Valor 0: ausencia de amputación/automutilación

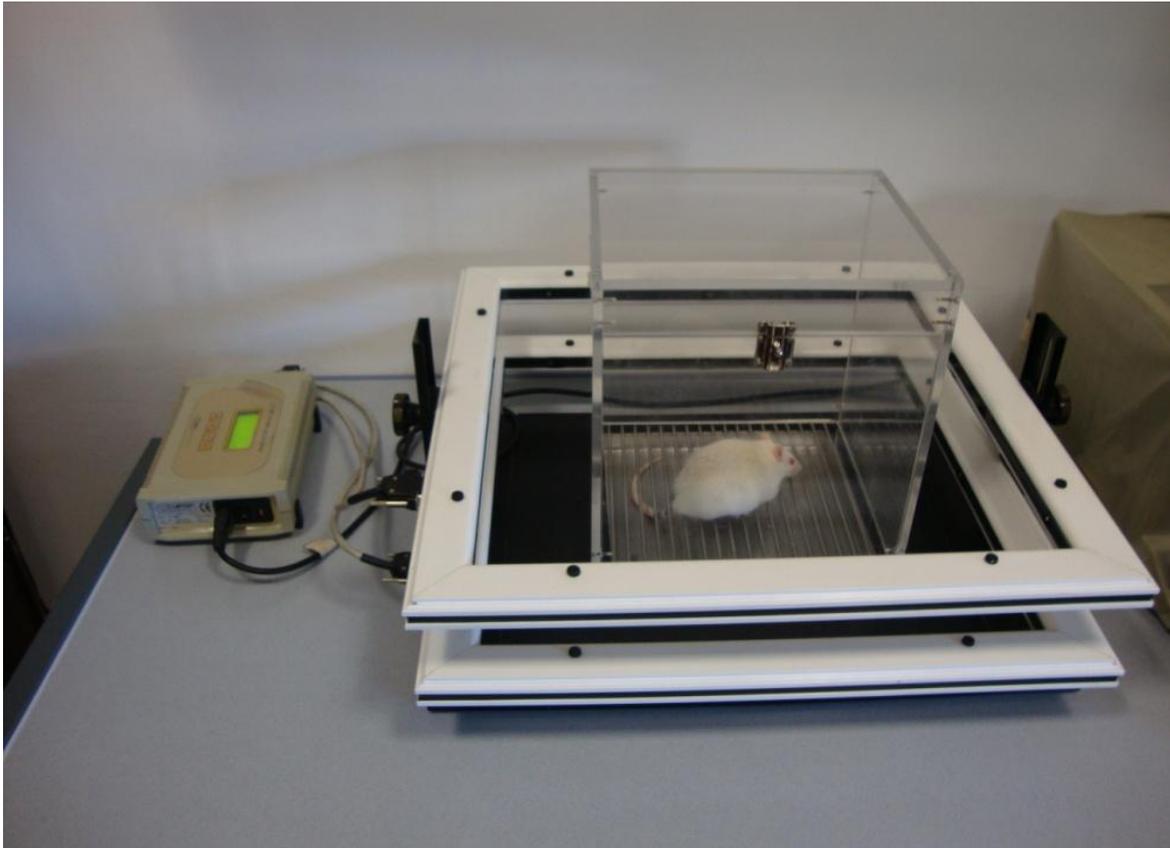
Valor 1: presencia de amputación/automutilación



**Figura 45. Izquierda: Úlcera neurotrófica localizada en el talón de la extremidad posterior izquierda del animal 5 del grupo tratado con conducto nervioso relleno de suero heparinizado (grupo 1). Derecha: Amputación/Automutilación de los dedos del borde externo de la pata izquierda del animal (grupo 1).**

- **Estado de recuperación funcional motora.** Se estimó la recuperación motora de la rata mediante el estudio de la Actividad Motora Espontanea (Ferrer *et al.*, 1987). Se introdujo al animal de experimentación en el interior de una urna de metacrilato de 26x29x36 cm y se midieron los movimientos, desplazamientos y elevaciones del animal en el interior de la caja mediante detectores infrarrojos situados en dos planos paralelos al suelo de la caja a distintas alturas (Figura 46).

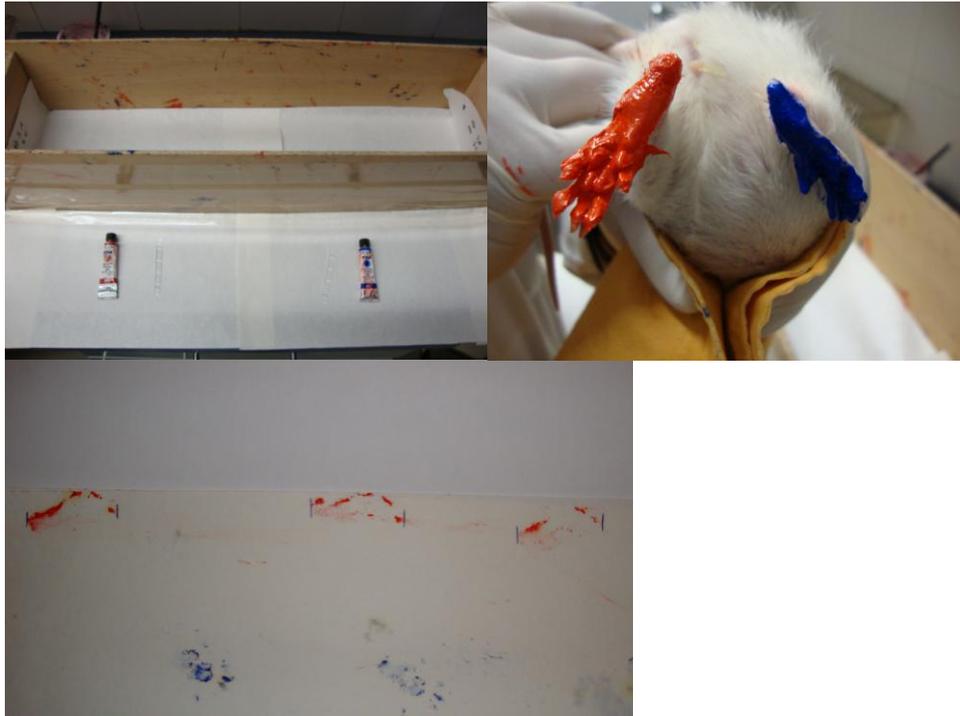
La actividad motora espontanea se midió en 3 intervalos de 5 minutos cada uno con el objetivo de detectar diferencias entre los distintos intervalos si los hubiese. El estudio de actividad motora espontanea se realizó de forma reglada a las 17 hr del día, con las mismas condiciones de iluminación y temperatura con objeto de evitar diferencias producidas por el ciclo circadiano del animal y las condiciones ambientales.



**Figura 46. Estructura transparente de metacrilato que permite a los detectores infrarrojos determinar la actividad motora espontánea del animal. Detectores infrarrojos situados a dos alturas y conectados a un contador digital.**

- **Estudio de la huella plantar**. Las patas de cada animal se impregnaron de tinta con el objetivo de dibujar sobre un papel continuo de 50 cm de longitud la silueta de su huella y estudiar la longitud como indicador del grado de atrofia/retracción neurógena de los músculos inervados por el nervio lesionado. De esta manera, se obtuvo la longitud en milímetros entre la almohadilla plantar del talón del animal y el 2º dedo de la rata, o en caso de existir úlceras neurotróficas o amputación en ese dedo, el siguiente dedo de mayor longitud.

Se impregnó la planta de las extremidades posteriores del animal con pintura de color rojo en la pata problema (Izquierda) y de color azul la pata control (Derecha). Se hizo andar al animal a través de un espacio cerrado lateralmente, cuyo suelo estaba constituido por papel continuo y sin techo, lo que permitía observar el comportamiento del animal (Figura 47).



**Figura 47: Izquierda arriba Dispositivo para la medida de la longitud de la huella plantar. Derecha arriba: Pintado de las patas traseras de la rata. Abajo: Huella de la rata 5 del grupo tratado con ADSC e hidrogel de fibrina-agarosa. Detalle de la huella completa muy similar a la de la pata control. Longitud de la huella problema de 40 mm. Longitud de la huella normal 41 mm.**

**- Estudio neurofisiológico.** Se realizaron estudios neurofisiológicos a cada uno de los animales de experimentación incluidos en el estudio. El estudio se realizó a triple ciego, de manera que ni el explorador ni la persona que manejó los datos sabía a qué grupo pertenecía cada animal. El evaluador realizó electromiografías de los grupos musculares distales a la lesión:

- Bíceps femoral
- Gemelos (*gastrocnemius*)
- Tibial Anterior
- Músculos intrínsecos de la pata/ Pedio.

Los signos de **denervación** se caracterizan, en general, por la presencia de potenciales específicos y de signos de lesión axonal crónica, potenciales de unidad motora de amplitud y duración incrementada, polifásicos, con un patrón de interferencia aislado y el reclutamiento “reducido” o “disminuido”, las unidades motoras remanentes tienen que descargar a una frecuencia mayor para generar niveles adecuados de fuerza muscular. Se evaluaron los signos de **denervación** para cada grupo muscular y se pidió al explorador que asignase de forma homogénea los siguientes valores:

- 0 – ausencia de signos de denervación
- 1 – presencia leve de signos de denervación
- 2 – presencia moderada de signos de denervación
- 3 – presencia severa de signos de denervación

para cada uno de los grupos musculares evaluados en cada animal.

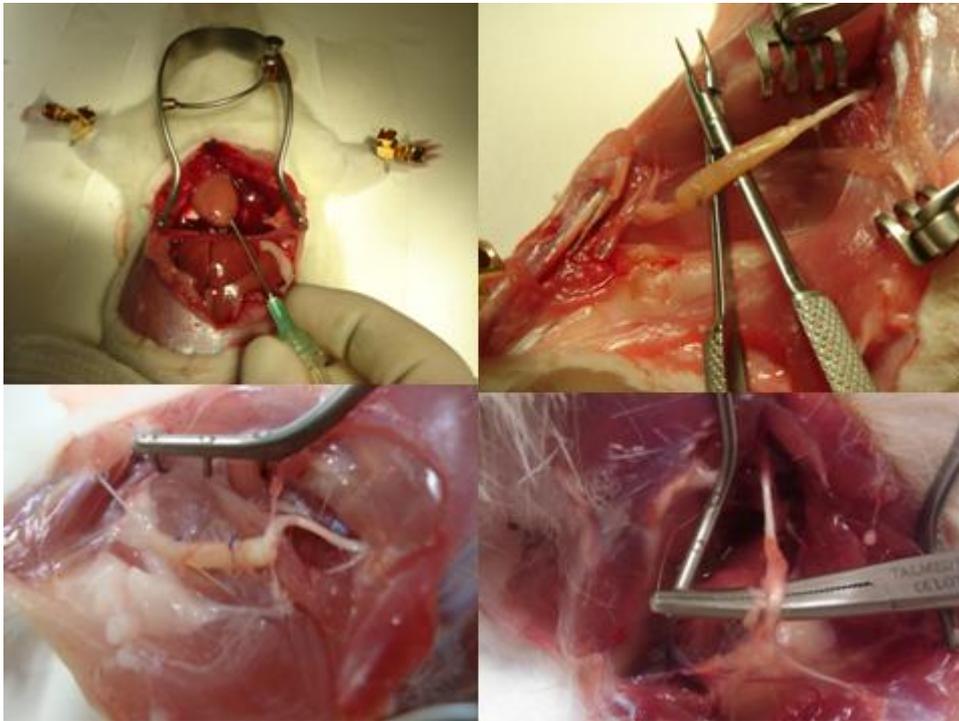
Al mismo tiempo, se evaluaron los signos de **reinervación** de los mismos grupos musculares. La reinervación muscular genera unos potenciales muy polifásicos de baja amplitud. Al proseguirse el crecimiento axonal, estos potenciales son cada vez más numerosos. Paralelamente, se hacen más grandes y cada vez menos polifásicos. De la misma manera que para la denervación, se asignaron valores para los signos de reinervación de cada uno de los grupos musculares explorados:

- 0 – ausencia de signos de reinervación
- 1 – leve presencia de signos de reinervación
- 2 – presencia moderada de signos de reinervación
- 3 – importante presencia de signos de reinervación



**- Estudio histológico.** Una vez sacrificados los animales, se les extrajo en bloque el nervio desde su salida de la escotadura ciática hasta su inclusión en el interior de los vientres musculares, y los grupos musculares distales dependientes de ese nervio para su análisis ulterior, así como el nervio y el músculo sanos

contralaterales que servirían como controles. Los resultados histológicos son la media de los parámetros estudiados en el conjunto de las muestras histológicas pertenecientes a cada grupo de animales y para cada una de las cinco partes en que se dividió el nervio lesionado del animal de experimentación. Las más de 1700 muestras obtenidas en total fueron evaluadas con microscopio óptico por el doctorando y los directores de tesis del departamento de histología.



**Figura 49.**

**Arriba izquierda: técnica de fijación mediante la perfusión intracardiaca de formol o formaldehido dependiendo del tipo de técnica microscópica que se utilizase para la muestra. Resto de imágenes muestran el aspecto macroscópico de los restos del conducto nervioso y los grupos musculares distales a la lesión una vez fijado el animal de experimentación. Toma de muestra del tejido para estudio histológico.**

Todas las muestras de tejido nervioso y muscular fueron procesadas para un estudio histológico mediante microscopía óptica. Los pasos llevados a cabo fueron los siguientes para la preparación de las muestras y su posterior visualización mediante microscopía.

**Fijación:** las muestras correspondientes a nervios periféricos control y los conductos sintéticos de los distintos grupos, una vez extraídos del animal pasado el periodo de seguimiento, fueron inmersos en una solución de formalina al 10% en

PBS 0,1M durante 24 horas a temperatura ambiente. Los músculos fueron colocados en una solución de formalina al 10% en PBS 0,1M durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se cortaron las piezas histológicas de forma macroscópica y se realizó una nueva fijación con una solución de formalina al 10% en PBS 0,1M durante 24 horas a temperatura ambiente durante 24 horas más.

**Inclusión en parafina:** las muestras (tejido nervioso y muscular) fueron lavadas en agua corriente y posteriormente fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcohol (desde 70% hasta 99%). Una vez deshidratadas fueron diafanizadas con xilol y, posteriormente fueron impregnadas en parafina a 60°C (autotécnico SHANDON<sup>®</sup> Mod. Citadel 2000). La inclusión de las piezas histológicas fue realizada en el centro de inclusión (MICRÓM<sup>®</sup> Mod. EC 350-1).

**Corte histológico:** las inclusiones correspondientes a los tejidos de estudio fueron cortadas a 5 micras de espesor en el micrótopo (MICROM<sup>®</sup> Mod. HM315). Las secciones fueron secadas en estufa a 60°C durante 1 hora.

#### **A. Estudio morfológico: Tinción de hematoxilina-eosina.**

Las secciones de tejido (muscular y nervioso) fueron desparafinadas y deshidratadas de acuerdo al protocolo convencional (Kiernan JA, 2008).

Las secciones, una vez hidratadas, fueron colocadas en solución de hematoxilina de Harris durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el viraje durante 3-5 minutos en agua corriente. Seguidamente, se realizó la tinción con eosina durante 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez teñidas las muestras, fueron deshidratadas en soluciones alcohólicas de concentración ascendente, aclaradas en xilol y cubiertas con cubreobjetos en un medio resinoso.

#### **B. Estudio histoquímico.**

##### **B.1. Tinción de Kluver-Barrera.**

Las secciones de tejido nervioso obtenidas de los controles y de los conductos sintéticos rellenos de distintos biomateriales, una vez realizados los procesos estandarizados de hidratación, fueron teñidas en solución de *Luxol fast blue* al 0,1% durante 12 horas aproximadamente a 60°C.

Posteriormente, se realizó la diferenciación con alcohol al 95% y carbonato de litio al 0,05%. Una vez diferenciada la reacción se realizó la contratinción en solución de cresil violeta (pH 3,5) durante 10 minutos a 57°C. Finalmente, se procedió a la diferenciación en alcohol al 95%, se deshidrató en alcohol al 99%, se aclaró en xilol y se montó en un medio resinoso (Kluver y Barrera, 1953).

##### **B.2. Tinción de Picrosirius.**

Las secciones de tejidos, una vez hidratadas, fueron teñidas en solución de Picrosirius durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. Posteriormente, las secciones fueron lavadas en agua destilada, y teñidas con hematoxilina de Harris durante 10 minutos y viradas en agua corriente durante 3 minutos. Finalmente las muestras fueron deshidratadas en soluciones alcohólicas de concentración ascendente, aclaradas en xilol y montadas en un medio resinoso (Junquera *et al*, 1979).

### C. Estudio Inmunohistoquímico.

Para la realización de los métodos inmunohistoquímicos las secciones fueron desparafinadas e hidratadas hasta el agua destilada, y posteriormente se realizó la recuperación antigénica en solución de buffer citrato pH 6 a 95°C durante 30 minutos. Cada uno de los pasos sucesivos fue seguido de abundantes lavados en solución de PBS 0,1M. Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda, evitando la desecación de las secciones histológicas. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada en solución de peróxido de hidrogeno al 3% en PBS 0,1M durante 10 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo de los sitios antigénicos inespecíficos fue bloqueado incubando las secciones durante 15 minutos a temperatura ambiente en suero normal de caballo (IMPRESS REAGENT<sup>®</sup> kit Peroxidase MP-7500 Vector, Burlingame, CA, USA). En el caso de la laminina, se requiere un desenmascaramiento con enzimas específicas, como se muestra en la tabla de anticuerpos (Tabla 4). Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en PBS 0,1M con los tiempos que se detallan en la tabla (Tabla 4). Después de la incubación del anticuerpo primario, se realizaron abundantes lavados en PBS 0,1M y se realizó la incubación de las secciones con el anticuerpo secundario con el sistema de polímero marcado durante 30 minutos a temperatura ambiente (IMPRESS REAGENT<sup>®</sup> kit Universal anti-mouse/rabbit Ig MP-7500 Vector, Burlingame, CA, USA). La reacción fue visualizada incubando las secciones en NovaRED<sup>®</sup> (Vector, Burlingame, CA, USA) y DAB<sup>®</sup> (PEROXIDASE SUBSTRATE kit DAB<sup>®</sup> SK-4100 Vector, Burlingame, CA, USA). Después de la inmunotinción, las secciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Harris durante 20 segundos, deshidratadas en alcoholes ascendentes, aclaradas en xilol y cubiertas con un medio resinoso (EUKITT<sup>®</sup>, Ziegel hofstraBe 214, Freiburg, Alemania). Para cada inmunoreacción se realizó como control negativo la incubación de la sección en la solución de bloqueo (IMPRESS REAGENT<sup>®</sup> kit MP-7500 Vector, Burlingame, CA, USA), omitiendo la incubación del anticuerpo primario. El control positivo se realizó utilizando tejidos en los cuales la inmunoreacción es conocida para cada anticuerpo.

ANTICUERPO	PRETRATAMIENTO	DILUCION/TIEMPO TEMPERATURA	REFERENCIA
<i>Monoclonal rabbit anti-laminin</i>	Buffer citrato pH 6, digestión enzimática en pepsina.	1:1000 PBS Toda la noche 4°C	SIGMA L8271
<i>Policlonal rabbit antiS-100</i>	Buffer citrato pH 6	1:400 PBS 0,1M 30 minutos Temperatura ambiente	DAKO-Z0311
<i>Mouse monoclonal anti-neurofilamento</i>	Buffer citrato pH 6	1:1000 PBS 0,1 M 1 hora Temperatura ambiente	SIGMA N 2912

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la técnicas inmunohistoquímicas. Se especifica el pretratamiento al que se sometió el espécimen, el periodo y la temperatura de aplicación de los mismos y sus referencias específicas.**

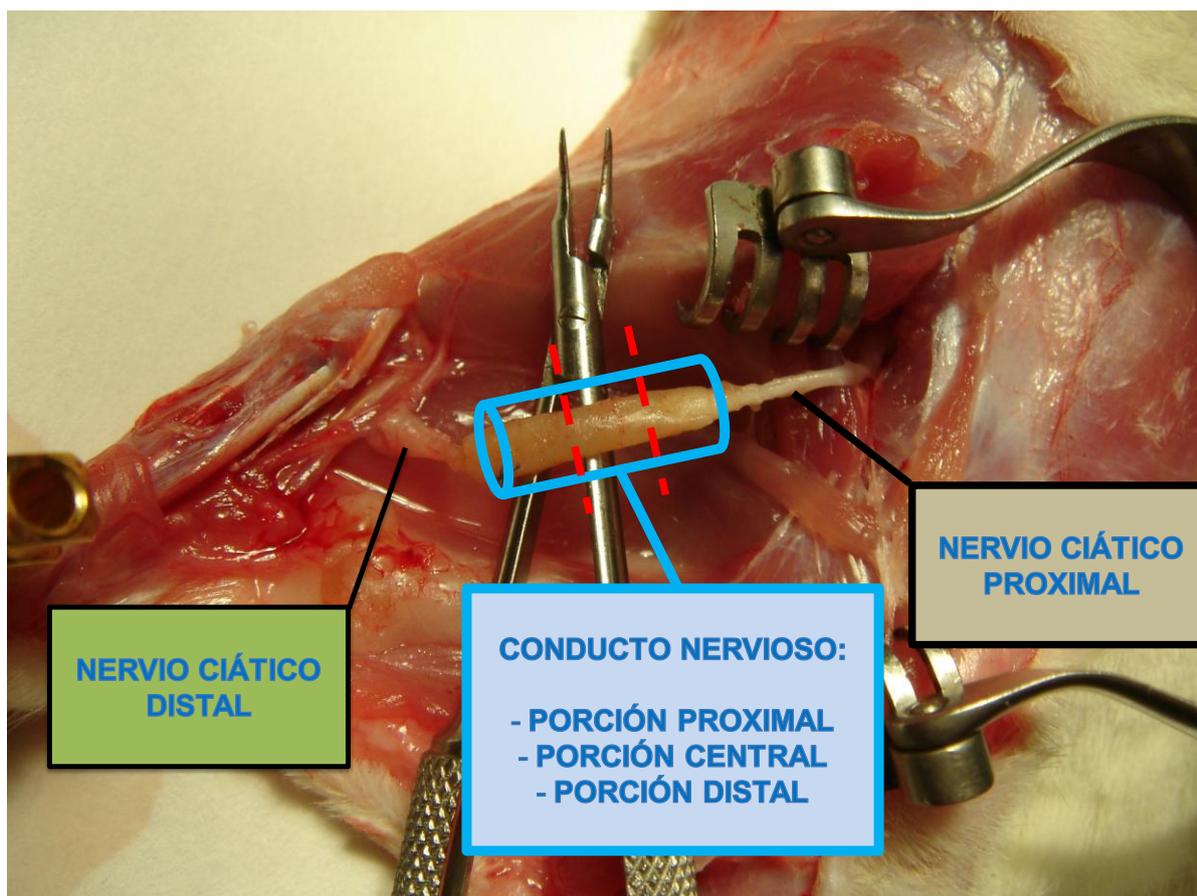
Todas las secciones histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas una vez procesadas fueron examinadas con el microscopio NIKON Mod. Eclipse 90i, y las imágenes fueron capturadas con la cámara digital NIKON Mod. DXN 1200C, y finalmente, editadas con el software NIS Elements AR (Live-Fast).

#### **Parámetros histológicos estudiados.**

Con el objetivo de poder determinar la presencia de un proceso de regeneración y estudiar qué grado de regeneración y cómo se produce el proceso a través de los distintos conductos nerviosos utilizados en esta tesis doctoral, se establecieron una serie de variables histológicas. El estudio histológico se realizó de forma seriada y estandarizada para cada uno de los especímenes obtenidos. Transcurridos los 3 meses desde el implante de cada uno de los conductos nerviosos a los animales de cada grupo de estudio se sacrificaron cada uno de los animales y se obtuvieron muestras de cada parte del nervio donde se aplicó el conducto nervioso y del nervio control sano. Así, se fragmento el nervio problema en varias partes para su estudio pormenorizado y específico (Figura 50):

- **Nervio ciático proximal** a la lesión nerviosa donde se implantó el conducto nervioso.

- **Conducto nervioso**, se diferenciaron tres zonas o partes:  
Región o porción proximal del conducto nervioso implantado, se trata de la zona de interfase específica donde se prevé el crecimiento de los brotes axonales.  
Región o porción central del conducto nervioso implantado.  
Región o porción distal del conducto nervioso implantado.
- **Nervio ciático distal** a la lesión nerviosa donde se implantó el conducto nervioso.



**Figura 50. Imagen de disección del nervio ciático donde se implantó el conducto nervioso tres meses después. Se representa las muestras obtenidas de cada espécimen de nervio periférico para su estudio.**

Para cada una de las partes del nervio ciático se realizó una descripción histomorfológica específica de cada muestra mediante tinciones específicas que permitieron valorar las siguientes variables. La descripción que se hizo de cada grupo de animales constituyen los hallazgos más comunes a cada uno de ellos.

**Arquitectura histológica del nervio.** Mediante tinción con hematoxilina-eosina (en adelante H-E) se determinó la anatomía microscópica del nervio, la existencia de regeneración nerviosa, el diámetro que ocupan los brotes axonales en el interior del conducto nervioso implantado, el estado de degradación de la pared del conducto nervioso, la vascularización y, en los cortes longitudinales, la longitud de los brotes axonales y si contactan o no con el otro cabo del nervio lesionado. (Kiernan JA, 2008)

**Signos de degeneración walleriana.** Se utilizaron las muestras teñidas con H-E y fue catalogada en ausencia o presencia leve, moderada o severa, según los signos de degeneración existentes en cada espécimen. Cuando se interrumpe una fibra nerviosa, el cabo proximal y el cabo distal del nervio lesionado sufren una serie de cambios microscópicos que se conocen en su conjunto como degeneración walleriana. En la degeneración walleriana, se distinguen tres fases según las alteraciones de la vaina de mielina; una fase temprana durante la primera semana, una fase de Marchi durante la primera mitad de la segunda semana y una fase sudanofílica hasta cerca de la mitad del segundo mes. En nuestro estudio, tan sólo observaremos los cambios que ocurren en la tercera fase o fase sudanofílica. A su vez algunos autores hacen distinción entre los cambios ocurridos a nivel del cabo proximal, llamada degeneración walleriana retrógrada o primitiva, y los cambios producidos a nivel distal, llamada degeneración walleriana secundaria o anterógrada. En ambos casos ocurre una degradación de la vaina de mielina con la presencia de un infiltrado inflamatorio, casi exclusivamente a expensas de macrófagos. Al mismo tiempo, existe una retracción de la estructura nerviosa y la presencia de edema intraneural que se organiza posteriormente dando lugar a vacuolas. De manera paralela, se suele apreciar una infiltración de tejido conectivo que será más o menos intensa en función de la evolución de la lesión. En el cabo proximal, se forman las Bandas de Büngner donde se incluye el axón para llevar a cabo el crecimiento axonal. La degeneración axonal presente en cada muestra se catalogó como leve, moderada o severa por el mismo examinador.

**Inflamación.** Para ello también se utilizaron las muestras teñidas con H-E. En este caso, también se catalogó como ausencia o presencia leve, moderada o severa de signos inflamatorios en cada muestra analizada.

**Mielinización.** El grado de mielinización fue determinado mediante la técnica de kluver-Barrera y también se clasificó en ausencia o presencia, que puede ser: leve, moderada o intensa (Kluver H y Barrera E, 1953).

**Estado de la matriz extracelular del nervio periférico.** Fundamentalmente para el estudio del infiltrado de tejido conectivo en el tejido perineural e intraneural. Se estudió la negatividad o la positividad de la matriz extracelular a la técnica de picrosirius (en adelante P-S), y si esta era leve, moderada o intensa. De esta forma, se pudo determinar la cantidad de fibras colágenas en función de la intensidad de

tinción y la disposición del tejido conectivo en el lumen del conducto nervioso sintético alrededor de los brotes axonales.

**Inmunohistoquímica.** El análisis inmunohistoquímico se realizó de forma cuantitativa analizando cada una de las muestras de cada una de las partes en las que se dividió el nervio lesionado, y determinando para cada anticuerpo utilizado (tabla 4) la positividad o negatividad de la muestra histológica a cada uno de ellos. En caso de ser positivo, a su vez se distinguió si la inmunorreacción fue leve (+/+++), moderada (++/+++) o severa (+++/+++). Los estudios inmunohistoquímicos realizados fueron:

- Neurofilamento
- Laminina
- Proteína S100

**Histología del tejido muscular.** Se tomaron varias muestras del tejido muscular distal a la lesión. El tejido muscular utilizado de forma estandarizada para realizar esta tesis doctoral fue el procedente del músculo *gastrocnemius* o gemelos. Por último, se realizó un estudio histológico de los músculos inervados por el nervio ciático en los cuales se determinó:

- Grado de atrofia muscular. Se determinó el grado de atrofia muscular y se clasificó en ausencia o presencia leve, moderada o severa.
- Grado de infiltración adiposa / tejido conectivo. Se evaluó mediante tinción con hematoxilina-eosina y picrosirius y se determinó si existía o no infiltración y se era leve, moderada o severa.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc.) y estuvo orientado para encontrar diferencias entre los modelos de conducto nervioso artificial elaborados con y sin biomateriales de fibrina-agarosa con y sin ADSC utilizados para evaluar la regeneración nerviosa en los distintos grupos de estudio. Se optó por realizar un estudio estadístico no paramétrico.

En orden a realizar una comparación general entre todas las muestras (grupos 0 a 4), utilizamos el Test de comparación de varias muestras independientes de Kruskal-Wallis (K-W).

En orden a realizar comparaciones entre dos distribuciones independientes (por ejemplo, para comparar entre dos días o dos constructos diferentes) se utilizó el Test estadístico de Mann-Whitney (M-W).

En todos los casos, se consideró que existían diferencias significativas cuando los valores de P eran menores a 0,05 para los test de doble cola.

## RESULTADOS:

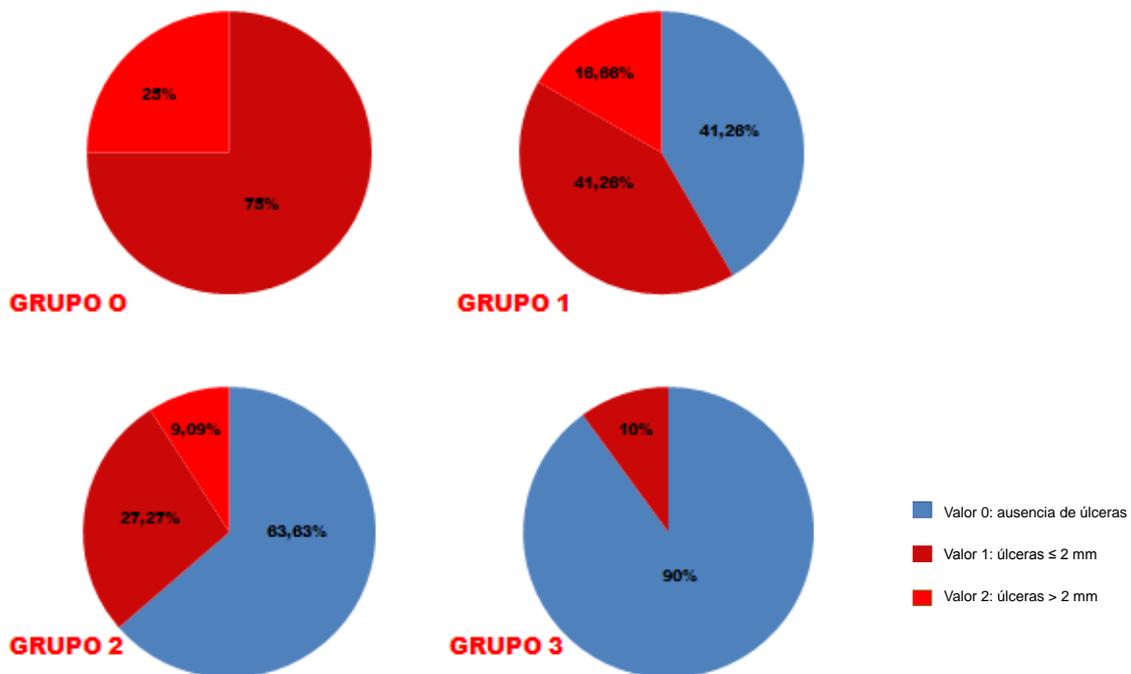
## RESULTADOS:

### **1.- Generación de un modelo experimental de lesión de nervio periférico**

en el que exista un defecto nervioso. En esta Tesis Doctoral hemos conseguido desarrollar un modelo de lesión nerviosa periférica extensa (de un centímetro) y que nos permita estudiar el proceso de reparación nerviosa periférica con conductos nerviosos sintéticos en cuyo interior se aplican células madre mesenquimales procedentes de la grasa (ADSC) incluidas en biomateriales y las diferencias con respecto a la ausencia de biomateriales y ADSC en la recuperación del animal medidas mediante los distintos parámetros descritos en el apartado de Material y Métodos.

### **2.- Resultados de parámetros clínicos.**

En la mayoría de casos en los que se detectaron úlceras neurotróficas afectaban al borde externo de la pata del animal, tan sólo en dos casos se apreció la afectación del dedo más medial de la pata del animal. La figura 50 representa la incidencia de úlceras neurotróficas. Hay que destacar el descenso progresivo de la incidencia relativa de úlceras neurotróficas en los distintos grupos del estudio de manera que en el grupo 0 la incidencia total de úlceras es del 100%, descendiendo hasta el 36% aproximadamente de incidencia en el grupo 2 y hasta el 10 % en el grupo que incluye la presencia de células madre en el biomaterial del conducto nervioso. A su vez, la incidencia de úlceras de tamaño mayor de 2 mm es menor en el grupo en el que se aplican biomateriales en el interior del conducto nervioso, y no existen úlceras de ese tamaño en el grupo en el que se emplean ADSC. Es destacable la presencia de esas úlceras de gran tamaño en el 25 % de las ratas a las que no se les realiza ningún gesto de reparación quirúrgica.



**Figura 50: representación gráfica de la incidencia de úlceras neurotróficas (en %) en los distintos grupos del estudio.**

En ningún caso se apreció una amputación/automutilación completa de la pata del animal. De la misma forma, como se muestra en la tabla 4, se aprecia una menor incidencia de amputaciones/automutilaciones en la pata intervenida en las ratas a las que se implantan conductos nerviosos con biomateriales y conductos nerviosos, que además de biomateriales, incluyen en su interior células madre procedentes de la grasa (ADSC). De manera que, en el último grupo, la presencia de amputaciones/automutilaciones en las patas de las ratas es inexistente (0%). Sin embargo, en la mitad de las ratas en las que se implantó un conducto nervioso sintético relleno de suero heparinizado se detectaron amputaciones/automutilaciones de la pata homolateral al nervio lesionado.

	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<b>Valor 0 (no)</b>	<b>50%</b>	<b>83%</b>	<b>91%</b>	<b>100%</b>
<b>Valor 1 (si)</b>	<b>50%</b>	<b>17%</b>	<b>9%</b>	<b>0%</b>

**Tabla 4. Incidencia relativa (en %) de automutilaciones o amputaciones en los distintos grupos de estudio.**

El estudio estadístico mediante test no paramétricos para 2 muestras independientes mostró que sólo existían diferencias significativas en la incidencia de úlceras neurotróficas entre el grupo de animales a los que no se les realizaba ningún tratamiento posterior a la resección del nervio ciático (grupo 0) y a aquellos animales a los que se les implantaba un conducto nervioso relleno de biomateriales que contenían ADSC (grupo 3) (cuya incidencia es menor), como se puede apreciar en la tabla 5.

Valores de p	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 0	-	0,262	0,078	0,04
Grupo 1	0,262	-	0,379	0,05
Grupo 2	0,078	0,379	-	0,314
Grupo 3	0,04	0,05	0,314	-

**Tabla 5. Resumen de valores de p en el análisis no paramétrico realizado para 2 muestras independientes sobre la variable úlceras neurotróficas (Test de Mann-Whitney).**

En la tabla 6 se muestran los valores de p obtenidos en el estudio estadístico mediante test no paramétricos para 2 muestras independientes que mostró que no existían diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio para la incidencia de amputaciones en la pata del animal indistintamente del tipo de tratamiento aplicado en cada caso.

Valores de p	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 0	-	0,379	0,280	0,188
Grupo 1	0,379	-	0,786	0,539
Grupo 2	0,280	0,786	-	0,756
Grupo 3	0,188	0,539	0,756	-

**Tabla 6. Resumen de valores de p en el análisis no paramétrico realizado para 2 muestras independientes sobre la variable amputaciones/automutilaciones (Test de Mann-Whitney).**

### **3.- Estado de recuperación funcional motora.**

Generalmente, durante el primer intervalo de tiempo el animal de experimentación presenta una mayor actividad motora espontánea que durante los

dos intervalos posteriores, lo que se debe a la exploración del animal en el nuevo lugar donde se ubica, en este caso, una urna de metacrilato. De manera, que el animal durante todo el estudio se moverá de manera activa, pero en mayor cuantía durante el primer intervalo. El hecho tangible de que exista dolor neuropático, anosognosia (ausencia de propiocepción) asociado a las lesiones del nervio periférico nos hace presuponer que la actividad motora espontánea del animal estará disminuida, y por tanto, la ausencia de regeneración de las fibras amielínicas que conducen el dolor, y fibras mielínicas que conducen la sensibilidad propioceptiva hasta la médula espinal se traducirá en un descenso de la actividad motora espontánea tanto rápida como lenta.

En la tabla 7 se resumen los valores medios de la actividad motora espontánea para cada grupo de estudio y para cada variable, a su vez se expresa la desviación estándar.

	SM1	SM2	SM3	SS1	SS2	SS3	SR1	SR2	SR3
GRUPO 0	125,7 ±18,46	50,50 ±73,46	27,50 ±32,33	102 ±55,00	58,50 ±55,04	29 ±38,68	4,50 ±2,88	1,50 ±1,91	0,25 ±0,5
GRUPO 1	151,08 ±70,27	85,17 ±75,52	23,75 ±28,14	137,33 ±44,33	90,75 ±58,88	37 ±29,40	5,17 ±3,83	2,25 ±3,38	0,08 ±0,28
GRUPO 2	155,18 ±74,44	67,81 ±47,61	44,27 ±30,47	122,18 ±50,70	83,27 ±43,24	58,27 ±36,43	3,18 ±3,18	1,09 ±1,44	0,72 ±1,50
GRUPO 3	107,80 ±16,89	116,10 ±22,49	46,40 ±8,05	108,60 ±9,26	137,30 ±13,69	69,20 ±9,78	0,7 ±0,48	2,90 ±2,33	0,8 ±0,63
GRUPO 4	134,95 ±3,91	79,89 ±6,97	35,48 ±3,11	117,52 ±2,98	92,45 ±4,69	48,36 ±12,81	3,38 ±0,50	1,93 ±0,57	0,46 ±0,5
	FM1	FM2	FM3	FS1	FS2	FS3	FR1	FR2	FR3
GRUPO 0	133,50 ±74,59	48,25 ±55,24	10 ±12,88	402,75 ±160,10	130 ±160,26	92,5 ±92,09	0,75 ±0,95	1,5 ±1,91	0 ±0
GRUPO 1	161,83 ±120,67	88 ±98,57	14,83 ±17,71	428,91 ±287,10	377,58 ±516,85	73,91 ±69,30	1,83 ±1,80	0,91 ±1,56	0,08 ±0,28
GRUPO 2	253,45 ±207,47	57,18 ±53,12	36,63 ±48,51	285,72 ±190,02	142,09 ±88,40	107,18 ±67,98	1,54 ±1,96	0,54 ±0,68	0,18 ±0,40
GRUPO 3	44 ±11,22	130,6 ±34,42	23,40 ±3,40	220,3 ±13,41	378,1 ±39,17	122,4 ±10,65	1,10 ±0,99	0,7 ±0,48	0,70 ±0,48
GRUPO 4	148,19 ±5,37	81,01 ±4,08	21,21 ±20,96	334,42 ±11,44	256,94 ±12,11	98,99 ±25,70	1,30 ±0,50	0,91 ±0,5	0,24 ±0

**Tabla 7. A. Media y desviación estándar de los valores de actividad motora espontánea (movimientos lentos) en cada uno de los intervalos de tiempo para cada uno de los grupos de estudio. SM: slow movement. SS: slow slide. SR: slow rise.**

**B. Media y desviación estándar de los valores de actividad motora espontánea (movimientos rápidos) en cada uno de los intervalos de tiempo para cada uno de los grupos de estudio. FM: fast movement. FS: fast slide. FR: fast rise.**

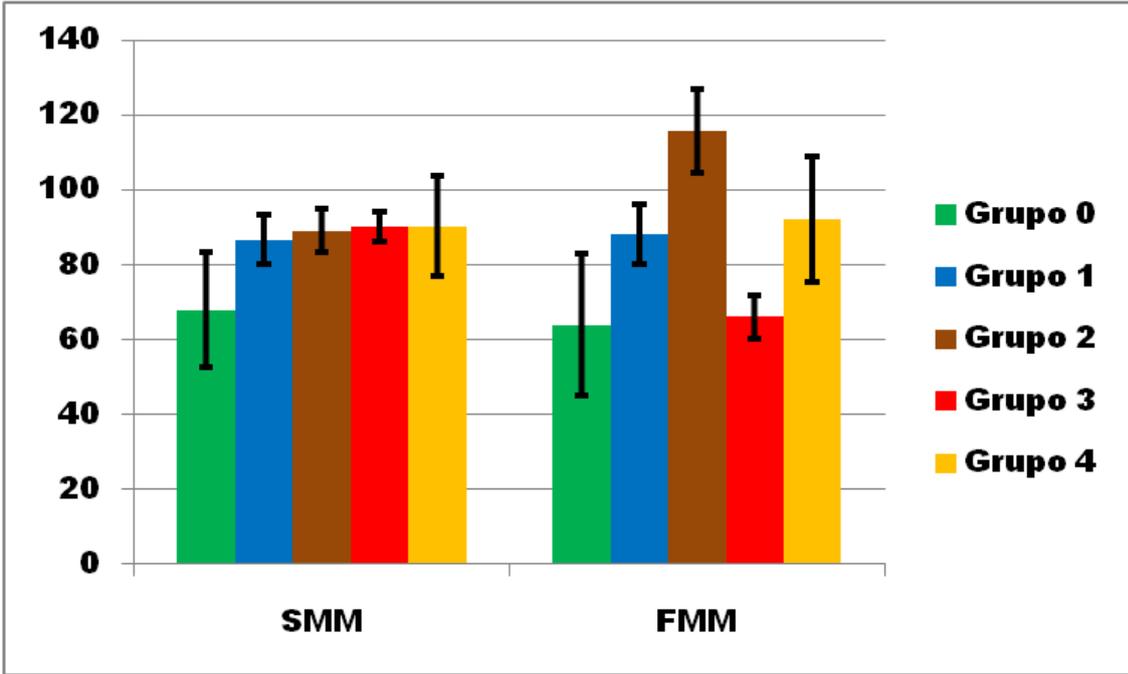
En la tabla 8 se expresan los valores de p obtenidos mediante test no paramétricos (U de Mann-Whitney) comparando las variables de actividad motora espontánea para cada uno de los grupos de estudio.

Hay que destacar la ausencia de diferencias significativas entre el grupo 0 (animales a los que no se les reparó el nervio ciático) y el grupo 1 (animales a los que se les implantó un conducto nervioso), la implantación aislada de un conducto sintético de colágeno no mejora la recuperación funcional motora en los animales de estudio.

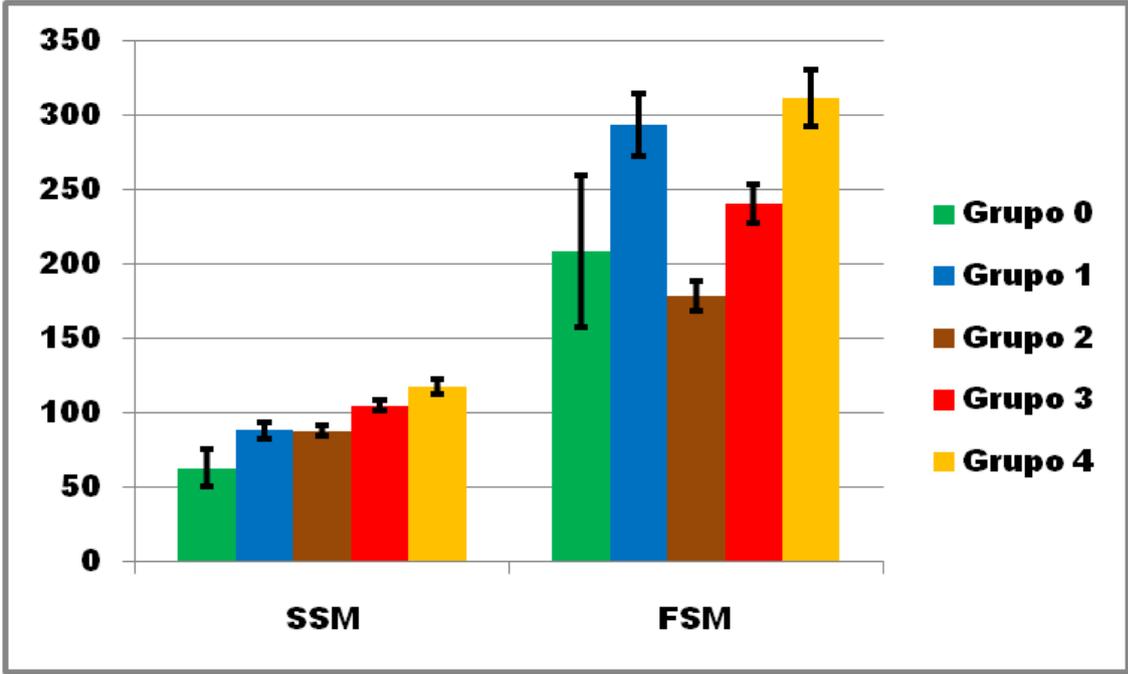
Por otro lado, es de interés reseñar la existencia de diferencias significativas entre el grupo 3 (animales a los que se les implantó un conducto nervioso con biomateriales y células madre mesenquimales) y el grupo 4 (animales control no intervenidos) en las variables SSM, FSM y SRM a favor del grupo 3. Se puede visualizar cómo los valores medios de estas variables en el estudio son incluso superiores a los animales control (animales sanos que no se sometieron a ninguna cirugía).

<b>GRUPO 0</b>						
	<b>SMM</b>	<b>SSM</b>	<b>SRM</b>	<b>FMM</b>	<b>FSM</b>	<b>FRM</b>
<b>GRUPO 0</b>	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO 1</b>	0,379	0,058	0,862	0,379	0,684	0,77
<b>GRUPO 2</b>	0,28	0,177	0,571	0,412	0,753	0,851
<b>GRUPO 3</b>	0,24	0,04	0,304	0,733	0,374	0,839
<b>GRUPO 4</b>	0,343	0,029	0,486	0,029	0,029	0,2
<b>GRUPO 1</b>						
	<b>SMM</b>	<b>SSM</b>	<b>SRM</b>	<b>FMM</b>	<b>FSM</b>	<b>FRM</b>
<b>GRUPO 0</b>	0,379	0,058	0,862	0,379	0,684	0,77
<b>GRUPO 1</b>	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO 2</b>	0,695	0,74	0,347	0,566	0,211	0,487
<b>GRUPO 3</b>	0,821	0,04	0,18	0,254	0,821	0,872
<b>GRUPO 4</b>	0,684	0,03	0,446	0,262	0,133	0,058
<b>GRUPO 2</b>						
	<b>SMM</b>	<b>SSM</b>	<b>SRM</b>	<b>FMM</b>	<b>FSM</b>	<b>FRM</b>
<b>GRUPO 0</b>	0,28	0,177	0,571	0,412	0,753	0,851
<b>GRUPO 1</b>	0,695	0,74	0,347	0,566	0,211	0,487
<b>GRUPO 2</b>	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO 3</b>	1	0,251	0,973	0,282	0,251	0,605
<b>GRUPO 4</b>	0,851	0,056	0,343	0,489	0,01	0,12
<b>GRUPO 3</b>						
	<b>SMM</b>	<b>SSM</b>	<b>SRM</b>	<b>FMM</b>	<b>FSM</b>	<b>FRM</b>
<b>GRUPO 0</b>	0,24	0,04	0,304	0,733	0,374	0,839
<b>GRUPO 1</b>	0,821	0,04	0,18	0,254	0,821	0,872
<b>GRUPO 2</b>	1	0,251	0,973	0,282	0,251	0,605
<b>GRUPO 3</b>	-	-	-	-	-	-
<b>GRUPO 4</b>	0,24	0,04	0,036	0,08	0,02	0,076
<b>GRUPO 4</b>						
	<b>SMM</b>	<b>SSM</b>	<b>SRM</b>	<b>FMM</b>	<b>FSM</b>	<b>FRM</b>
<b>GRUPO 0</b>	0,343	0,029	0,486	0,029	0,029	0,2
<b>GRUPO 1</b>	0,684	0,03	0,446	0,262	0,133	0,058
<b>GRUPO 2</b>	0,851	0,056	0,343	0,489	0,01	0,12
<b>GRUPO 3</b>	0,24	0,04	0,036	0,08	0,02	0,076
<b>GRUPO 4</b>	-	-	-	-	-	-

*Tabla 8. Valores de p en el análisis no paramétrico de las variables de actividad motora espontánea. En amarillo se resaltan los valores de  $p < 0,05$ , es decir, en aquellas variables para las que existen diferencias significativas.*

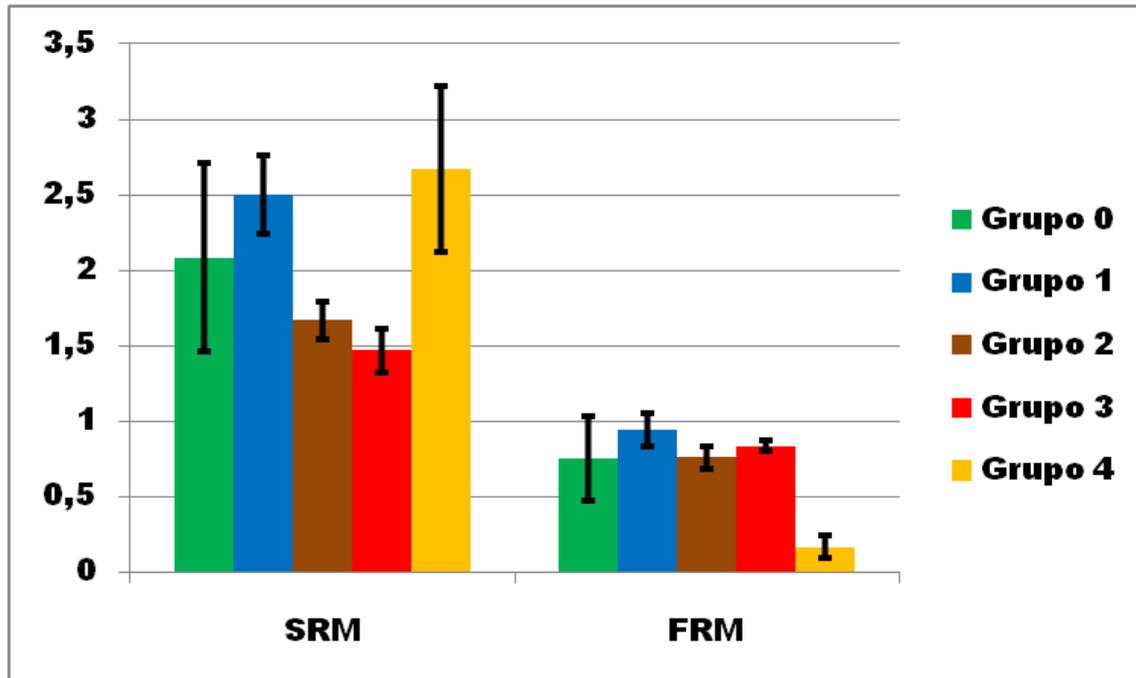


*Figura 51. Representación en diagrama de barras de los valores medios de las variables SM y FM (Slow movement y Fast movement) para cada uno de los grupos de estudio con sus desviaciones estándar. Cada uno de los grupos se representa con un color.*



*Figura 52. Representación en diagrama de barras de los valores medios de las variables SS y FS (Slow Slide y Fast Slide) para cada uno de los grupos de*

*estudio con sus desviaciones estándar. Cada uno de los grupos se representa con un color.*



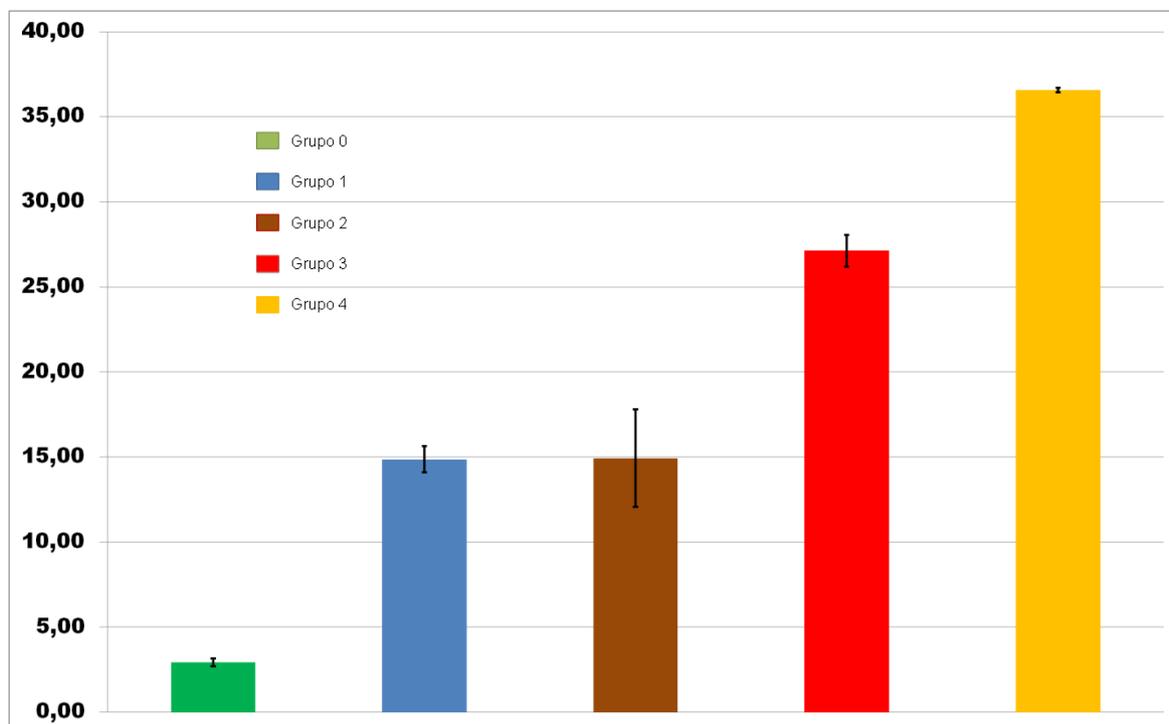
**Figura 53.** Representación en diagrama de barras de los valores medios de las variables SR y FR (Slow Rise y Fast Rise) para cada uno de los grupos de estudio con sus desviaciones estándar. Cada uno de los grupos se representa con un color.

#### **4. Resultados del estudio de la huella plantar.**

Se aprecia una tendencia ascendente de los valores medios en milímetros de la huella plantar para cada grupo de estudio, de forma que se alcanza el máximo valor de la huella en aquellos animales que no se han sometido a ninguna intervención. Por otro lado, la aplicación de biomateriales mejora el tamaño de la huella plantar, y a su vez, mejora aún más con la inclusión de ADSC en el interior del biomaterial, como se puede ver reflejado en la tabla 9 y en la figura 54.

GRUPO	LONGITUD HUELLA 1	LONGITUD HUELLA 2	LONGITUD HUELLA 3	LONGITUD HUELLA 4	LONGITUD HUELLA 5	MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
0	3,25	2,75	2,75	3		2,93	0,23
1	14,58	15,25	14,5	14	16	14,86	0,77
2	12,9	13,63	13,9	14,2	20	14,93	2,87
3	27,83	27,83	27	25,83		27,125	0,94
4	36,5	36,75	36,5	36,5	36,5	36,56	0,125

**Tabla 9. Longitudes medias de cada huella plantar en cada uno de los grupos de estudio. Media y desviación estándar de la longitud de la huella para cada uno de los grupos. Alguno de los animales dejaron 5 huellas en el papel contínuo que se utilizó para medir la huella plantar, no siendo excluidos estos valores en el estudio.**



**Figura 54. Representación en diagrama de barras de los valores medios de la huella en cada grupo de estudio. Encima de cada barra se representa la desviación estándar con otra barra de color negro.**

En la tabla 10, se expresan los valores de p obtenidos después de la realización del análisis estadístico mediante test no paramétricos. Se puede corroborar la diferencia entre cada uno de los grupos de estudio, sin embargo,

también se confirma cómo la utilización del biomaterial no modifica el tamaño de la huella cuando se emplea de forma aislada sin ADSCs asociadas con respecto al conducto relleno de suero heparinizado.

	<b>GRUPO 0</b>	<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>	<b>GRUPO 3</b>	<b>GRUPO 4</b>	<b>Media huella</b>	<b>Desv. Estándar</b>
<b>GRUPO 0</b>	-	<b>0,00000</b>	<b>0,00000</b>	<b>0,00001</b>	<b>0,02900</b>	<b>2,94</b>	<b>0,23</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>0,00000</b>	-	<b>0,05093</b>	<b>0,00000</b>	<b>0,00100</b>	<b>14,87</b>	<b>0,77</b>
<b>GRUPO 2</b>	<b>0,00000</b>	<b>0,05093</b>	-	<b>0,00188</b>	<b>0,00100</b>	<b>14,93</b>	<b>2,87</b>
<b>GRUPO 3</b>	<b>0,00001</b>	<b>0,00000</b>	<b>0,00188</b>	-	<b>0,02400</b>	<b>27,13</b>	<b>0,94</b>
<b>GRUPO 4</b>	<b>0,02900</b>	<b>0,00100</b>	<b>0,00100</b>	<b>0,02400</b>	-	<b>36,5625</b>	<b>0,13</b>

*Tabla 10. Valores de p resultantes del análisis estadístico llevado a cabo para la variable longitud de la huella plantar. A la derecha los valores medios y la desviación estándar.*

## **5.- Resultados neurofisiológicos.**

Una vez explorados cada uno de los animales por el especialista en neurofisiología clínica se obtuvo la tabla 11, se trata de una tabla de valores cuantitativos correspondiente al grado de denervación y de reinervación de cada uno de los grupos musculares explorados.

GRUPO	DEN.BICEPS	DEN.GEM	DEN.TIBANT	DEN.PED	REN.BICEPS	REN.GEM	REN.TIBANT	REN.PED
0	2	3	3	3	1	0	0	0
0	2	3	3	3	0	0	0	0
0	2	3	3	3	0	0	0	0
0	3	3	3	3	0	0	0	0
1	1	2	2	3	1	1	0	0
1	3	3	3	3	1	0	0	0
1	2	2	3	3	1	0	0	0
1	1	1	2	3	1	1	0	0
1	1	1	1	2	1	0	0	0
1	2	2	2	3	1	1	0	0
1	2	2	3	3	1	0	0	0
1	2	2	3	3	1	1	0	0
1	1	2	2	3	1	1	0	0
1	2	2	3	3	0	0	0	0
1	1	2	2	3	1	1	0	0
1	1	2	2	3	1	1	0	0
2	1	1	2	3	1	1	1	0
2	1	1	2	3	2	1	0	0
2	2	2	3	3	2	1	0	0
2	1	1	1	2	2	2	1	0
2	0	1	2	3	2	2	0	0
2	1	1	2	3	2	2	0	0
2	1	1	2	3	2	1	1	0
2	2	2	3	3	2	1	0	0
2	0	1	2	3	2	1	0	0
2	1	1	2	3	2	1	0	0
2	1	1	2	3	2	2	1	0
3	0	1	1	2	2	1	0	0
3	0	0	2	3	2	2	0	0
3	0	1	2	3	2	1	0	0
3	0	1	2	3	2	1	0	0
3	0	1	1	2	2	2	0	0
3	0	1	2	2	2	1	0	0
3	0	1	2	3	2	1	1	0
3	0	0	3	3	1	1	1	0
3	0	0	1	2	3	2	2	1
3	0	2	3	3	2	1	0	0

**Tabla 11. Tabla de resultados del estudio electromiográfico realizado a cada animal. Se indican los valores asignados por el explorador para cada uno de los grupos musculares estudiados. REN: reinervación. DEN: denervación. GEM: músculos gemelos. TIBANT: músculo Tibial Anterior. PED: músculo Pedio/ Intrínsecos de la pata.**

Una vez se procesaron todos los datos se obtuvieron los valores medios y la desviación estándar de la denervación y reinervación de los grupos musculares de cada uno de los grupos de estudio como se expone en la tabla 12 y 13 respectivamente.

Mediante histograma se representaron de forma independiente el grado de denervación y de reinervación de cada grupo muscular (Figuras 55 y 56). Se aprecia una mayor denervación de todos los grupos musculares del grupo de animales tratados sin ningún gesto de reparación quirúrgica (grupo 0). Sin embargo, en el resto de grupos musculares más distales a la lesión no hay presencia de reinervación en ningún caso.

	DEN.BICEPS		DEN.GEM		DEN.TIBANT		DEN.PED	
	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.
<b>GRUPO 0</b>	<b>2,25</b>	<b>0,5</b>	<b>3,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3,00</b>	<b>0,00</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>1,58</b>	<b>0,66</b>	<b>1,92</b>	<b>0,51</b>	<b>2,33</b>	<b>0,65</b>	<b>2,92</b>	<b>0,29</b>
<b>GRUPO 2</b>	<b>1</b>	<b>0,63</b>	<b>1,18</b>	<b>0,40</b>	<b>2,09</b>	<b>0,54</b>	<b>2,91</b>	<b>0,30</b>
<b>GRUPO 3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,80</b>	<b>0,63</b>	<b>1,90</b>	<b>0,74</b>	<b>2,60</b>	<b>0,52</b>

**Tabla 12. Tabla de medias aritméticas y desviaciones estándar de los valores asignados en el estudio electromiográfico distribuidos por grupos. REN: reinervación. DEN: denervación. GEM: músculos gemelos. TIBANT: músculo Tibial Anterior. PED: músculo Pedio/ Intrínsecos de la pata.**

	REN.BICEPS		REN.GEM		REN.TIBANT		REN.PED	
	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.	MEDIA	DESV.EST.
<b>GRUPO 0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>0,92</b>	<b>0,29</b>	<b>0,58</b>	<b>0,51</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>GRUPO 2</b>	<b>1,91</b>	<b>0,30</b>	<b>1,36</b>	<b>0,50</b>	<b>0,36</b>	<b>0,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>GRUPO 3</b>	<b>2,00</b>	<b>0,47</b>	<b>1,30</b>	<b>0,48</b>	<b>0,40</b>	<b>0,70</b>	<b>0,10</b>	<b>0,32</b>

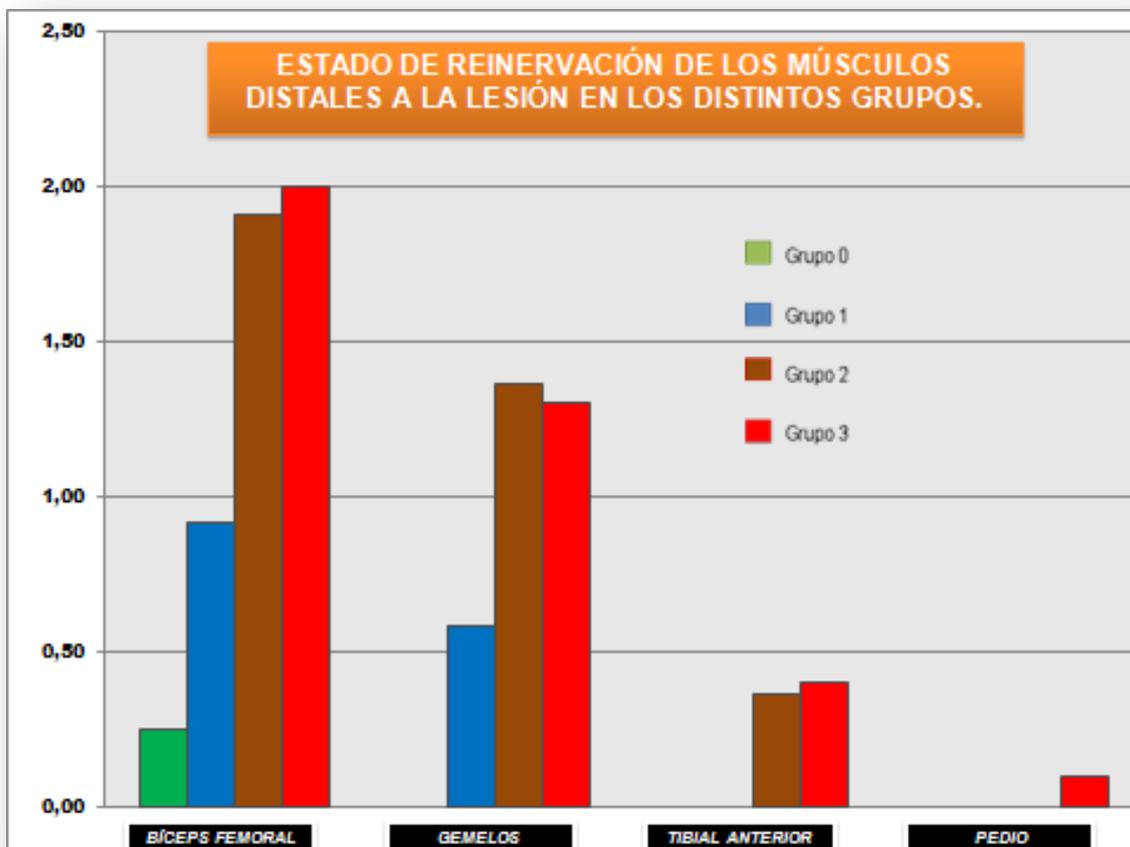
**Tabla 13. Tabla de medias aritméticas y desviaciones estándar de los valores asignados en el estudio electromiográfico distribuidos por grupos. REN: reinervación. GEM: músculos gemelos. TIBANT: músculo Tibial Anterior. PED: músculo Pedio/ Intrínsecos de la pata.**

Cuando se utilizan conductos sintéticos que contienen suero heparinizado en su interior (grupo 1), podemos observar cómo el grado de denervación es inferior al grupo que no recibe ningún tipo de tratamiento del nervio lesionado (grupo 0), pero sigue siendo, en líneas generales, bastante elevado. En cuanto a la reinervación, existe una ausencia absoluta de reinervación de los músculos tibial anterior y los músculos del pie.

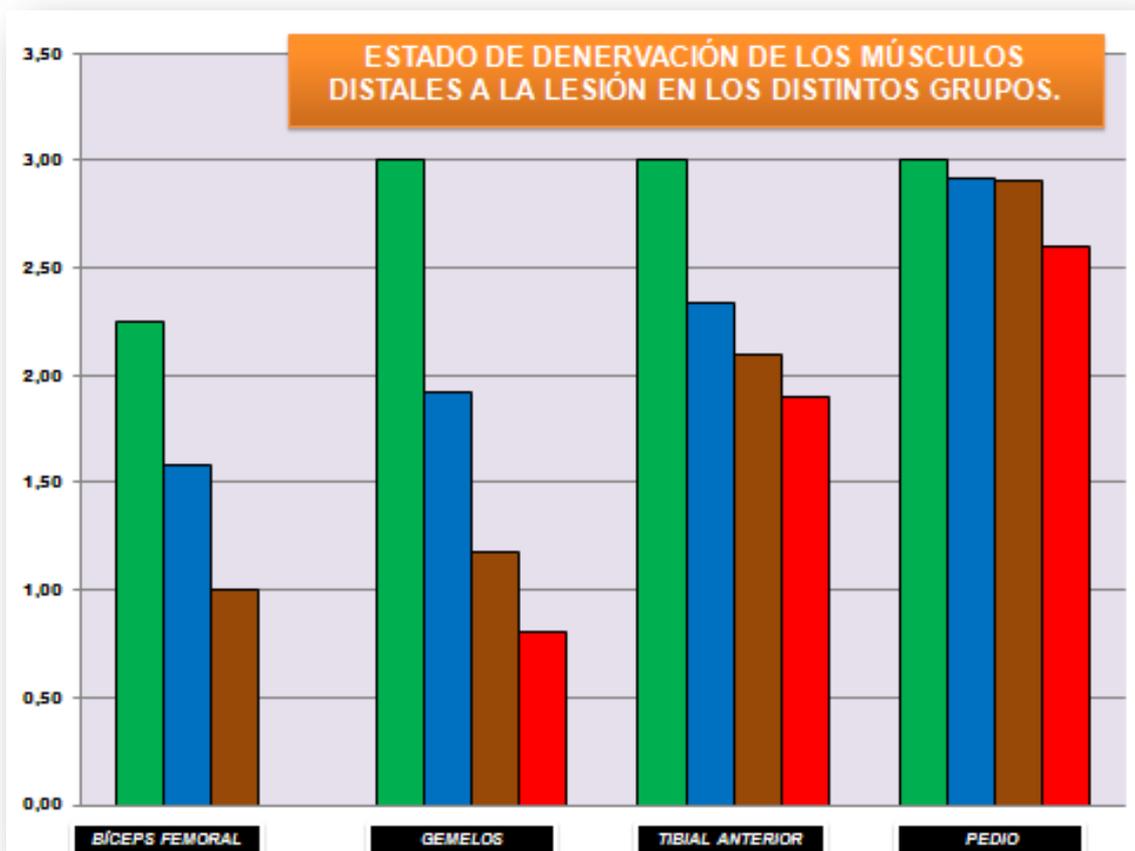
En cambio, la utilización de biomateriales (grupo 2) expresa la mejora del grado de denervación de los músculos estudiados, fundamentalmente a nivel gemelar, donde existen diferencias significativas con respecto al grupo tratado simplemente con conductos rellenos de suero. A su vez, en este grupo (grupo 2) se aprecia una mejor reinervación del bíceps y gemelos que en el grupo 1, no existiendo diferencias para los músculos más distales.

Cuando se añaden ADSCs al biomaterial, el grado de denervación de todos los músculos disminuye en general, destacando la ausencia de signos de denervación en el bíceps femoral en todos los animales de este grupo. Además, el grado de reinervación de todos los grupos musculares se incrementa muy levemente con respecto a los animales tratados con biomateriales de forma aislada (grupo 2) no existiendo diferencias significativas para ninguna de las variables de reinervación.

Sin embargo, se detectaron signos de reinervación leve a nivel del Pedio en algún caso aislado del grupo 3, fenómeno que no ocurrió en ninguno de los animales del resto de grupos.



**Figura 55:** Representación en diagrama de barras del estado de reinervación de cada grupo muscular en función del tratamiento aplicado. En verde: Grupo 0. En azul: Grupo 1. En marrón: Grupo 2. En rojo: grupo 3.



**Figura 56:** Representación en diagrama de barras del estado de denervación de cada grupo muscular en función del tratamiento aplicado. En verde: **Grupo 0**. En azul: **Grupo 1**. En marrón: **Grupo 2**. En rojo: **grupo 3**.

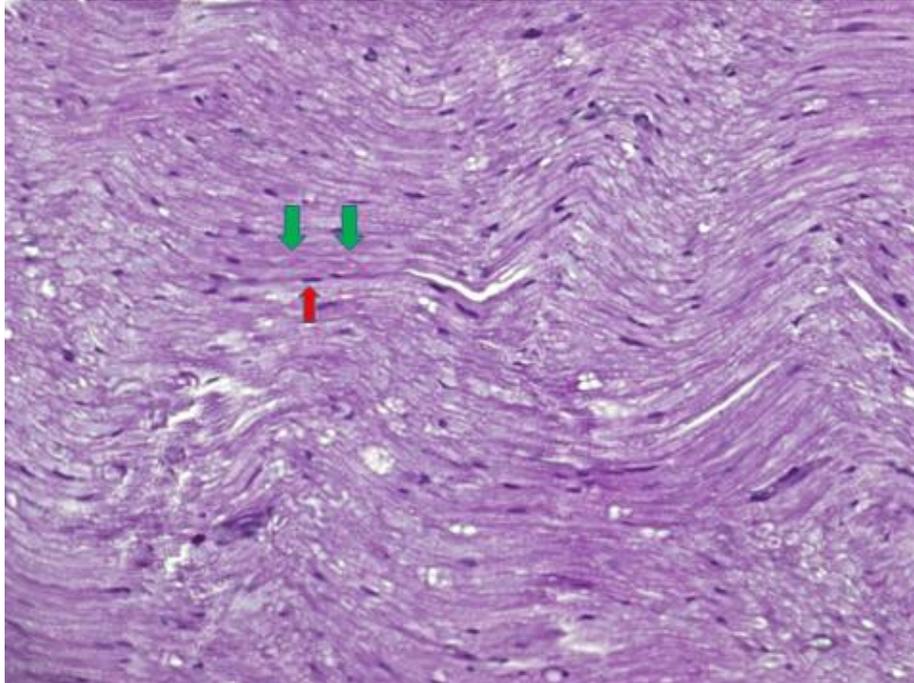
0								
	DEN.BICEPS	DEN.GEM	DEN.TIBANT	DEN.PED	REN.BICEPS	REN.GEM	REN.TIBANT	REN.PEDIO
GRUPO 0	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO 1	0,133	0,004	0,103	0,862	0,058	0,103	1,000	1,000
GRUPO 2	0,010	0,001	0,018	0,851	0,001	0,001	0,343	1,000
GRUPO 3	0,003	0,002	0,024	0,304	0,002	0,002	0,454	0,839
1								
	DEN.BICEPS	DEN.GEM	DEN.TIBANT	DEN.PED	REN.BICEPS	REN.GEM	REN.TIBANT	REN.PEDIO
GRUPO 0	0,133	0,004	0,103	0,862	0,058	0,103	1,000	1,000
GRUPO 1	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO 2	0,091	0,006	0,379	0,976	0,000	0,009	0,151	1,000
GRUPO 3	0,000	0,001	0,203	0,228	0,000	0,017	0,254	0,722
2								
	DEN.BICEPS	DEN.GEM	DEN.TIBANT	DEN.PED	REN.BICEPS	REN.GEM	REN.TIBANT	REN.PEDIO
GRUPO 0	0,010	0,001	0,018	0,851	0,001	0,001	0,343	1,000
GRUPO 1	0,091	0,006	0,379	0,976	0,000	0,009	0,151	1,000
GRUPO 2	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO 3	0,001	0,223	0,557	0,251	0,756	0,809	0,918	0,705
3								
	DEN.BICEPS	DEN.GEM	DEN.TIBANT	DEN.PED	REN.BICEPS	REN.GEM	REN.TIBANT	REN.PEDIO
GRUPO 0	0,003	0,002	0,024	0,304	0,002	0,002	0,454	0,839
GRUPO 1	0,000	0,001	0,203	0,228	0,000	0,017	0,254	0,722
GRUPO 2	0,001	0,223	0,557	0,251	0,756	0,809	0,918	0,705
GRUPO 3	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 14. Valores de p en el test estadístico no paramétrico (Test de Mann-Whitney). Se resalta de amarillo los valores para los que existe significación estadística (Valor de  $p < 0,05$ ).**

## **5. Resultados histológicos.**

### **NERVIO CIÁTICO NORMAL. CONTROL HISTOLÓGICO.**

Se observa cápsula de tejido conectivo, colágeno y los elementos de origen nervioso como núcleos de células de Schwann, axones de disposición paralela, vasos sanguíneos y macrófagos con una disposición homogénea. Ausencia total de signos de degeneración walleriana y de elementos inflamatorios. Se aprecian nódulos de Ranvier en algunos cortes histológicos (figura 57).



**Figura 57. Imagen histológica de nervio ciático normal (control histológico). Tinción con HE. 20X. Flecha roja: célula de Schwann de disposición paralela al axón. Flechas verdes: nódulos de Ranvier en un corte longitudinal.**

### GRUPO 3: implante de conducto nervioso de colágeno con ADSC y biomateriales de fibrina y agarosa.

Distinguiremos varias partes bien diferenciadas como se describió en el apartado de material y métodos de esta Tesis Doctoral:

#### **A. Nervio Ciático proximal a la lesión.**

Arquitectura histológica (H-E): Se identifican claramente los elementos histológicos del nervio periférico conservando su arquitectura microscópica. Signos de degeneración walleriana que catalogaríamos como leves en algunas muestras.

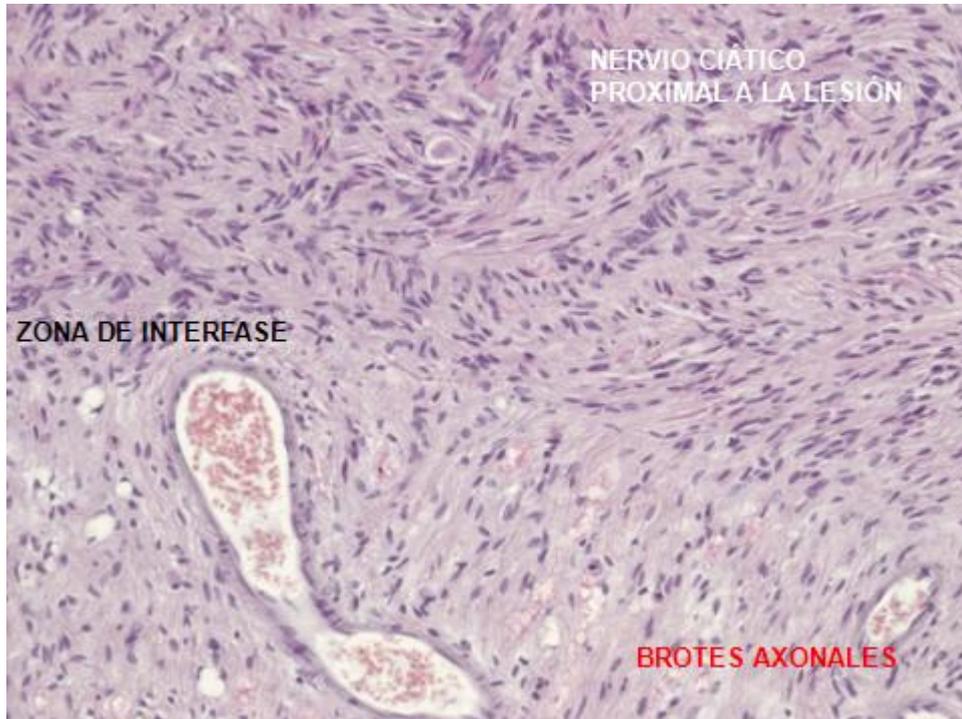
Inflamación: No se observa reacción inflamatoria en los componentes histológicos estudiados.

Mielinización: El grado de mielinización estudiado mediante la técnica de Kluvert-Barrera es moderado.

Matriz extracelular: Con el método de Picosirius se aprecia una reacción histoquímica positiva y leve para fibras colágenas alrededor de cada fibra nerviosa con una disposición paralela al eje del nervio.

## B. Conducto nervioso proximal.

Arquitectura histológica (H-E). Se observa la inserción del cabo proximal en la luz del tubo conservando su estructura histológica, y en la porción luminal del conducto nervioso presenta brotes axonales de regeneración que se continúan hasta el interior del conducto. Vasos sanguíneos en continuidad desde la porción distal del nervio lesionado hacia la luz del conducto nervioso (Figura 58).



**Figura 58.** Se aprecia la interfase entre el tejido nervioso perteneciente al cabo proximal y el tejido que comienza a regenerar en forma de brotes axonales desde ese cabo hacia el interior del conducto nervioso. Tinción con hematoxilina-eosina 20X.

Signos de degeneración walleriana. Se aprecian más signos de degeneración walleriana en la zona de interfase entre el cabo proximal y el frente de regeneración y están más presentes conforme más distal en dicho cabo proximal.

Inflamación. En todos los casos se aprecian signos inflamatorios que se catalogan como moderados en la pared del conducto nervioso con escasa degradación de la misma, acompañado de algunas células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño.

Mielinización. El grado de mielinización estudiado mediante la técnica de Kluvert-Barrera es moderado en el cabo del nervio proximal. En el tejido que regenera a través del conducto nervioso se aprecia poca o ninguna mielinización. La mielina se aprecia de color azul celeste con una disposición lineal a nivel del cabo distal. En los brotes de regeneración hay escasa reacción positiva para mielina.

Matriz extracelular. Se observa reacción positiva y leve para colágeno con la técnica de PS manteniéndose la orientación de las fibras. En la interfase se observa una desorganización de las fibras colágenas envolviendo fascículos de brotes axonales hacia el sitio de regeneración.

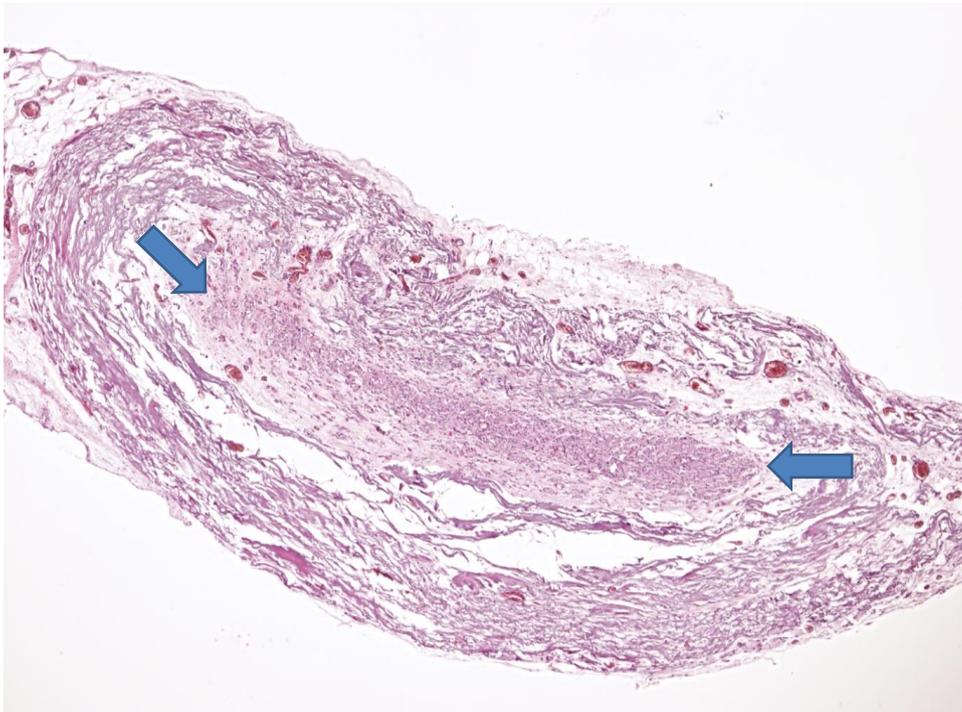
### **C. Porción central del conducto nervioso.**

Arquitectura histológica. A nivel central se aprecia un colapso de la estructura tubular del conducto nervioso y degradación moderada desde la pared externa. En el centro se observan brotes de regeneración nerviosa organizados en pequeños fascículos. En cuanto a la vascularización se observa un incremento de vasos con un mayor diámetro que en los cortes anteriores (Figura 59).

Signos de degeneración walleriana. No hay signos de degeneración walleriana. Inflamación. Se observa infiltrado inflamatorio moderado. No se aprecian células gigantes multinucleadas.

Mielinización. No se observa reacción positiva para la tinción de K-B.

Matriz extracelular. Existe una reacción positiva (+/+++) a Picrosirius dispuesta alrededor de los fascículos axonales.



**Figura 59. Corte transversal del conducto nervioso a nivel central. Las flechas indican los brotes de regeneración axonal que ocupan una posición central en el conducto nervioso. Destacar la degradación sólo parcial del conducto nervioso y el colapso de la luz del conducto nervioso.**

#### D. Porción distal del conducto nervioso.

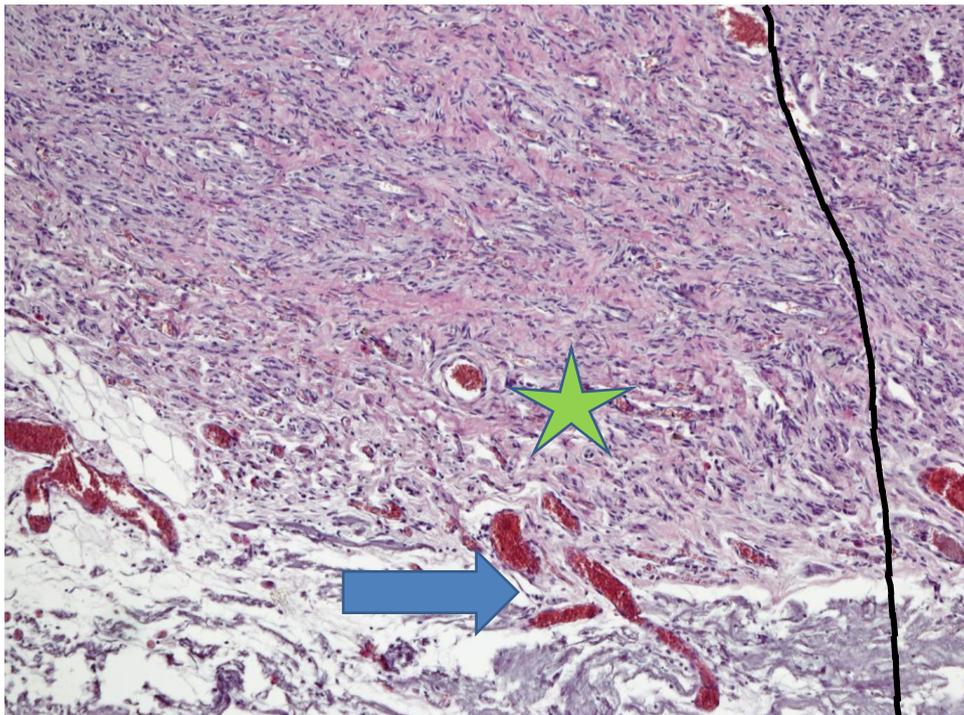
Arquitectura histológica. Se observa regeneración nerviosa en la totalidad del conducto nervioso (los brotes axonales llegan al cabo distal del conducto nervioso sintético). Estos brotes axonales se disponen de forma paralela al cabo distal del nervio lesionado, y sólo penetran en el interior del cabo parcial algunos de ellos. El resto de axones pasan de forma paralela al cabo distal del conducto nervioso, acompañados de vasos sanguíneos. No signos de colapso del conducto nervioso (Figura 60).

Signos de degeneración walleriana. Presencia moderada de signos de degeneración.

Inflamación. Presencia moderada de inflamación con escasa presencia de células gigantes.

Mielinización. Presencia de mielinización escasa.

Matriz extracelular. Intensa (+++/+++) reacción para fibras colágenas que se encuentran organizadas en fibras paralelas y gruesas para la tinción con PS. Elevada densidad de tejido conectivo que envuelve los brotes axonales en todo el diámetro del conducto.



**Figura 60.** La flecha indica los vasos sanguíneos atravesando la pared del conducto que está adelgazada. Distribución de los axones de forma paralela al cabo distal del nervio lesionado. El asterisco muestra los brotes axonales que llegan hasta la zona de interfase (línea discontinua) y se introducen parcialmente en el cabo nervioso distal. H-E. 10X.

## **E. Nervio ciático distal a la lesión.**

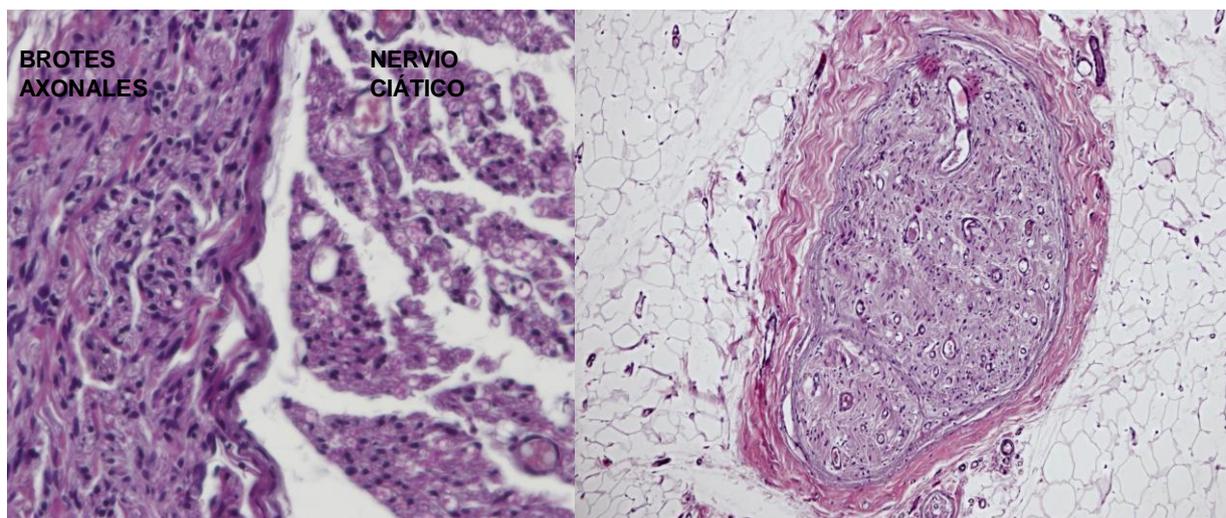
Arquitectura histológica. Se mantiene la arquitectura histológica normal del nervio periférico. En algunas de las muestras, se observó regeneración de brotes axonales organizada en fascículos y acompañada de neovasos, a su alrededor se observa el resto del nervio distal normal con signos de degeneración intensa. En algunas muestras, se ha visualizado la disposición de los brotes axonales organizados en fascículos pero dispuestos alrededor del epineuro del nervio periférico, por tanto, la regeneración nerviosa no se ha llevado a cabo, como se propugnó previamente a través del nervio distal, es decir, que no se produce a su través sino que busca otros caminos (Figura 61).

Signos de degeneración walleriana. Existen signos moderados de degeneración walleriana.

Inflamación. Se observa escaso infiltrado inflamatorio y sin células gigantes, en la mayoría de las muestras no se aprecia dicho infiltrado.

Mielinización. Reacción a la técnica de K-B negativa.

Matriz extracelular. Reacción histoquímica intensa para las fibras de colágeno en la mayoría de las muestras de nervio ciático distal examinadas. Se observa que las fibras de colágeno organizan los brotes de regeneración en fascículos.



**Figura 61. Izquierda: “collateral sprouting”: brotes axonales (colaterales) que crecen del cabo nervioso proximal pero que llegan al músculo por otras vías diferentes al nervio nativo. En esta figura se aprecian los brotes axonales de disposición paralela al cabo distal. A la izquierda de la imagen se ven los brotes axonales y a la derecha el nervio degenerado, entre ambos, una cápsula de colágeno que es el epineuro del nervio. Derecha: imagen de sección transversal de nervio ciático más distal al corte anterior una vez que se ha ramificado el tronco principal en ramas más pequeñas para los vientres musculares. No se demuestra la presencia de brotes axonales en el interior del conducto nervioso, ni tampoco en la periferia. En este animal se aprecian signos neurofisiológicos de reinervación, mejora de la huella plantar y ausencia de úlceras neurotróficas.**

## GRUPO 2: implante de conducto nervioso de colágeno con biomateriales de fibrina y agarosa.

### **A. Nervio ciático proximal.**

Arquitectura histológica. Se encuentra conservada la estructura histológica normal del nervio.

Signos de degeneración walleriana. Escasa.

Inflamación. No signos de inflamación en las muestras observadas.

Mielinización. Presencia de una reacción histoquímica a mielina intensa con la técnica de KB.

Matriz extracelular. Se observa una reacción positiva a PS que se cataloga como moderada con organización paralela en fibras gruesas.

### **B. Conducto nervioso proximal.**

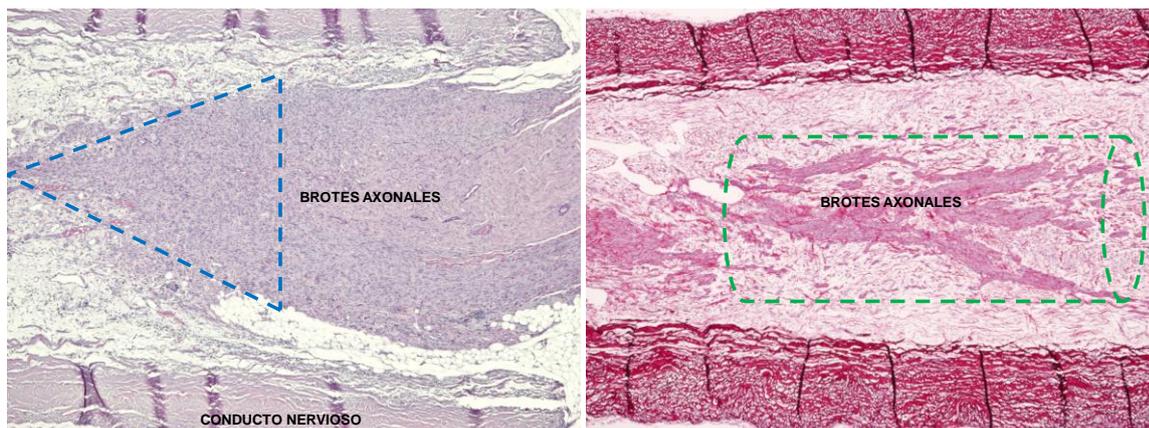
Arquitectura histológica. Se observa la pared del conducto nervioso íntegro y la inserción del nervio proximal en el lumen del conducto nervioso. No hay colapso de la luz del tubo. Alta presencia de brotes axonales hacia el interior del conducto nervioso, que no cubre la totalidad del diámetro del conducto encontrándose rodeada por tejido conectivo de tipo laxo muy vascularizado adoptando los brotes axonales una disposición cónica (Figura 62).

Signos de degeneración walleriana. Escasa.

Inflamación. Infiltrado inflamatorio moderado con presencia de células gigantes.

Mielinización. Presencia escasa de signos de mielinización con la tinción de KB en el cabo proximal del interior del tubo.

Matriz extracelular. Positividad moderada a la técnica de PS. Disposición paralela de las fibras colágenas. En la interfase de la mayoría de las muestras (8/12) se observa una desorganización de las fibras colágenas envolviendo fascículos de brotes axonales hacia el sitio de regeneración.



**Figura 62. Cortes histológicos longitudinales de conductos nerviosos. A la izquierda, se muestra conducto nervioso relleno de biomateriales de fibrina y agarosa. Se muestra la distribución cónica del frente de crecimiento de los brotes axonales. Técnica de H-E. 4X. A la derecha, se muestra conducto nervioso relleno de biomateriales y ADSC. Destaca la distribución cilíndrica de los brotes axonales a lo largo del conducto nervioso que casi toman contacto con el cabo nervioso distal. Técnica de picrosirius. 4X.**

### C. Conducto nervioso central.

Arquitectura histológica. Se observa en la porción central del conducto nervioso un frente de brotes axonales rodeadas por tejido conectivo laxo muy vascularizado. No se observa colapso de la luz. Los brotes ocupan en algún caso hasta un 20% del diámetro total del conducto nervioso, en muchos casos es inferior y la disposición de los brotes es afilada (cónica). No se observa degradación tubular en ningún caso. Signos de degeneración walleriana. Ausencia de signos.

Inflamación. Presencia abundante de signos inflamatorios con células gigantes multinucleadas en la mayoría de las muestras.

Mielinización. Presencia escasa de reactividad para la mielina mediante la técnica de KB.

Matriz extracelular. Positividad moderada a la técnica de PS. Gran cantidad de tejido conectivo laxo que envuelve los brotes axonales; el tejido conectivo se encuentra organizado de forma paralela a los brotes axonales.

### D. Conducto nervioso distal.

Arquitectura histológica. En la mayoría de los casos no se aprecia continuación de los brotes axonales, no hay signos de regeneración axonal. Destaca la presencia de un tapón de tejido adiposo entre el frente de regeneración axonal y el cabo distal del nervio lesionado. No colapso de la luz del conducto nervioso. Gran cantidad de tejido conectivo denso alrededor del conducto nervioso (Figura 63).

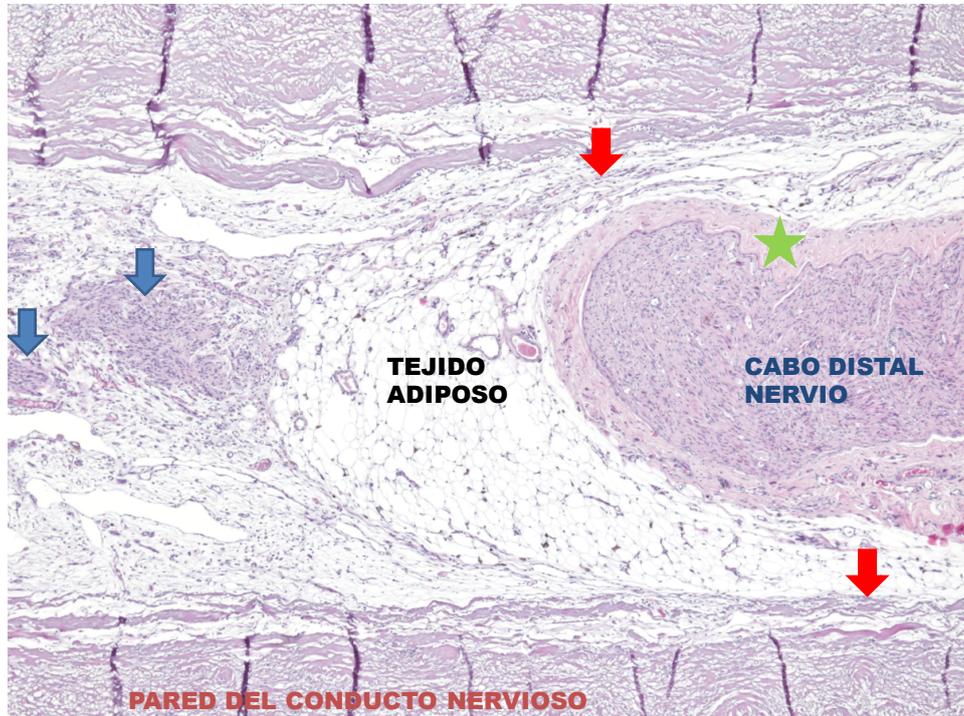
Signos de degeneración walleriana. Ausencia.

Inflamación. Signos inflamatorios catalogados como moderados-abundantes.

Presencia abundante de células gigantes multinucleadas.

Mielinización. Escasa reactividad a la tinción con KB (+/+++).

Matriz extracelular. Abundante presencia de tejido conectivo laxo dispuesto conjuntamente al tejido graso entre el cabo distal del nervio y el frente de brotes axonales.



**Figura 63. Sección longitudinal del conducto nervioso distal y cabo distal del nervio ciático seccionado. Flechas azules indican brotes axonales procedentes del cabo proximal. Flechas rojas indican brotes axonales que crecen pegados a la pared del conducto nervioso y que continúan por la pared del conducto nervioso sin contactar con el cabo distal. Asterisco indica fibrosis epineural en un nervio ciático distal con signos severos de degeneración walleriana. Se aprecia un infiltrado de tejido adiposo que se interpone entre el cabo distal y el frente de regeneración axonal. 4X. H-E.**

#### **E. Nervio ciático distal.**

Arquitectura histológica (Figura 63). Engrosamiento capsular epineural intenso.

Aumento del tejido conectivo.

Signos de degeneración walleriana. Abundantes signos de degeneración walleriana

Inflamación. No hay signos de infiltrado inflamatorio

Mielinización. Ausencia de mielina.

Matriz extracelular. Gran cantidad de tejido conectivo infiltrado en el interior del cabo distal del nervio lesionado. Desestructuración de la arquitectura del nervio y colapso de los fascículos.

## GRUPO 1: implante de conducto nervioso sintético relleno de suero heparinizado.

### **A. Nervio ciático proximal.**

Arquitectura histológica. Se aprecia una regeneración nerviosa muy escasa y además muy dispersa. La pared del conducto nervioso no presenta degradación (Figura 64).

Signos de degeneración walleriana. Signos muy severos, sobre todo en la zona de anastomosis.

Inflamación. Si escasa. Ausencia de células gigantes multinucleadas.

Mielinización. Intensidad alta de la mielina con la tinción de KB.

Matriz extracelular. Se observa una reacción positiva a PS que se cataloga como moderada con organización paralela en fibras gruesas.

### **B. Conducto nervioso proximal.**

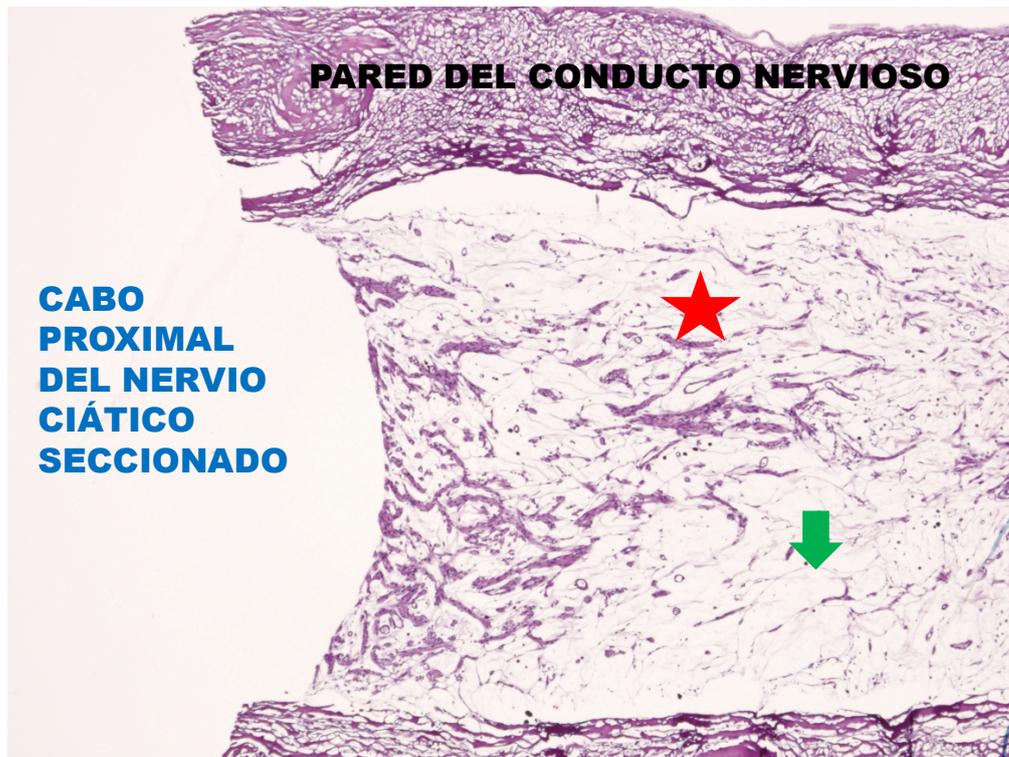
Arquitectura histológica. La arquitectura histológica se encuentra conservada. Éste presenta un aumento importante de la degeneración walleriana en la zona de anastomosis. En relación a la cápsula del nervio ciático se ve engrosada y desorganizada. Los brotes axonales se observan dispersos y desorganizados en la porción proximal rodeados por matriz extracelular presentando zonas de degeneración (Figura 64).

Signos de degeneración walleriana. Signos severos de degeneración.

Inflamación. Presencia de signos abundantes de proceso inflamatorio. Presencia de células gigantes.

Mielinización. Reacción a la mielina moderada.

Matriz extracelular. En el interior del conducto proximal hay tejido conectivo de carácter laxo con reacción moderada para el método de picosirius. No se observa una integración entre la matriz extracelular generada en el interior del tubo y la pared tubular.



**Figura 64. Sección longitudinal del conducto nervioso proximal con el cabo nervioso proximal desprendido. Se visualizan los brotes de regeneración axonal (asterisco) distribuidos en el diámetro del conducto nervioso y que se afilan conforme se adentran en el conducto nervioso adoptando una distribución cónica o triangular. Se aprecia el infiltrado de tejido conectivo que envuelve a los brotes axonales (flecha verde). 10X. HE.**

### **C. Conducto nervioso central.**

Arquitectura histológica. Ausencia de tejido nervioso de regeneración en el interior del conducto nervioso, solamente se aprecia tejido conectivo laxo (Figura 64)

Signos de degeneración walleriana. Ausencia de signos de degeneración.

Inflamación. Ausencia de infiltrado inflamatorio.

Mielinización. Ausencia de reacción a la técnica de KB.

Matriz extracelular. Gran cantidad de tejido conectivo laxo rica en vasos. Escasos brotes de regeneración axonal cerca del extremo proximal del nervio lesionado.

### **D. Conducto nervioso distal.**

Arquitectura histológica. Ausencia de tejido nervioso de regeneración en el interior del conducto nervioso, solamente se aprecia tejido conectivo laxo. Colapso del tubo en algunas muestras.

Signos de degeneración walleriana. Ausencia.

Inflamación. No infiltrado inflamatorio.

Mielinización. Ausencia de reacción a la técnica de KB.

Matriz extracelular. Gran cantidad de tejido conectivo laxo rica en vasos. Escasos brotes de regeneración axonal cerca del extremo proximal del nervio lesionado.

### E. Nervio ciático distal.

Arquitectura histológica. Se mantiene la arquitectura normal del nervio ciático. Signos de degeneración walleriana. Intensa degeneración walleriana en el cabo distal del nervio lesionado (Figura 65).

Inflamación. Infiltrado inflamatorio abundante.

Mielinización. Ausencia de mielinización.

Matriz extracelular. Aumento de las fibras colágenas laxas. Engrosamiento de la cápsula del nervio.



**Figura 65. Sección longitudinal de conducto nervioso sintético. Asterisco muestra el infiltrado de tejido conectivo laxo muy denso que se aprecia en el lumen del conducto nervioso sintético que se continúa hasta el cabo nervioso distal (almohadilla a la derecha de la imagen). Entre el tejido conectivo y el cabo nervioso distal se aprecia un infiltrado de tejido adiposo (flecha) que envuelve al nervio. 4X. HE.**

Grupo 0 (CONTROL 1). Lesión del nervio ciático sin gesto de reparación quirúrgica.

**A. Cabo nervioso proximal.**

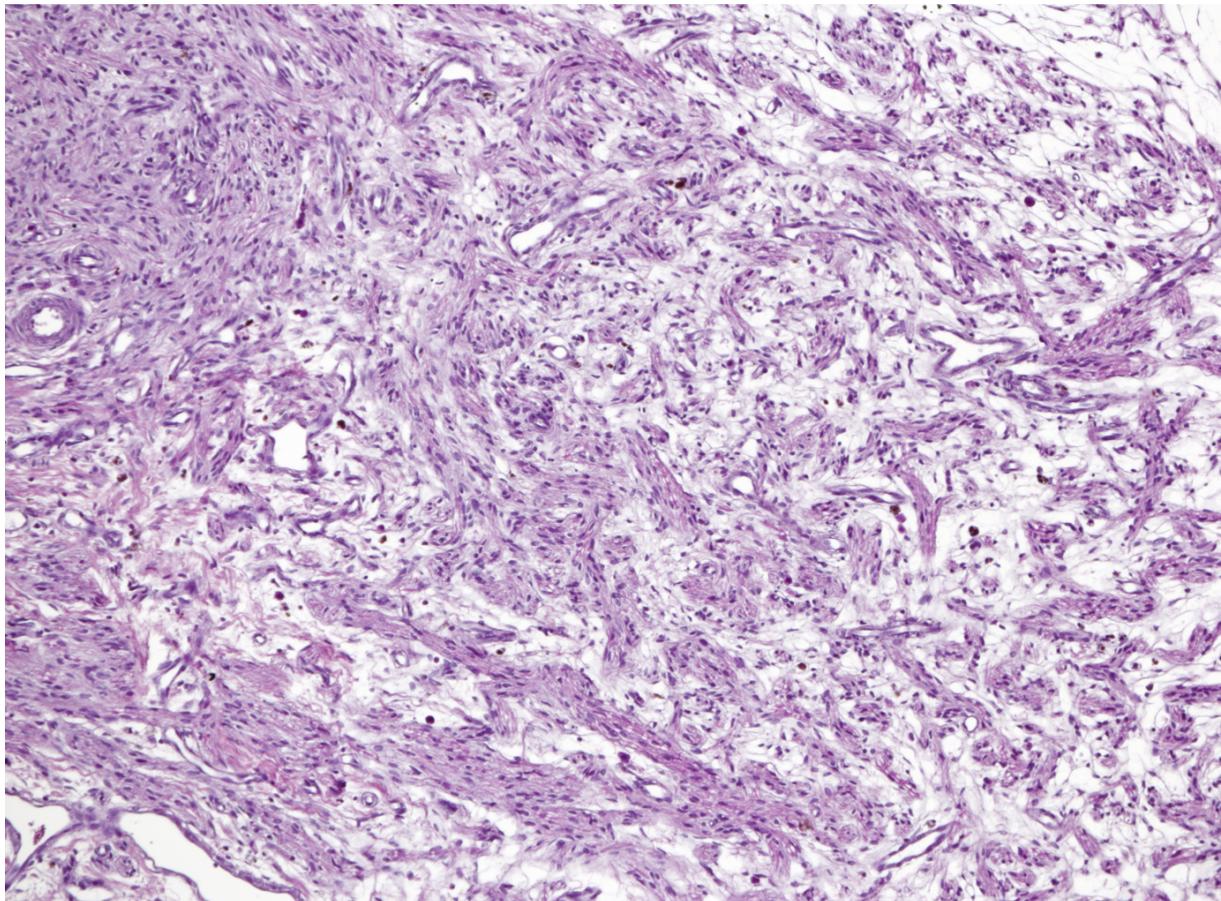
Arquitectura histológica. Se conserva la arquitectura normal del nervio. Crecimiento de brotes axonales rodeados por gran cantidad de tejido conectivo.

Degeneración walleriana. Signos muy abundantes de degeneración walleriana.

Inflamación. Infiltrado inflamatorio severo con algunas células multinucleadas (Figura 66).

Mielinización. Se aprecian reacción moderada a la técnica de KB.

Matriz extracelular. Infiltrado abundante de tejido conectivo tanto en el epineuro como en el perineuro del nervio lesionado.



**Figura 66. Corte histológico del neuroma hallado en el cabo nervioso proximal. Se aprecian los brotes de regeneración axonal inmersos en tejido conectivo con un importante infiltrado inflamatorio y signos severos de degeneración walleriana. 10X. HE.**

## **B. Cabo nervioso distal.**

Arquitectura histológica. Se conserva la arquitectura normal del nervio. Importante retracción del cabo nervioso distal. Severo engrosamiento del epineuro.

Degeneración walleriana. Signos muy abundantes de degeneración walleriana.

Inflamación. Ausencia de infiltrado inflamatorio.

Mielinización. No hay reacción a la técnica de KB.

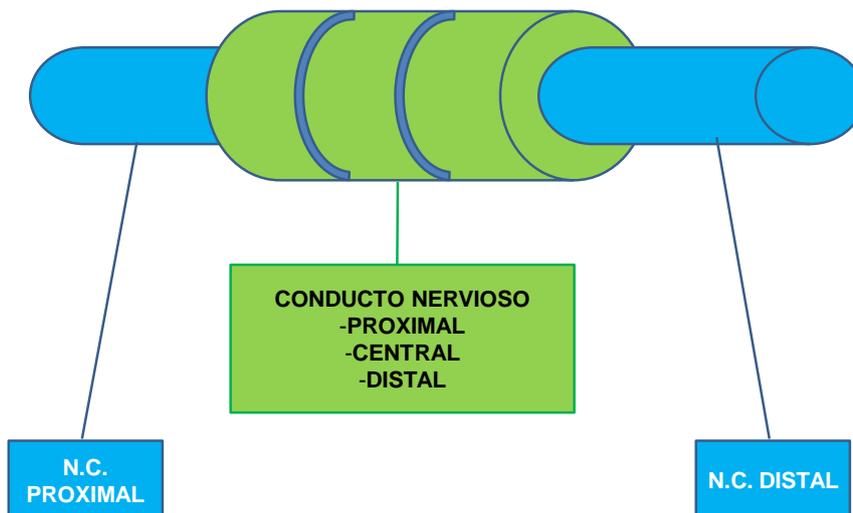
Matriz extracelular. Infiltrado abundante de tejido conectivo tanto en el epineuro como en el perineuro del nervio ciático distal.

## **INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Los resultados inmunohistoquímicos se dividieron en función del tipo de anticuerpo aplicado en cada caso.

### **A. NEUROFILAMENTO (Tabla 15).**

El patrón encontrado es un patrón citoplasmático, puesto que el sistema de transporte axonal de la neurona se ubica en el citoplasma de forma principal. En la mayoría de las muestras se demuestra una irregularidad de la estructura axonal. La orientación de las fibras es paralela, salvo en la porción central y distal del conducto nervioso, donde las fibras adoptan una disposición más caprichosa y se distribuye de una forma heterogénea.



**Figura 67. Esquema representativo de la división realizada en el nervio periférico problema para determinar los resultados para cada uno de los grupos.**

<b>NEUROFILAMENTO</b>					
	N. C. PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO CENTRAL	CONDUCTO NERVIOSO DISTAL	N. C. DISTAL
<b>CONTROL</b> (nervio ciático sano)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
<b>GRUPO 1</b> (conducto nervioso con suero heparinizado)	++ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++	+ / +++
<b>GRUPO 2</b> (conducto nervioso con biomateriales de FA)	++ / +++	++ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
<b>GRUPO 3</b> (conducto nervioso con biomateriales y ADSC)	++ / +++	++ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++

**Tabla 15. Resultados de la reacción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-neurofilamento a las muestras histológicas obtenidas del nervio ciático problema de cada uno de los animales de los grupos de estudio (-/+++ : ausencia de reacción; +/+++ , reacción leve; ++/+++ reacción moderada; +++/+++ reacción intensa).**

## B. PROTEINA S100 (Tabla 16).

En este caso, el patrón de tinción es citoplasmático y nuclear de las células de Schwann. Generalmente, la disposición de las fibras es paralela en la mayoría de las muestras analizadas y orientadas hacia la porción distal del conducto nervioso.

<b>PROTEINA S100</b>					
	N. C. PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO CENTRAL	CONDUCTO NERVIOSO DISTAL	N. C. DISTAL
<b>CONTROL</b> (nervio ciático sano)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
<b>GRUPO 1</b> (conducto nervioso con suero heparinizado)	++ / +++	++ / +++	+++ / +++	++ / +++	++ / +++
<b>GRUPO 2</b> (conducto nervioso con biomateriales de FA)	++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / +++
<b>GRUPO 3</b> (conducto nervioso con biomateriales y ADSC)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / +++

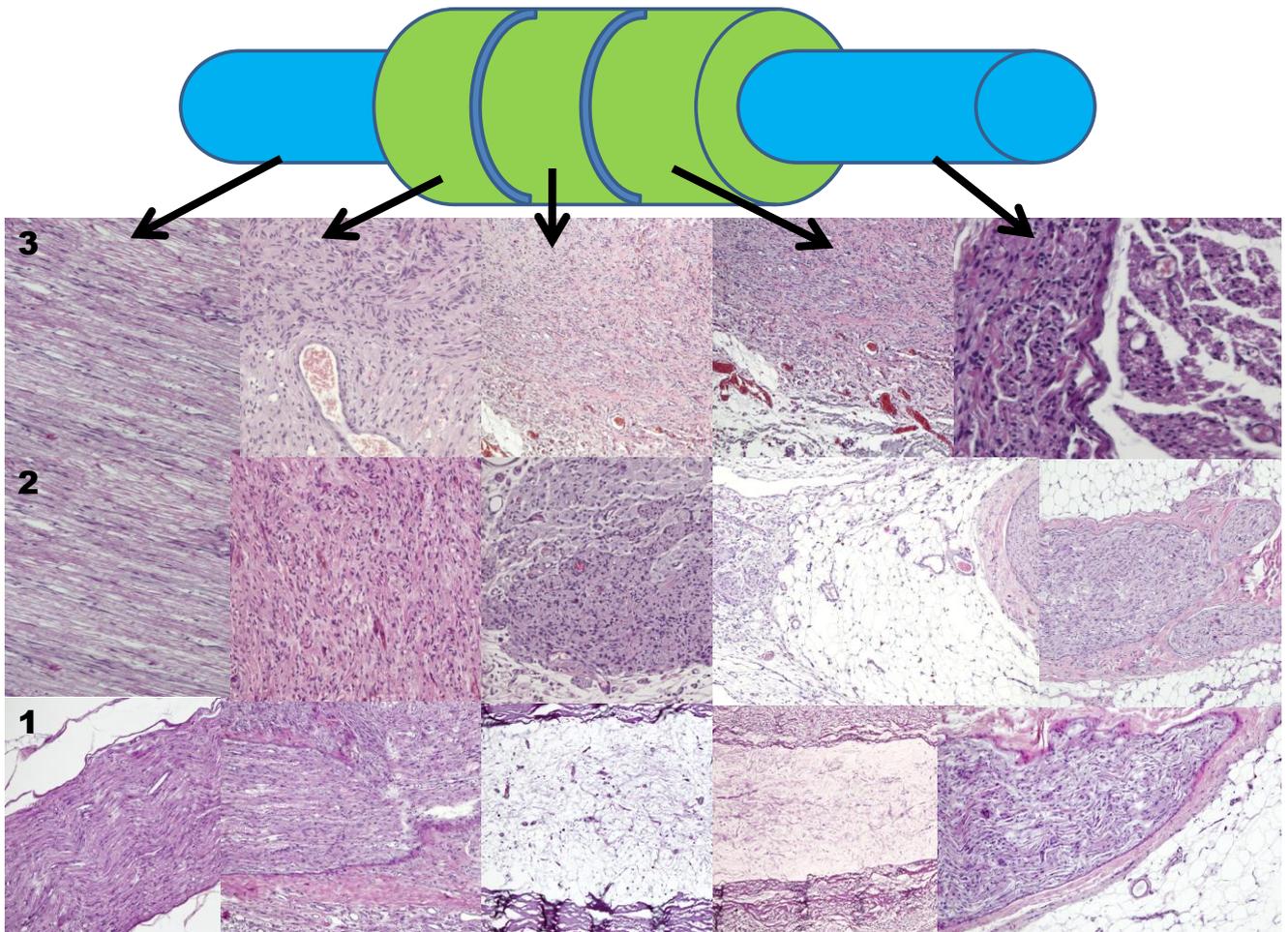
**Tabla 16. Resultados de la reacción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-S100 a las muestras histológicas obtenidas del nervio ciático problema de cada uno de los animales de los grupos de estudio (-/+++ : ausencia de reacción; +/+++ , reacción leve; ++/+++ reacción moderada; +++/+++ reacción intensa).**

## C. LAMININA (Tabla 17).

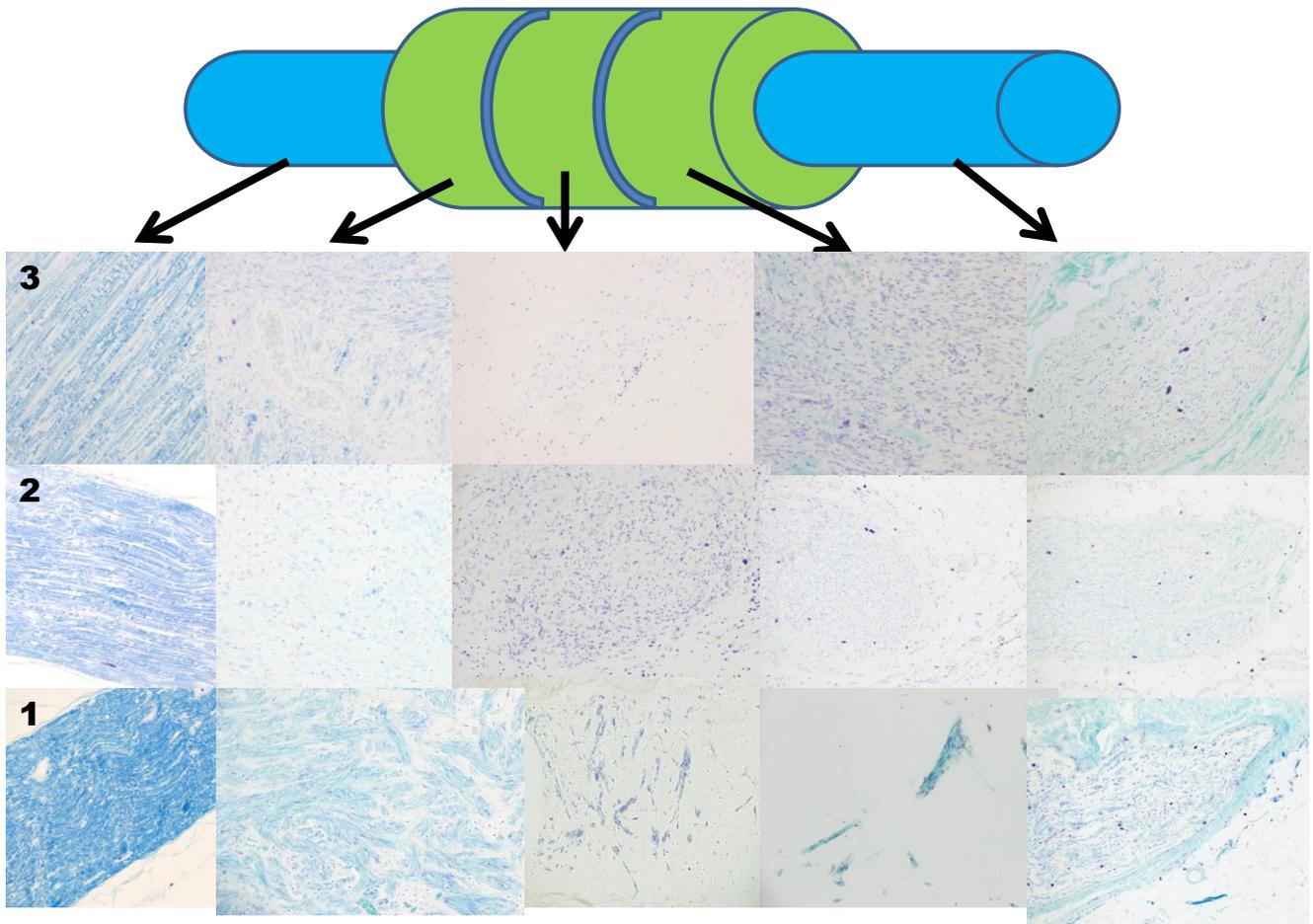
El patrón encontrado en este caso es extracelular, puesto que la membrana basal de la neurona se encuentra dispuesta alrededor del cilindroeje. En el caso de los nervios ciáticos proximales de los tres grupos existe una degradación de la membrana basal y un colapso que se dibuja en la mayoría de las tinciones de los tres grupos. Destacar que la Laminina en el conducto nervioso central y distal se encuentra presente en los conductos nerviosos que presentan biomateriales en su interior, y de forma moderada en los que además contienen ADSC en su interior.

<b>LAMININA</b>					
	N. C. PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO PROXIMAL	CONDUCTO NERVIOSO CENTRAL	CONDUCTO NERVIOSO DISTAL	N. C. DISTAL
<b>CONTROL</b> (nervio ciático sano)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
<b>GRUPO 1</b> (conducto nervioso con suero heparinizado)	+++ / +++	+ / +++	+ / +++	- / +++	- / +++
<b>GRUPO 2</b> (conducto nervioso con biomateriales de FA)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / +++	- / +++
<b>GRUPO 3</b> (conducto nervioso con biomateriales y ADSC)	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	++ / +++	+ / +++

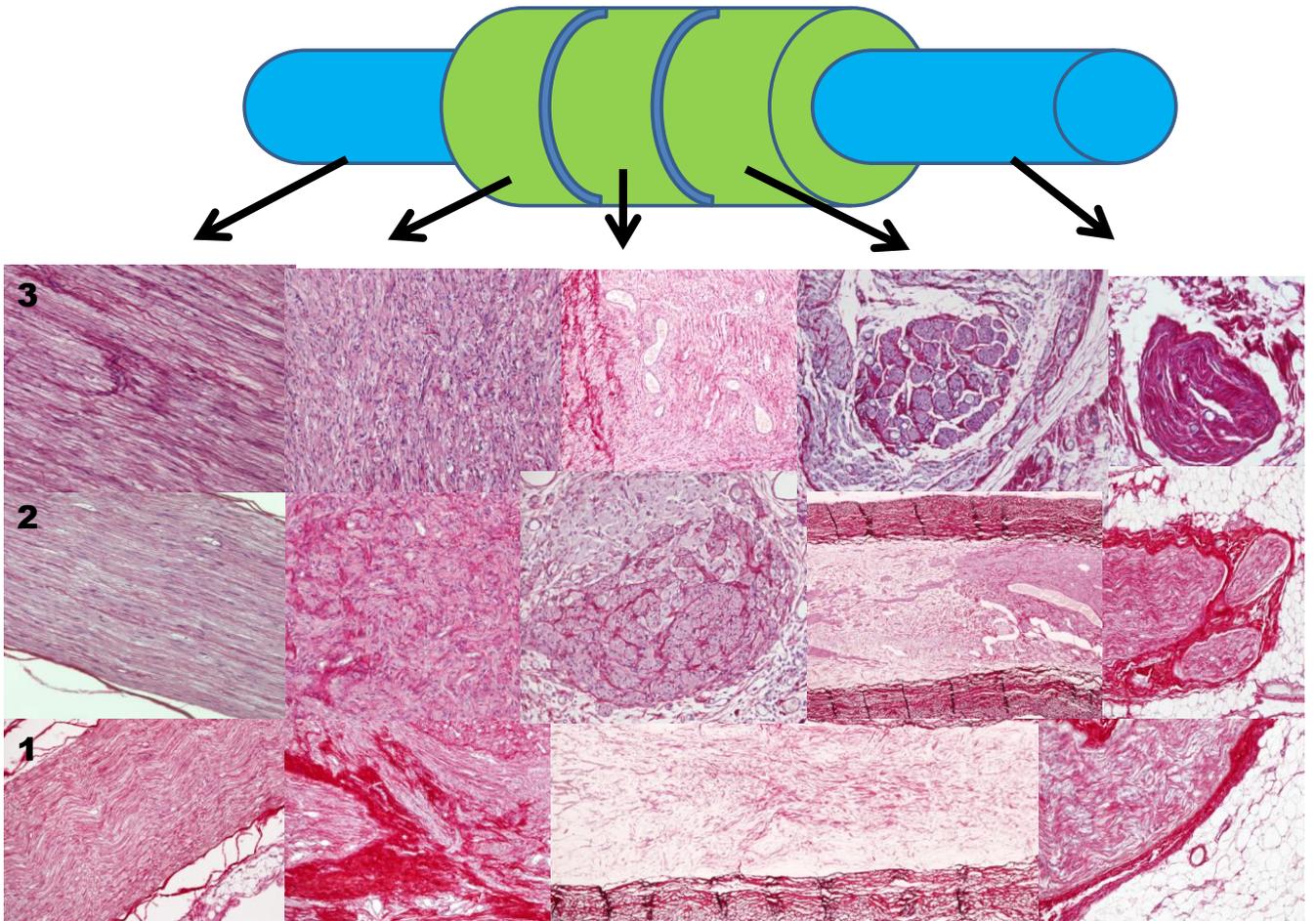
**Tabla 17. Resultados de la reacción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-laminina a las muestras histológicas obtenidas del nervio ciático problema de cada uno de los animales de los grupos de estudio (-/+++ : ausencia de reacción; +/+++ , reacción leve; ++/+++ reacción moderada; +++/+++ reacción intensa).**



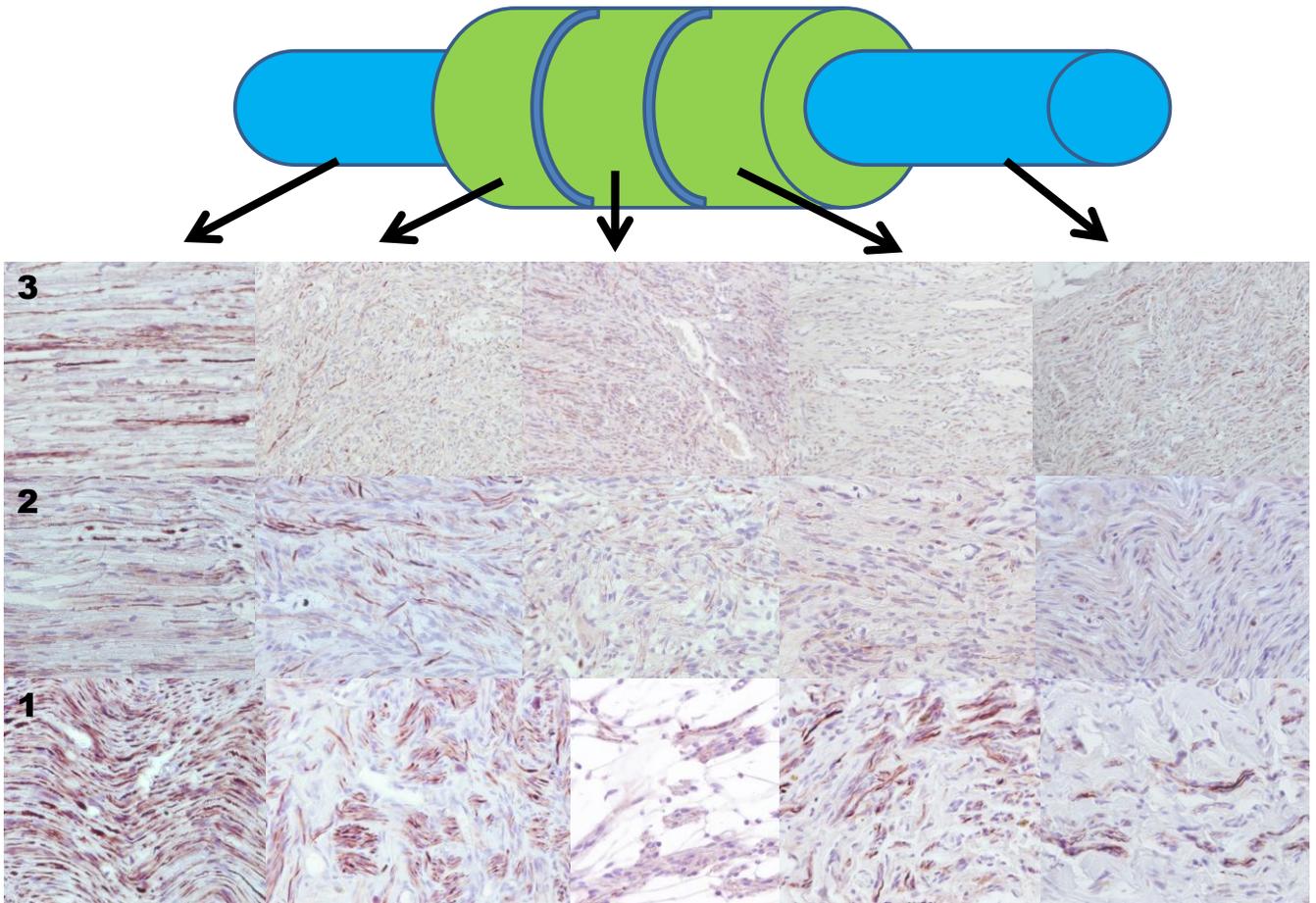
**Figura 68. Resumen de cortes histológicos más representativos con Hematoxilina-Eosina (HE) para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**



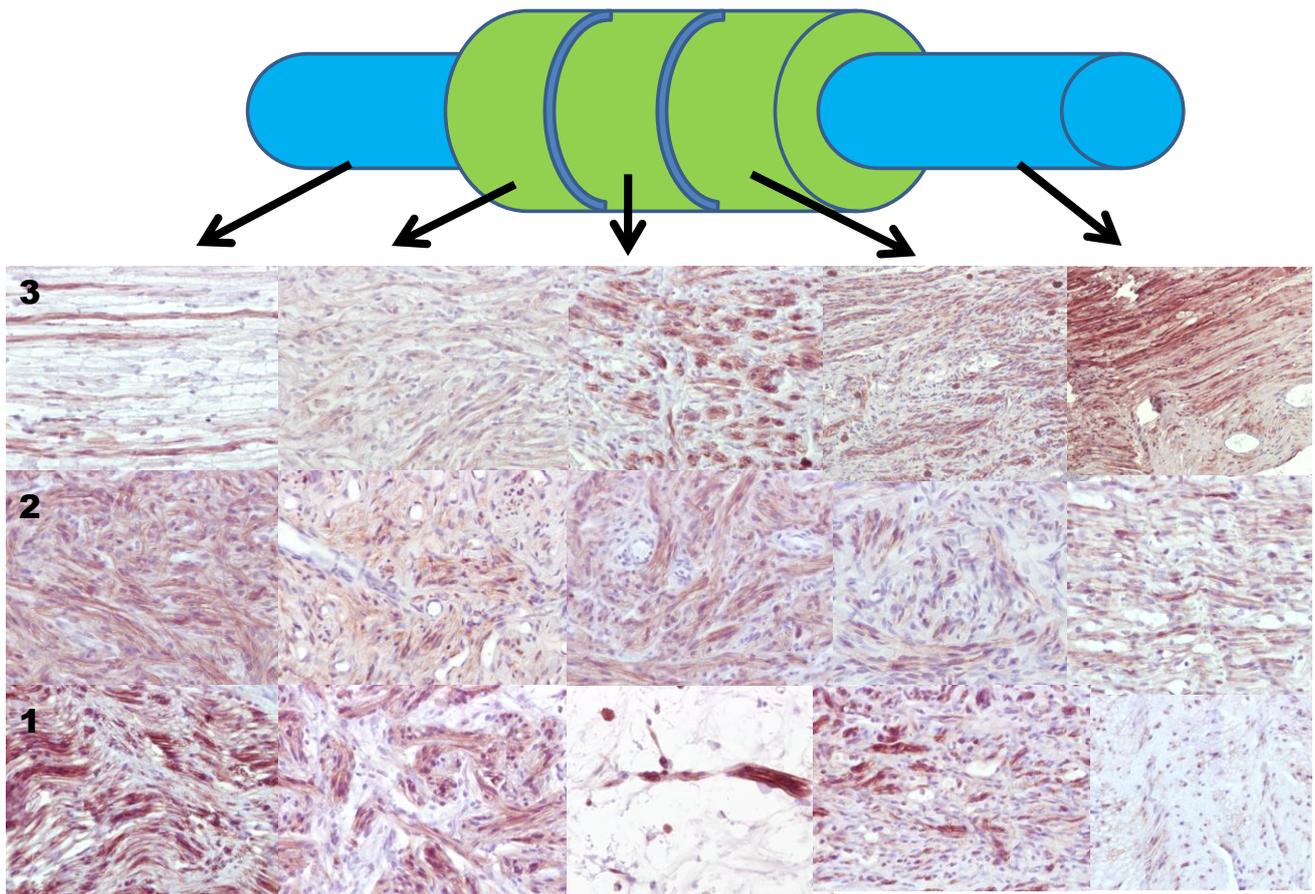
**Figura 69. Resumen de cortes histológicos más representativos con la técnica de Kluvert-Barrera (KB) para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**



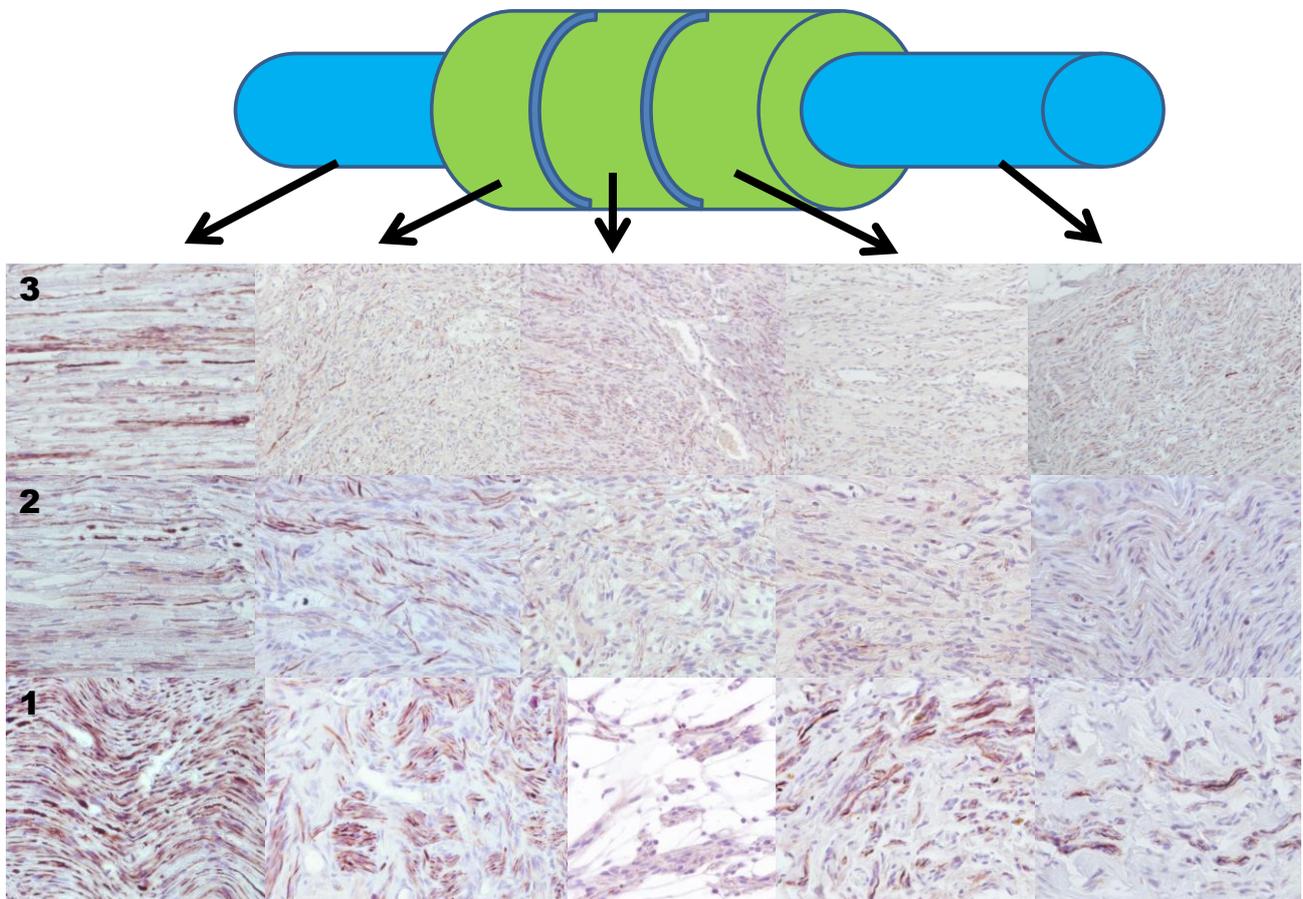
**Figura 69. Resumen de cortes histológicos más representativos con la técnica de Picrosirius (PS) para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**



**Figura 71. Resumen de cortes histológicos más representativos de la reacción histoquímica a Neurofilamento (NFL) para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**



**Figura 72. Resumen de cortes histológicos más representativos de la reacción histoquímica a la proteína S100 para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**

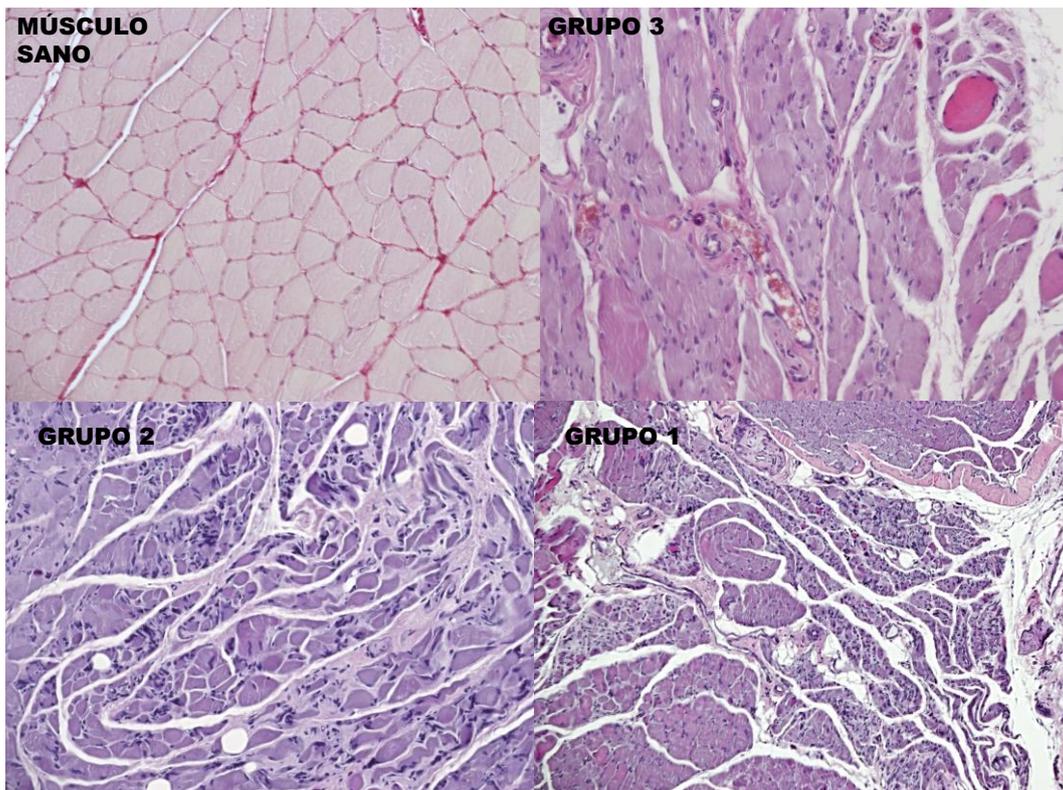


**Figura 73. Resumen de cortes histológicos más representativos de la reacción histoquímica a Laminina (LAM) para cada región del nervio lesionado en cada uno de los grupos de estudio. De arriba abajo, grupo 3 (ADSC con biomateriales), grupo 2 (biomateriales) y grupo 1 (suero heparinizado).**

## HISTOLOGÍA DEL TEJIDO MUSCULAR.

La descripción histológica de los hallazgos visualizados son prácticamente iguales en los tres grupos de estudio. Salvo en el grupo de animales tratados con biomateriales biocompatibles y ADSC, donde se aprecian algunas diferencias puntuales en algunas de las muestras estudiadas, que de forma general no se pueden considerar significativas con respecto al resto de grupos.

El grado de atrofia muscular observado es muy severa en los tres grupos de estudio, en una escala que incluye leve, moderada o severa. A su vez, el grado de fibrosis muscular es ligeramente superior en el grupo donde se aplican sólo conductos nerviosos sintéticos comercializados rellenos de suero heparinizado. Sin embargo, en el grupo donde se utilizan biomateriales con y sin ADSC, el grado de infiltración de tejido conectivo es inferior (moderado), pero semejante entre ambos.



**Figura 74. Secciones transversales de músculos del animal de experimentación pertenecientes a grupos musculares que se ubican distales a la zona de lesión, generalmente gastrocnemios. Se dispone en primer lugar un corte transversal ampliado (20X) de la histología normal de un músculo esquelético del animal de experimentación (control positivo). A continuación secciones transversales a menor aumento de muestras representativas de cada uno de los grupos (10X).**

## DISCUSIÓN.

Las **lesiones nerviosas** agudas tienen una etiología común en la mayor parte de los casos. Son lesiones graves, que no comprometen la viabilidad de la extremidad afectada, pero sí pueden comprometer la funcionalidad del miembro afecto y limitar las actividades del sujeto que las sufre, generando en un porcentaje elevado de casos, una minusvalía física, que se asocia a una serie de secuelas psicológicas, no sólo por las limitaciones del sujeto, sino también por el dolor crónico, que a veces perdura en estos pacientes. En Estados Unidos, las lesiones del nervio periférico afectan al 2,8% de los pacientes que sufren un traumatismo de cualquier tipo (Noble *et al.*, 1998), existiendo alrededor de 200.000 personas al año con una lesión nerviosa periférica en miembro superior. En Europa, las cifras son aún mayores, se estima una incidencia de 300.000 casos nuevos por año englobando todos los pacientes de la Unión Europea (Ichiara *et al.*, 2008). Todo ello, supone unos 8.648.000 días de baja laboral y 4.916.000 días de ocupación de cama hospitalaria por parte de estos pacientes. Además, a todo ello habría que sumar los problemas derivados de la gran cantidad de secuelas motoras y sensitivas que se asocian a estas lesiones (Kelsey *et al.* 1997). De forma común, los autores consultados expresan que es imposible medir el coste que supone para un sistema de salud (público o privado), pero que de cualquier manera está infravalorado, puesto que el número de pacientes que sufren estas lesiones es elevado y la cronicidad de la mayoría de los procesos hace que la necesidad de tratamientos (médicos y quirúrgicos) se prolongue de forma ilimitada en el tiempo. Además del coste económico, habría que añadir la merma permanente que genera en el paciente y en la familia del paciente las lesiones nerviosas, ya que generalmente, son pacientes que asocian trastornos adaptativos antes las limitaciones que sufren.

La alta incidencia de estas lesiones se debe fundamentalmente a que los nervios periféricos son estructuras que se disponen en planos anatómicos superficiales, lo que los hace especialmente vulnerables a agentes externos. Los principales mecanismos lesionales son las heridas incisas, traumatismos cerrados, tracción, isquemia prolongada, quemaduras, congelaciones, radiación, lesiones eléctricas, vibración sostenida en el tiempo (Campbell *et al.*, 2008). Las laceraciones del nervio, producidas por cristales, cuchillos, ventiladores, sierras, etc, son el tipo de lesión más frecuente, que se corresponden con lesiones grado IV o V de Sunderland, y que a veces se asocian a defectos nerviosos que precisan realizar alguna técnica de “puenteo” de este defecto (Stanec *et al.*, 1997). También hay que incluir todas aquellas enfermedades sistémicas que afectan a los nervios periféricos en forma de mononeuritis (por ejemplo la Enfermedad de Churg Strauss) o polineuritis (por ejemplo la Neuropatía Diabética) (Kararizou *et al.*, 2011).

La mayor parte de lesiones nerviosas se localizan en el miembro superior, aproximadamente un 75,3% de los casos, además, el nervio que más comúnmente se lesiona es el nervio cubital, bien de forma aislada o bien se combina la lesión con otro nervio, que suele ser el nervio mediano (Stanec *et al.*, 1997).

Históricamente, las lesiones de los nervios periféricos han sido consideradas de mal pronóstico, por un lado por el desconocimiento de los mecanismos de regeneración nerviosa, que aún hoy día siguen sin conocerse en profundidad, y por otro, por el mal pronóstico funcional que asocia cualquier gesto de reparación por parte del cirujano, probablemente por la primera causa descrita. En esta Tesis Doctoral se hace una descripción histológica pormenorizada de los hallazgos encontrados en el proceso de regeneración nerviosa en los animales de experimentación sometidos a diferentes tratamientos, lo que nos ha permitido aportar una serie de conclusiones para conocer y comprender mejor el proceso de regeneración nerviosa, y de esta forma, desarrollar nuevas técnicas de Ingeniería Tisular para favorecer el proceso de reparación.

Han sido muchos los autores que a lo largo de la historia han intentado revelar la clave del proceso de regeneración y muchos más los que han intentado tratar las lesiones nerviosas mediante el implante de otros tejidos, siendo el resultado bastante pobre en la mayoría de los casos. Herófilo en el siglo III a.C. diferenció los nervios disecándolos a partir de la médula espinal. Hasta ese momento tendones, ligamentos y nervios se englobaban en el mismo ente llamado en conjunto *neuron*. Galeno había considerado las lesiones nerviosas irreparables, y la actitud médica que se recomendaba era la abstención terapéutica. La primera sutura nerviosa que se describe en la historia es la realizada por Guy de Chauliac (1300-1370). En 1880, Gluck intentó tratar el defecto nervioso con hueso decalcificado (Taras *et al*, 2005). Una década después, Buenger interpuso la arteria braquial de un cadáver para reparar las lesiones del nervio ciático en un modelo canino (Taras *et al*, 2005). Formatti y Nageotte usaron vena en lugar de arteria, obteniendo de la misma manera un resultado infructuoso. Como ocurre a lo largo de la historia, el mayor avance del conocimiento de las lesiones nerviosas tuvo lugar a partir de la Primera y Segunda Guerra Mundial. Los patrones de los procedimientos modernos de reparación nerviosa fueron asentados por Seddon y Woodhall durante la Segunda Guerra Mundial. Posteriormente, Sunderland describió pormenorizadamente los detalles de la microarquitectura de los nervios periféricos que nos permitirían mejorar los procesos de reconstrucción y regeneración de los grupos fasciculares (Brushart, 1999). A lo largo de estos años, son muchos los autores que han intentado establecer un modelo de tratamiento para este tipo de lesiones a partir de tejidos alogénicos y autogénicos sin éxito, salvo en el caso de los injertos nerviosos autólogos que en este momento constituyen el *gold estándar* del tratamiento de las lesiones nerviosas periféricas con defecto, aunque sus resultados clínicos son controvertidos e insuficientes (Taras *et al*, 2005; Pabari *et al*, 2009; Johnson *et al*, 2008; Campbell *et al*, 2008).

A pesar de los grandes avances tecnológicos que se han producido en los últimos años en el campo de la microcirugía, aún no se ha encontrado una solución definitiva a las lesiones de los nervios periféricos. Hasta el momento, se han propuesto múltiples posibles soluciones al problema pero ninguna de ellas es

satisfactoria en cuanto a resultados. La más usada hoy día, como se indicó previamente, es el sacrificio de un nervio sensitivo sano de una zona vecina de la economía corporal para interponer un injerto fascicular entre los cabos del defecto nervioso, pero los resultados no son completamente satisfactorios, puesto que la regeneración de un nervio motor a través de un nervio sensitivo es incompleta e insatisfactoria, el tejido nervioso donante para hacer el injerto es limitado, a lo que hay que añadir el severo inconveniente de sacrificar un nervio sano que va a producir secuelas en la zona donante (Campbell, 2008; Taras *et al*, 2005, 2006; Pabari, 2009; Walsh, 2009; Apel *et al*, 2008). Los axones normalmente entran en los injertos de forma aleatoria, por tanto, aquellos axones que interaccionan con una vía emparejada del otro extremo del nervio lesionado es más probable que se produzca la sinapsis con el tejido adecuado. Se produciría el contacto de los conos de crecimiento del nervio lesionado con el tubo endoneural del injerto que estaría “desocupado” de axones, y de esa forma se favorecería la regeneración nerviosa. Aquellos axones que no se hubiesen emparejado satisfactoriamente con el tubo endoneural correspondiente a su fascículo perderían su soporte trófico y se retraerían (Myckatyn and Mackinnon, 2004).

Cuando no existe defecto o “*gap*” entre ambos extremos del nervio lesionado el tratamiento de elección es la sutura nerviosa termino-terminal sin tensión. Por el momento, no existe ningún tratamiento definitivo para el tratamiento de las lesiones nerviosas con defecto, tampoco para las lesiones nerviosas grado III, IV y V de Sunderland que nos obligan en algunos casos a recurrir a injertos nerviosos (como en los casos de parálisis braquial obstétrica -PBO- o en los neuromas por continuidad) (Pabari *et al*, 2009). A lo largo de los últimos años, el uso de conductos nerviosos sintéticos con el objetivo de puentear la zona de lesión se ha incrementado. El primer material que se utilizó para elaborar un conducto nervioso que pusiese en contacto ambos cabos fue la silicona. Sin embargo, los resultados fueron malos debido a los fenómenos de fibrosis nerviosa que se les achacaban y que obligaban a su retirada (Pabari *et al*, 2009; Kim *et al*, 2007; Meek *et al*, 2009). Posteriormente, se han utilizado otros materiales más biocompatibles (colágeno, ácido poliglicólico, caprolactona...) que han reducido la respuesta inflamatoria que se producía en el interior del conducto nervioso y que, a su vez, era responsable de los fenómenos de fibrosis nerviosa que se producía en el cabo proximal del nervio lesionado (Luis *et al*, 2007; Pabari *et al*, 2009). La mayoría de los autores coinciden en la utilidad de los conductos nerviosos sintéticos de distintos materiales que existen en el mercado para el tratamiento de lesiones nerviosas con defecto, sin embargo, nuestra experiencia tanto clínica como experimental en el uso de estos conductos es contraria (Hernández-Cortés y Garrido-Gómez, 2010), observando una mayor proporción de malos resultados que los publicados por otros autores hasta el momento.

En la mayoría de los casos, las lesiones que se producen en el sistema nervioso central son muy difíciles de reparar, produciéndose un proceso de gliosis

reactiva con proliferación de células del tejido conectivo y la neuroglía del propio sistema nervioso central. Sin embargo, cuando existe una lesión nerviosa periférica se pone en marcha un complejo proceso de regeneración que tiene como objetivo la reparación completa del nervio lesionado. La reparación del nervio lesionado puede ocurrir a través de tres mecanismos (Zochodne y Levy, 2005):

- a. Remielinización.
- b. Crecimiento distal de brotes axonales colaterales procedentes de axones conservados.
- c. Regeneración desde la zona de lesión al cabo distal.

Generalmente, el tercero de los mecanismos de reparación es el que más influye en el proceso de regeneración y de él depende la recuperación sensitiva y motora que experimente el nervio lesionado. En nuestro trabajo, el modelo de conducto nervioso sintético pretende favorecer o estimular el proceso de reparación mediante la aplicación de biomateriales que sirvan como andamio de distribución tridimensional para el crecimiento de los brotes axonales a su través, y células madre mesenquimales (ADSC), que al estar sometidas a los factores neurotróficos y neurotróficos liberados en la zona de lesión nerviosa, probablemente se diferencien en células de Schwann y células inflamatorias que favorezcan y promuevan el proceso de regeneración nerviosa a ese nivel.

Se ha demostrado en varios estudios, que cuando existe una lesión nerviosa que afecta a menos del 30% de los axones del nervio periférico, el proceso de recuperación se produce a expensas fundamentalmente de los brotes axonales colaterales (*Collateral sprouting*). Sin embargo, cuando hay lesiones más graves, que afectan a más del 90% de los axones, el mecanismo fundamental que interviene en la reparación nerviosa es la regeneración desde el cabo proximal (Campbell, 2008).

La **biotecnología y la ingeniería tisular** representan un conjunto de doctrinas científicas multidisciplinarias que podrían contribuir a solventar algunos de los problemas médicos de mayor gravedad y más demandados mediante la creación de nuevos tejidos similares a los existentes en los organismos vivos (Johnson E.O. *et al*, 2008). Las nuevas técnicas que aplican estas doctrinas permiten el desarrollo de nuevos constructos biológicos como alternativas de futuro en la regeneración tisular (Johnson E.O. *et al*, 2008).

La generación de tejidos artificiales empleando células troncales adultas y biomateriales altamente compatibles, es uno de los principales objetivos en la investigación biomédica. Aunque estos tejidos biogenerados mediante ingeniería tisular pudieran ser potencialmente útiles para la sustitución clínica de tejidos dañados, la obtención de células nativas con elevada capacidad de proliferación y diferenciación no es siempre posible (De Ugarte *et al.*, 2003). Por esta razón, la búsqueda de fuentes celulares alternativas para su utilización como sustitutos de las células nativas es uno de los retos actuales de la medicina regenerativa, ya que permite la elaboración de tejidos y la restitución del órgano dañado (Zavan *et al.*, 2010).

Al gran desarrollo de la biomedicina en los últimos años, habría que asociar el conocimiento más profundo de los mecanismos implicados en el proceso de regeneración nerviosa, que nos permiten, además de conocer los elementos celulares que median el proceso y qué factores neurotróficos y neurotróficos influyen, cómo actúan, cuándo actúan y la manera de mejorar el proceso de regeneración nerviosa que permita el contacto de los brotes axonales con el cabo distal.

Otros autores, han utilizado células madre derivadas del tejido adiposo como promotoras de la regeneración nerviosa para demostrar su utilidad en la regeneración nerviosa, sin embargo, los estudios eran limitados a 3 semanas tan sólo, y además no eran células del propio animal, sino que procedían de otras ratas que se habían sacrificado (Di Summa, 2009). También se han realizado estudios comparando la eficacia de las células madre derivadas del tejido adiposo y las células madre de la médula ósea, concluyendo que ambas células promueven la regeneración de la misma manera, sin poder determinar si se debe a la diferenciación en células de la glía (células de Schwann). En nuestro caso, nos parece mucho más accesible el tejido adiposo y por ello, se precisan menos medios técnicos y humanos para obtener una muestra de tejido adiposo, si el modelo se aplicase en humanos en un futuro. Por otro lado, es bien conocido el papel del sistema inmunitario en los fenómenos de destrucción de células madre implantadas en otro organismo (heteroinjerto), disminuyendo así la población celular y con ello, el grado de regeneración nerviosa. Desde hace poco tiempo, se sabe que el tejido adiposo es un nicho de células madre multipotenciales con un perfil fenotípico muy similar a las células madre de la médula ósea, sin embargo, existen controversias en

cuanto a su semejanza de resultados obtenidos cuando se aplican ambas (células madre de la grasa y las procedentes de médula ósea) en el tratamiento de lesiones nerviosas. Lo que si se ha demostrado es que las células madre derivadas del tejido adiposo son capaces de promover el crecimiento de axones motores *in vitro* (Kingham, 2007), así como su capacidad de diferenciarse en células de Schwann cuando se someten a determinados factores como el mercaptoetanol, ácido alltransretinoico y otros factores de crecimiento específicos (Jiang *et al.*, 2008). Otros grupos de trabajo, se centran en la obtención de precursores celulares a partir de la piel, con resultados publicados hasta el momento, no muy dispares con los obtenidos con otras estirpes de células madre.

En esta tesis doctoral, se han logrado optimizar protocolos para la elaboración de conductos nerviosos que contienen en su interior biomateriales de fibrina y agarosa y ADSC. Nuestro objetivo es evaluar un nuevo modelo de regeneración nerviosa periférica en el que se utilizan conductos comerciales de colágeno que actualmente se utilizan para la reparación quirúrgica de defectos nerviosos, asociados a nuevos biomateriales biocompatibles y células madre adultas del propio individuo.

En concreto, en esta tesis doctoral se han utilizado diferentes modelos de regeneración nerviosa basados en el uso de 1) conductos de colágeno, 2) conductos de colágeno con biomateriales de fibrina y agarosa y 3) conductos de colágeno con biomateriales de fibrina y agarosa y ADSC. De este modo, pretendemos comparar los resultados clínicos e histológicos de los nuevos modelos frente a la técnica actualmente disponible para uso clínico consistente en el implante quirúrgico de un tubo de colágeno liofilizado entre ambos extremos del nervio lesionado. De esta forma, se realiza una evaluación directa de la influencia de los biomateriales y las ADSC en el proceso de regeneración nerviosa, y si su uso, constituye un avance en el tratamiento de las lesiones nerviosas. Además, la validez interna del trabajo queda contrastada mediante la inclusión de dos grupos control: animales sanos (sin lesión nerviosa) y animales sometidos a lesión nerviosa no reparada.

El modelo animal utilizado en esta tesis doctoral ha sido la rata Wistar (*ratus ratus*), se trata de un modelo estandarizado en otras publicaciones para el estudio de las lesiones nerviosas. El hecho de incluir el grupo control negativo (grupo 0), donde no existía reparación de la lesión nerviosa generada, nos ha permitido confirmar la ausencia de regeneración nerviosa que existe cuando, en el contexto de la lesión periférica, hay un defecto crítico que se preestableció en un centímetro. El defecto crítico ha sido muy debatido por distintos autores, considerando, que en algunos casos, un defecto de un centímetro puede regenerar espontáneamente. Sin embargo, en la mayoría de trabajos consultados, el defecto crítico de un centímetro no se asocia a regeneración espontánea, no produciendo más que un neuroma de amputación en el cabo proximal, como se ha demostrado en nuestro caso y siendo

confirmado por las pruebas clínicas e histológicas a las que se ha sometido al animal.

Una de las principales aportaciones de la presente tesis doctoral es el estudio de la regeneración nerviosa en los diferentes grupos de animales utilizando métodos de evaluación objetivos y multidisciplinarios, incluyendo el estudio de la huella plantar, parámetros clínicos, actividad motora espontánea, parámetros neurofisiológicos y análisis histológico. De este modo, esta aproximación combinatoria de diferentes métodos y técnicas permitió establecer unas conclusiones objetivas, altamente fiables y válidas para determinar el grado de reparación nerviosa.

En primer lugar, el **estudio de la huella plantar** en todos los grupos de experimentación permitió evaluar el grado de retracción miotendinosa secundaria a la lesión nerviosa generada. La existencia de una lesión nerviosa periférica provoca el desequilibrio del tono muscular de los grupos musculares intrínsecos y extrínsecos de la pata del animal (al igual que ocurre en el ser humano). Un desequilibrio en estos músculos, que sea absoluto o relativo, en relación a sus antagonistas, altera el equilibrio muscular y provoca deformidades en la pata y posturas anómalas que impiden al animal apoyar la extremidad de forma adecuada, lo que hace secundariamente que la huella plantar se altere (Beaty y Canale, 2010; Kim *et al*, 2007). El hecho que exista una lesión periférica hace que el animal presente una retracción de la musculatura flexora dorsal de la extremidad así como pérdida del componente flexor plantar y ausencia de tono de los músculos plantares y digitales, todo ello hace que se produzca una alteración en la longitud de la huella plantar. El hecho de utilizar la longitud de la huella plantar como indicador del estado de retracción neurógena, y de forma secundaria, del grado de denervación y reinervación muscular, en lugar de otros parámetros como el SFI (*Sciatic function index*) ha sido por la imposibilidad técnica para medir los parámetros que incluye el SFI debido a la alta incidencia de úlceras neurotróficas, y a veces, automutilaciones que aparecían en determinados grupos, lo que dificultaba y, a veces imposibilitaba, la medición.

Como era de esperar, la ausencia de tratamiento ante una sección nerviosa con defecto (Grupo 0 - control 1) hace que el grado de desequilibrio en la musculatura sea muy elevado, lo que condiciona una longitud de la huella muy pequeña (media 2,93 mm). Sin embargo, cuando se aplican conductos nerviosos comercialmente disponibles o los conductos rellenos de biomateriales de fibrina y agarosa, se observa una mejoría sustancial del tamaño de la huella (14,86 mm de media para el primer grupo y 14,93 mm más para el segundo), lo cual sugiere que ambas técnicas podrían contribuir a la protección del desequilibrio de los grupos musculares secundario a la lesión nerviosa. Sin embargo, cuando se añaden ADSC al biomaterial existe un incremento significativo en la longitud de la huella (media 27,125 mm) que no llega a alcanzar la longitud de la huella de los animales no

intervenidos (grupo 1- control 2: media 36,56 mm), aunque habría que destacar que algunos animales de este grupo tratado con ADSC presenta una longitud de huella plantar casi igual al animal no intervenido. Por todo ello, concluimos que la combinación de biomateriales biocompatibles y células madre mesenquimales autólogas con los conductos de colágeno comerciales constituyen una mejora significativa respecto al tratamiento actualmente empleado en clínica humana consistente en el implante de conductos de colágeno sin biomateriales ni células.

En segundo lugar, la **evaluación de parámetros clínicos relevantes** corroboró los resultados favorables obtenidos cuando los conductos de colágeno se rellenaron de biomateriales biocompatibles, especialmente cuando se incluían células madre mesenquimales en estos biomateriales. De hecho, el número de úlceras neurotróficas y la aparición de automutilaciones descendieron significativamente cuando los conductos de colágeno se rellenaron de biomateriales, y aún más cuando éstos contenían ADSC. De nuevo, estos resultados sugieren que las células madre del tejido adiposo del propio individuo podrían jugar un papel protector frente a la presencia de lesiones tróficas cutáneas y la prevención de síndrome de miembro fantasma, que con frecuencia afecta a pacientes con lesiones del nervio periférico.

Los **resultados neurofisiológicos** nos permiten determinar de forma objetiva la existencia de reparación nerviosa mediante los de signos de reinervación y de denervación en los grupos musculares distales a la lesión del nervio ciático. Cada uno de estos signos encontrados implica el crecimiento en mayor o menor medida de los brotes axonales procedentes del cabo proximal del nervio lesionado. A su vez nos van a permitir establecer una correlación con los hallazgos clínicos y los hallazgos histológicos, lo que incrementa el grado de validez del estudio realizado para demostrar la regeneración nerviosa.

Se asume que la inervación muscular distal se produce a partir del nervio ciático de forma única y que al lesionarse el nervio existe una ausencia total de inervación de las fibras musculares. Por tanto, al realizar una electromiografía, los cambios eléctricos observados se van a achacar al proceso de regeneración nerviosa a partir de los brotes axonales que surgen del cabo nervioso proximal.

La adición de células madre mesenquimales procedentes de la grasa en el hidrogel de fibrina y agarosa con el que se rellena el conducto nervioso sintético implica que la denervación de los grupos musculares más próximos a la lesión nerviosa sea casi inexistente. En los vientres musculares más distales a la lesión (gemelos y tibial anterior) se aprecia un menor grado de denervación en los animales a los que se aplican biomateriales y ADSC ( $p=0,006$  y  $p=0,001$ , respectivamente para la denervación de los gemelos. Para el tibial anterior existen diferencias aunque no significativas). En los músculos intrínsecos del pie del animal, sin embargo, no existen diferencias en cuanto al grado de denervación. Probablemente por la

ausencia de brotes axonales que contactan con el músculo estudiado, debido a la gran distancia que existe hasta el vientre muscular y la gran dificultad anatómica que encuentra el nervio para llegar hasta ellos a través del cabo distal del nervio lesionado.

Con respecto a la reinervación muscular, se aprecia que existe un proceso de reparación nerviosa consistente en el crecimiento de brotes axonales colaterales y que contactan con las fibras musculares cercanas al cabo proximal (*“collateral sprouting”*), que nos explicarían los signos de reinervación hallados en los vientres musculares más proximales (bíceps femoral) en el grupo donde la sección nerviosa no se acompaña de ningún gesto de reparación quirúrgica. Sin embargo, como el crecimiento de estos brotes colaterales es limitado, se explica la ausencia de signos de reinervación en vientres musculares más distales (gemelos y tibial anterior). Aún así el grado de reinervación de esta musculatura proximal es mayor cuando se aplican biomateriales, y aún mayor cuando se aplican ADSC al hidrogel de fibrina agarosa ( $0,92\pm 0,29$ ;  $1,91\pm 0,30$  y  $2,00\pm 0,47$ , respectivamente para el grupo 1, 2 y 3)

Cuando se estudian grupos musculares más distales, como gemelos y tibial anterior, se aprecia un mayor grado de reinervación en los animales que se aplican biomateriales de fibrina y agarosa, siendo levemente mayor el grado de reinervación cuando además se aplican ADSC al hidrogel en el caso del tibial anterior. Sin embargo, no existen diferencias cuando se aplican ADSC a los biomateriales para la reinervación de los gemelos del animal ( $p=0,809$ ). La aplicación de biomateriales en el interior del conducto nervioso podría favorecer la regeneración axonal y con ello, la reinervación de los grupos musculares gemelos y tibial anterior. Los signos de reinervación en los músculos intrínsecos del pie / músculo pedio son inexistentes independientemente del grupo de animales estudiado, salvo en el grupo de biomateriales con ADSC donde se aprecia un caso con signos muy superficiales o leves de reinervación sin que existan diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Una de las principales aportaciones de este estudio, es la inclusión de forma sincrónica de un estudio neurofisiológico pormenorizado de cada animal, y al mismo tiempo, un estudio histológico. En la mayoría de los estudios de regeneración nerviosa publicados hasta el momento, no existe un estudio de parámetros electromiográficos e histológicos al mismo tiempo.

Finalmente, los **hallazgos histológicos** demostraron que el modelo de reparación nerviosa descrito en esta tesis doctoral es capaz de inducir cierto grado de regeneración de la lesión nerviosa provocada, lo cual se correlaciona con los hallazgos clínicos y neurofisiológicos hallados en el grupo 3 (animales a los que se aplicaron conductos nerviosos con biomateriales y células madre de la grasa). En concreto, los resultados obtenidos revelan la existencia de un cono de regeneración formado por brotes axonales que surgen del cabo proximal del nervio lesionado y

tiende a migrar distalmente a través del conducto nervioso sintético. Este cono de regeneración presentó mayor longitud y mayor diámetro en el caso de los tubos de colágeno rellenos de biomateriales con células madre en su interior, seguido del conducto nervioso que sólo contiene hidrogel de fibrina-agarosa en su interior, lo cual sugiere que la presencia de fibrina y agarosa en el interior del armazón de colágeno podría favorecer la migración axonal a partir del cabo nervioso proximal y, por tanto, la regeneración de la lesión existente en el nervio ciático. Además, la adición de ADSC en el seno del biomaterial biocompatible incrementaría el grado de migración axonal a su través consiguiendo así que aumente el grado de regeneración. También evita la formación de tejido conectivo alrededor del cabo nervioso distal que impediría la penetración de los brotes axonales en su interior y la infiltración de tejido adiposo entre el frente de brotes axonales y el cabo nervioso distal. Cuando no se aportan ADSC a los biomateriales biocompatibles se observa que los brotes axonales no contactan con el cabo nervioso distal seccionado, sino que crecen de forma paralela al cabo distal sin penetrar en su interior.

La degeneración walleriana comporta un conjunto de hallazgos histológicos que ocurren a nivel de los cabos nerviosos donde se produce la lesión y que tienen como objetivo la formación de nuevos brotes axonales que lleguen a contactar con las estructuras axonales del cabo distal. Cualquier parte de una neurona separada de su soma degenera y es destruida por fagocitosis. El proceso de degeneración que tiene lugar a nivel proximal y distal a la zona de lesión se le conoce como degeneración walleriana (Waller, 1850). La secuencia de eventos degenerativos incluye cambios moleculares y celulares, y requiere de células de Schwann y macrófagos activos para realizar su función (Stoll *et al.*, 1989). Una vez producida la lesión, las células de Schwann se diferencian, proliferan y se alinean formando las bandas de Büngner, generando una estructura que actúe como guía y favorezca la regeneración axonal (Varga y Barres, 2007). En efecto, las células de Schwann también participan en el proceso de desbridamiento, lo cual ocurre los primeros días después de la lesión nerviosa (Stoll *et al.*, 1989); pero al mismo tiempo, también liberan una gran cantidad de citocinas que actúan como mediadores quimiotácticos que reclutan a macrófagos que circulan en sangre periférica para que actúen también en el proceso de degeneración nerviosa previo a la regeneración (Shamash *et al.*, 2002; Siebert *et al.*, 2000; Tofaris *et al.*, 2002). Generalmente los primeros días después de la lesión se evidencian un conjunto de cambios morfológicos. El cabo distal se fragmenta, pierde líquido, se contrae y adoptan una morfología más globular. Normalmente, la fragmentación y la contracción de la vaina de mielina ocurren de forma paralela a los cambios degenerativos axonales, como se aprecian en las figuras 61 y 63 de esta Tesis Doctoral. Además, los macrófagos infiltran los cabos del nervio con el objetivo de eliminar los restos axonales. Es sabido que la degeneración retrógrada (en el cabo proximal) se prolonga, al menos, un internodo más y que conforme más proximal es la lesión más signos de degeneración se suelen evidenciar (Vargas y Barres, 2007). En nuestro caso, el hecho de practicar

una lesión nerviosa en una localización anatómica constante nos permite valorar de forma clara si el grado de degeneración axonal se modifica en función del tipo de conducto nervioso implantado, independientemente de la localización.

Por otro lado, el aporte de ADSC en el análisis de la reacción histoquímica a la presencia de fibras de colágeno mediante *picrosirius* mostró la presencia de fibras colágenas finas dispuestas alrededor de los brotes axonales. La infiltración de tejido conectivo en el interior del conducto nervioso es constante en todos los grupos estudiados, sin embargo, la densidad de tejido conectivo es mayor en el grupo donde se aplica el conducto nervioso comercializado sin biomateriales en su interior, además, en este grupo el tejido conectivo está constituido por fibras colágenas laxas. Por tanto, la aplicación de biomateriales biocompatibles en el interior de los conductos nerviosos de colágeno reducirían la infiltración de tejido conectivo, por tanto el grado de crecimiento axonal sería mayor.

En este contexto, llama la atención el hallazgo de la presencia de mielina mediante la técnica de Kluvert-Barrera a nivel de la zona lesional, que fue superior en el grupo tratado mediante implante de un conducto de colágeno que en los grupos en los que dicho tubo se rellenó previamente de biomateriales con o sin células madre, aunque las diferencias no fueron significativas. Probablemente, este hecho se debe a la mayor proliferación de los axones en estos últimos grupos, puesto que es bien conocido el hecho de que la regeneración nerviosa inicialmente ocurre a expensas de fibras amielínicas (Campbell, 2008), las cuales se mielinizan más tarde, cuando se estabiliza el proceso de regeneración. Por el contrario, en el grupo tratado mediante conductos de colágeno existiría una menor proliferación axonal y, por tanto, las células de Schwann podrían mielinizar los axones neoformados una vez que el brote axonal ha dejado de avanzar.

Por otra parte, en esta tesis doctoral quisimos analizar la presencia de diversas proteínas características del tejido nervioso que nos permitieron determinar la estirpe celular existente en cada muestra analizada y la existencia de fenómenos de reparación nerviosa. Cuando la proliferación celular y su diferenciación han sido llevados a cabo, las células de Schwann secretan factores tróficos incluyendo factor de crecimiento nervioso, factores neurotróficos derivados del encéfalo, y factores ciliares neurotróficos, y ellos constituyen la señal que permiten sintetizar y secretar moléculas de la matriz extracelular como Colágeno tipo IV y Laminina, las cuales se sabe que modulan el crecimiento de las neuritas y también la producción de mielina, que es vital para la rápida conducción de los impulsos, y la expresión de moléculas de adhesión celular (Shen *et al*, 2001; Shamash *et al*, 2002).

Concretamente, el análisis inmunohistoquímico de la proteína NFL (neurofilamento), característica de los neurofilamentos del axón que representan al soporte del citoesqueleto, así como las estructuras sobre las que se producirá el flujo axonal. Se demostró la presencia de axones de regeneración a nivel de la porción

central del conducto implantado en los grupos de animales en los que se implantaron tubos de colágeno rellenos de biomateriales con y sin células madre, pero no en los animales tratados con tubos de colágeno comerciales rellenos de suero heparinizado. Todo esto demuestra el papel beneficioso de la fibrina y la agarosa para la regeneración axonal. Podríamos concluir que los biomateriales de fibrina y agarosa favorecen el crecimiento axonal, de forma que permiten la formación de neurofilamentos en su seno y secundariamente promueven el proceso de regeneración nerviosa.

Sin embargo, el análisis de la proteína S100, denominada así debido a su dilución en sulfato amónico al 100%, inicialmente considerada específica del sistema nervioso. Actualmente se reconoce su detección en numerosas células de origen no neural, como condrocitos, adipocitos, células de Langherhans, melanocitos, etc. Se considera un marcador glial, detectándose en las células de Schwann del sistema nervioso periférico marcador de células gliales de Schwann, resultó altamente positivo en los tres grupos en los que se utilizaron tubos de colágeno, con o sin biomateriales en su interior, lo cual sugiere que las células de Schwann son elementos fundamentales en el proceso de reparación nerviosa independientemente del tipo de conducto nervioso implantado y que son capaces de proliferar por sí mismas hacia la zona de la lesión procedentes de los cabos nerviosos. Estos hallazgos confirman la teoría de que las células de la glía son capaces de proliferar y migrar hacia la zona lesional sin ninguna dificultad, siendo la proliferación axonal el factor limitante de una adecuada regeneración nerviosa. Por ello, nuestro estudio sugiere que los conductos en los que se utilizan nuevos biomateriales y células madre serían capaces de inducir una adecuada proliferación axonal, manteniendo la capacidad de la glía para proliferar y mediar el proceso de regeneración nerviosa, donde ocupan un papel fundamental.

Finalmente, se analizó la presencia de laminina. Se trata de una glicoproteína que forma parte de la membrana basal. Está formada por tres cadenas, una  $\alpha$ , otra  $\beta$ , y una  $\gamma$ . Lo que da lugar a distintas isoformas que se encuentran distribuidas en los distintos tejidos. En el caso del axón, la laminina se encuentra en la lámina basal que se dispone entre la célula de Schwann y el propio cilindroeje. Se sabe que la existencia de la lámina basal es una condición *sine qua non* para que se produzca el crecimiento axonal. Los resultados confirmaron el efecto beneficioso de la aplicación de biomateriales y, sobre todo, de biomateriales con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en el interior de los conductos de colágeno. En concreto, los animales tratados con tubos de colágeno con células madre y fibrina-agarosa presentaron una inmunorreacción muy intensa a la laminina en la zona lesional, reacción que fue comparable a la de los nervios utilizados como control, confirmando la adecuada regeneración de la membrana basal que permitirá el futuro crecimiento axonal en su interior. Cuando los tubos implantados fueron tratados con biomateriales pero sin células, se observó igualmente la presencia de laminina, pero su intensidad fue inferior al caso en el que se utilizaron células madre. Por último, el

conducto no tratado con biomateriales resultó en la presencia de escasos niveles de laminina en los axones neoformados. Podríamos concluir que la inclusión de células madre derivadas de la grasa incluidas en biomateriales biocompatibles podrían favorecer la formación de membrana basal que se interpone entre las células de Schwann y los axones neoformados y con ello el proceso de regeneración axonal que se va a producir a partir de la formación de esta estructura.

El estudio histológico del músculo estriado mostró que no existían diferencias significativas en función del tipo de conducto nervioso aplicado para el parámetro atrofia muscular. En los tres grupos de estudio el grado de atrofia hallado era muy intenso. Por otro lado, cuando el músculo sufre una denervación intensa y no se somete a una actividad contráctil de forma periódica sufre una infiltración de tejido conectivo y de tejido adiposo. En nuestro estudio, se valoró el grado de infiltración conectiva que existía en cada uno de los casos sin encontrar tampoco diferencias significativas. Por tanto, podríamos concluir que la aplicación de biomateriales con y sin ADSC no protege la musculatura distal a la lesión de la degeneración fibrosa ni de la atrofia.

Con respecto a la **recuperación motora funcional**, se midieron tres parámetros de actividad motora espontánea, que se distinguían a su vez entre movimientos rápidos y lentos. La aplicación de biomateriales y de ADSC en el interior del conducto nervioso de colágeno no mejora los parámetros de actividad motora espontánea con respecto a los animales tratados solamente con conductos nerviosos comercializados con suero heparinizado en su interior puesto que las diferencias entre ellos no fueron significativas. Por tanto, podríamos concluir que la aplicación de biomateriales con y sin ADSC en su interior no altera el comportamiento motor espontáneo del animal para ninguno de los parámetros estudiados en ninguno de los tres intervalos de tiempo. De forma general, se aprecian mejores valores de actividad motora espontánea en todos los animales a los que se ha aplicado un conducto nervioso como tratamiento independientemente de su relleno que en los animales que no se ha realizado ninguna técnica de reparación nerviosa. Dada la alta evidencia de mejora en los parámetros clínicos, neurofisiológicos e histológicos al aplicar biomateriales biocompatibles y células madre derivadas de la grasa a los conductos nerviosos sintéticos de colágeno, probablemente este test de actividad motora espontánea no sea aplicable para determinar si existe regeneración nerviosa. Sin embargo, otros autores han utilizado el test de actividad motora espontánea para determinar el grado de recuperación motora en lesiones centrales (Ferrer *et al*, 1987).

En resumen, en este trabajo hemos realizado un estudio profundo de la regeneración nerviosa en animales de experimentación a partir de técnicas de Ingeniería Tisular utilizando biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa y células madre mesenquimales procedentes de la grasa del animal. Una vez desarrollados los distintos tipos de conductos nerviosos, se implantaron en el animal

con objeto de establecer el efecto de los biomateriales y las células madre en el proceso de regeneración nerviosa. Para ello, fue necesario desarrollar distintas técnicas de microscopía e inmunohistoquímica que nos permitiesen evaluar los patrones de crecimiento axonal a través del conducto nervioso. Del mismo modo, se hizo fundamental establecer una correlación entre los hallazgos de los estudios histológicos con los parámetros de recuperación funcional del animal, presencia de úlceras y amputaciones, así como una valoración objetiva de la reinervación muscular mediante técnicas neurofisiológicas. De esta manera, los datos que objetivan que el aporte de células madre derivadas de la grasa a los biomateriales de fibrina-agarosa son concordantes entre sí, y son mucho más fiables cualitativamente.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que los conductos nerviosos de colágeno a los que se añaden biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa favorecen el proceso de regeneración nerviosa, y más aún, cuando a esos biomateriales se añaden células madre mesenquimales procedentes de la grasa del animal previamente cultivadas en nuestro laboratorio. En el momento actual, se postula que una de las principales causas de fracaso en el tratamiento de una lesión nerviosa periférica con pérdida de sustancia o defecto que nos impida realizar una reparación directa, es la ausencia de un andamio o armazón tridimensional que ponga en contacto ambos cabos del nervio lesionado y que permita el crecimiento de los brotes axonales a su través (Postulado de Weiss, 1944). A su vez, Ramón y Cajal determinó que la condición única y necesaria para que se produjese el crecimiento axonal es la estimulación de los cilindroejes por sustancias que aparecen en el foco de lesión nerviosa llamadas factores neurotrópicos y que “conducen” a los axones a lo largo de la zona lesional hasta contactar con el cabo distal. Se demuestra que la ausencia de tubulización favorece el crecimiento del tejido conectivo, con mayor potencial de proliferación que el tejido nervioso, alrededor de los brotes axonales, determinando así la formación de un neuroma de amputación, origen en muchos casos del dolor neuropático que sufren estos pacientes. Cuando se interpone un conducto nervioso de colágeno comercializado sin biomateriales en su interior, el efecto que se produce es similar a la ausencia de contacto entre ambos extremos del nervio, puesto que los axones crecerán lentamente y se verán envueltos por un tejido conectivo cuyos fibroblastos tienen gran capacidad de mitosis y de producir matriz extracelular de forma abundante.

En esta Tesis Doctoral, se demuestra que ambos postulados son ciertos, puesto que la inclusión de un andamio de fibrina y agarosa que se interpone entre ambos cabos nerviosos mejora la regeneración axonal, y que la adición de ADSC a los biomateriales de fibrina y agarosa, permitirá la diferenciación a células maduras de distintas estirpes que intervendrán de forma activa en el proceso de regeneración nerviosa.

En cuanto a las **limitaciones** del estudio, habría que resaltar que el modelo desarrollado y en el que se han aplicado los constructos nerviosos son animales de experimentación, lo que nos permite extrapolar los resultados sólo parcialmente a espera de estudios en animales de mayor tamaño.

De igual modo, los conductos de reparación nerviosa desarrollados en esta Tesis Doctoral podrían constituir un modelo de gran utilidad potencial para el tratamiento de diferentes patologías que afectan al nervio periférico desde su salida del orificio de conjunción vertebral hasta su diferenciación a nivel de la placa motora. Este modelo de constructo diseñado mediante Ingeniería Tisular surgió a raíz de las secuelas motoras y sensitivas que quedan en los pacientes con miembros catastróficos, fundamentalmente derivadas de las lesiones nerviosas. Probablemente en el futuro, el desarrollo de este modelo de conducto nervioso con biomateriales y/o la aplicación de células madre de la misma u otra estirpe aplicadas al ser humano sea la solución definitiva para las lesiones que afectan al nervio periférico. Potencialmente, obteniendo una muestra de tejido adiposo del paciente, se podrían obtener células madre, que al ser incluidas en el biomaterial, nos permitiría el tratamiento quirúrgico del paciente mediante el implante del constructo en un periodo no superior a 10 días desde la toma del tejido graso. Este modelo, sería aplicable a pacientes con lesiones nerviosas severas con defecto en el contexto de amputaciones, fracturas abiertas, cirugía reconstructiva oncológica, tumores de nervios periféricos, quemaduras, parálisis braquial, heridas, etc, en las que se precisa de tejido nervioso periférico para solventar la zona de defecto que queda entre ambos extremos del nervio lesionado.

## CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se infieren las siguientes conclusiones:

1. Los métodos y técnicas desarrolladas en esta Tesis Doctoral permitieron el aislamiento y expansión de células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSC: células madre mesenquimales del tejido adiposo) y su inclusión en biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa para su utilización en un **modelo experimental de lesión de nervio periférico (nervio ciático) con defecto de 10 mm en animales de experimentación.**
2. La utilización de **biomateriales biocompatibles** de fibrina y agarosa permitieron elaborar un hidrogel eficiente para el crecimiento de brotes axonales a su través que favoreció la regeneración nerviosa. Estos constructos de biomateriales incluidos en conductos nerviosos comercializados de colágeno lograron poner en contacto ambos cabos nerviosos, solventando así la zona de defecto y contribuyendo a su reparación.
3. La **evaluación clínica y funcional** de los animales en los que se implantaron conductos tridimensionales de biomateriales de fibrina y agarosa con ADSC demostró la utilidad de estos constructos para el tratamiento de lesiones nerviosas con defecto de 10 mm en un modelo animal. Los animales tratados con biomateriales con ADSC mostraron mejores parámetros neurofisiológicos de regeneración nerviosa, menor retracción muscular neurógena, menos úlceras neurotróficas y menos automutilaciones que los tratados sin ADSC y que los tratados sin biomateriales.
4. Los **resultados histológicos** ponen de manifiesto que el modelo de regeneración nerviosa descrito en esta Tesis Doctoral es capaz de inducir cierto grado de regeneración y reparación de la lesión nerviosa provocada, lo cual se correlaciona con los hallazgos clínicos y neurofisiológicos. La aplicación de biomateriales y ADSC al conducto nervioso de colágeno resulta en una mayor longitud y diámetro del frente de regeneración axonal, traduciéndose en un mayor grado de regeneración nerviosa. El **análisis inmunohistoquímico** del conducto nervioso obtenido mediante Ingeniería Tisular e implantado *in vivo* en un modelo animal, puso de manifiesto la expresión de proteínas implicadas en el proceso de regeneración nerviosa, destacando la proteína S100, Neurofilamento y Laminina. Este hecho sugiere que los constructos tridimensionales de fibrina-agarosa con ADSC generados en el laboratorio podrían favorecer y promover el proceso de regeneración y reparación nerviosa periférica y, por tanto, abren la puerta a un potencial uso clínico en humanos.

5. El proceso de regeneración nerviosa en los animales a los que se han aplicado conductos nerviosos rellenos de biomateriales de fibrina-agarosa con y sin células madre se produce fundamentalmente a expensas de los **brotos colaterales (*collateral sprouting*)**, que llevan un trayecto paralelo al cabo distal del nervio, lo que implica que el proceso de regeneración nerviosa periférica no se produce mediante la penetración de los brotes axonales en el cabo distal del nervio como se esperaba.

# BIBLIOGRAFÍA.

# BIBLIOGRAFÍA:

La bibliografía utilizada para la realización de esta tesis doctoral es la que sigue, por orden alfabético:

1. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernandez- Montoya A, Campos A. Time- course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 350- 9.
2. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JI, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, Campos A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe x- ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007; 211: 692- 98.
3. Alnot JY. Brachial plexus palsies: palliative surgery. IN: J-Y and Narnkas A, eds. *Traumatic brachial plexus injuries*. Expansion Scientifique Francaise: Paris 218-220.
4. Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res* 2004; 26: 233-9.
5. Androutsellis-Theotokis A, Walbridge S, Park DM, Lonser RR, McKay RD. Cholera toxin regulates a signaling pathway critical for the expansion of neural stem cell cultures from the fetal and adult rodent brains. *PLoS One*. 2010 May 26;5(5)
6. Apel JP, Garrett JP, Sierpinski P, Ma J, Atala A, Smith TL, Koman LA, Van Dyke ME. Peripheral Nerve Regeneration using a keratin-based scaffold: long term functional and histological outcomes in a mouse model. *J Hand Surg* 2008; 33(9): 1541-47
7. Ashley WW, Weatherly T, Park TS. Collagen nerve guides for surgical repair of brachial plexus birth injuru. *J Neurosurg* 2006; 105: 452-456.
8. Beauchamp JR, HeslopL, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151:1221- 1234.
9. Behravesh E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367(S): 118-29.
10. Best TJ, Mackinnon SE, Midha R. Revascularization of peripheral nerve autografts and allografts. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 152-160.

11. Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Concedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow derived mesenchymal stem cell. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 460-6.
12. Bjerknes M, Chen H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:767-777.
13. Bora FW, Richardson S, Black J. The biomechanical responses to tension in a peripheral nerve. *J Hand Surg Am* 1980; 5: 21-5.
14. Brunelli GA, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. Brindling nerve defects with combined skeletal and vein conduits. *Microsurgery* 1993; 14(4):247-51.
15. Brushart TM. Nerve repair and grafting. *Green operative hand surgery*. Fourth edition. Volume 2. Pennsylvania: Churchill and Livingstone, 1999: 1381-99.
16. Bumgardner J.D., Wiser R., Gerard P.D., Bergin P., Chestnutt B., Marin M., Ramsey V., Elder S.H., Gilbert J.A. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J. Biomater Sci Polym* 2003; 14(5), 423- 38.
17. Bunting S, Di Silvio L, Deb S, Hall S. Bioabsorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg British and European* 2005; 30B: 242-47.
18. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 2004; 16: 1-7.
19. Cajal RS. *Degeneration and Regeneration of the nervous system*, vol 1. London: Oxford University Press, 1928.
20. Campbell W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical neurophysiology* 2008; 119: 1951-1965.
21. Carolina Marañes Gálvez. Tesis Doctoral: Potencialidad Queratinocítica de las células madre de la Gelatina de Wharton para su utilización en la Ingeniería Tisular. Universidad de Granada. 2010
22. Caspar- Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Pènicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 2005; 579: 3487- 92.
23. Casteilla L, Planat- Börnard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G., Carrière A., Pènicaud L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss* 2005; 98: 922 -26.

24. Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. Wallerian Degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin* 1992; 10: 613-27.
25. Chiu DTW, Strauch b. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconst Surg* 1990; 86: 928-34
26. Ciriza J, García-Ojeda ME. Expression of migration-related genes is progressively upregulated in murine Lineage-Sca-1+c-Kit+ population from the fetal to adult stages of development. *Stem Cell Res Ther* 2010 May 20;1(2):14.
27. Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 2001; 12: 341-352.
28. Dahlin LB. Nerve injury and repair: from molecule to man. In: Slutsky DJ, Hentz VR, editors. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2006. P. 1-22.
29. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH and Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization - associated molecules on multi - lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; 89: 267- 270.
30. Dent EW, Tang F, Kalil K. Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*. 2003 Oct; 9(5):343-53.
31. Devries GH. Schwann cell proliferation. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, et al., eds. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders, 1993. Pp: 290-8.
32. Di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Recons Aesth Surg* 2010; 63(9): 1544-52
33. Diao E, Vannuyen T. Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin* 2000; 16: 53-66.
34. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97. 70.
35. Dvali LT, Myckatyn TM. End to side Nerve Repair: Review of the literature and clinical indications. *Hand Clin* 2008; 24: 455-460.
36. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennet GJ. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanism and treatment recommendations. *Arch Neurol* 2003; 60: 1524-34.

37. Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando la Ingeniería Tisular. Arch Argent Pediat 2000; 98 (2): 103-114.
38. Fenrich K, Gordon T. Canadian association of neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems-current issues and advances. Can J Neurol Sci 2004; 31: 142- 56.
39. Ferrer JMR, Cobo M, Mora F. The basolateral limbic circuit and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Physiology and Behaviour 1987; 40: 291-295.
40. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 102.
41. Forbes SJ, Vig P, Poulosom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. Clin Sci (Lond) 2002 a; 103: 355-369.
42. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basic of peripheral nerve regeneration. Mol Neurobiol 1997; 14: 67-116.
43. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. J Cell Biol 1993; 123: 455-65.
44. Gallo G, Letourneau P. Axon guidance: proteins turnover in turning growth cones. Curr Biol 2002; 12R: 560-2.
45. García López, A et al eds. Patología del Plexo Braquial. Momento Médico: Madrid. p 133-148
46. Garzón I (1), Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. Ex vivo and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. Journal of Periodontal Research 2009; 44(5):588-597.
47. Garzón I (2), Serrato D, Roda O, Sánchez-Quevedo MC, González-Jaranay M, Moreu G, Nieto-Aguilar R, Alaminos M, Campos A. Ex vivo cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. International Journal of Artificial Organs 2009; 32(10):711-719.
48. Garzon I, Sanchez- Quevedo M C, Moreu G, Gonzalez-Jaranay M, Gonzalez-Andrades M, Montalvo A, Campos A. and Alaminos M. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. J. Periodontal Res 2009; 44(5): 588- 97
49. Gerhmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic inmunoefector cell of the brain. Brain Res Rev 1995; 20: 269-287.

50. Giddins GEB, Wade PJF, Amis AA. Primary nerve repair: strength of repair with different gauges of nylon suture material, *J Hand Surg* 1989; 14 B: 301.
51. Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve* 2005; 31: 694-701.
52. González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2009; 3(6):442-449.
53. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Periph Nerv Syst* 2003; 8: 236-50.
54. Gorman PW, Dell PC. Instrumentation for nerve repair, in Gelberman RH(ed): *Operative Nerve Repair and Reconstruction*. Philadelphia, PA, Lippincott, 1991, p275-285.
55. Gregory J, Cowey A, Jones M, Pickard S, Ford D. The anatomy, investigations and management of adult brachial plexus injuries. *Orthop and Trauma* 2009; 23(6): 420-32.
56. Grodzinski P., Silver M., Molnar L.K. Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert. Rev. Mol. Diag* 2006; 6(3):307- 18.
57. Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of muscle precursor cells *in vivo* by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tiss Res* 1992 ; 267: 99-104.
58. Gudemez E, Ozer K, Cunningham B, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. *Microsurgery* 2002; 22: 234–41.
59. Hall S. Mechanisms of repair after traumatic injury. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: Elsevier, Saunders: 2005. P 1403-33.
60. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989; 15: 513-29.
61. Hall SM. The biology of chronically denervated Schwann cell. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 215-33.
62. Hasegawa T, Nakamura S, Manabe T, et al. Vascularized nerve grafts for treatment of large nerve gap after severe trauma to an upper extremity. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004; 124: 209-213.

63. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2):754-753.
64. Hernández-Cortes P, Garrido-Gómez J et al. Failed digital nerve reconstruction by foreign body reaction to NeuroLac nerve conduit. *Microsurgery* 2010; 30: 414-6
65. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31 (3):485-98.
66. Hutmacher D.W., Goh J.C., Teoh S.H. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications, *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30: 183- 91.
67. Ichiara S, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury* 2008 Oct; 39 Suppl 4:29-39. Review
68. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006; 3(10): 589-601 Review.
69. Ionescu AM, Cardona JC, González-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, Pérez MM. UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240-400nm Range. *Cornea* 2010; [en prensa].
70. Ishaug S.L., Crane G.M., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos AG. Bone formation by three- dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1): 17- 28.
71. Itoh S, Takakuda K, Kawabata S et al. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2002; 23: 4475-4481
72. Jayasinghe SN. Cell engineering: spearheading the next generation in healthcare. *Biomed Mater* 2008 Sep; 3(3).
73. Jiang L, Zhu JK, Xiang P, Hu J, Yu WH. Differentiation of rat adipose tissue derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Regeneration and Transplantation* 2008; 19(10): 1015-19.
74. Jiao H, Yao J, Yang Y, Chen X, Lin W, Li Y. Chitosan/ polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segments. *Biomaterials* 2009; 30: 5004-18.
75. Junquera LCU, Bignolas G and Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 1979; 11: 447-455.

76. Kanaya F, Firrell j; Tsai TM, et al. Functional results of vascularized versus non vascularized nerve grafting. *Plast Reconst Surg* 1992; 80:924-930.
77. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 2003; 32: 975-85.
78. Kararizou E, Davaki P, Spengos K, Karandreas N, Dimitracopoulos A, Vassilopoulos D. Churg-Strauss syndrome complicated by neuropathy: a clinicopathological study of nine cases. *Clin Neuropathol* 2011 Jan-Feb; 30(1):11-7.
79. Kashiwa K, Kobayashi S, Nasu W, Kuroda T, Higuchi H. Facial Nerve Reconstruction Using a Vascularized Lateral Femoral Cutaneous Nerve Graft Based on the Superficial Circumflex Iliac Artery System: An Application of the Inferolateral Extension of the Groin Flap. *J Reconstr Microsurg* 2010 Nov; 26(9): 577-82.
80. Kater SB, Reder V. The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 68-74.
81. Keeley RD, Nguyen KD, Stephanides MJ et al. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer hydrogel with polyglycolic acid conduits. *J Reconst Microsurg* 1991; 7: 93-100.
82. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods. Theory and practice.* 4<sup>th</sup> edition by Scion Publishing Limited. 2008.
83. Kim SM, Lee SK, Lee JH. Peripheral Nerve Regeneration using a three dimensionally cultured Schwann cell conduit. *J Craniofacial Surg* 2007; 18(3): 475-488.
84. Kingham PJ, Kalbertmatenn DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 2007 207; 267-274.
85. Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropath Exp Neurol* 1953; 12: 400-403.
86. Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 2004; 220: 115-7.
87. Kwan M.D., Wan D.C., Longaker M.T. (2007). *Principles of tissue engineering. Skeletal - tissue engineering.* 3<sup>rd</sup> . Edit. 62, 935- 44. p.935.
88. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue- derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 929- 39.

89. Lohemyer J, Zimmermann S, Sommer B et al. Bridging peripheral nerve defects by means of nerve conduits. *Der Chirurg* 2007; 78: 142-147.
90. Luis AL, Rodrigues JM, Lobato JV, Lopes MA, Amado S, Veloso AP, Armada-da-Silva PAS, Raimondo S, Geuna S, Ferreira AJ, Varejao ASP, Santos JD, Mauricio AC. Evaluation of two biodegradable nerve guides for the reconstrucción of the rat sciatic nerve. *Biomedical Materials and Engineering* 2007; 17: 39-52.
91. Lunn Er, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience* 1990; 35: 157-65.
92. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramkrishna S. Potential of nanofiber matrix a tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 2005; 11(1-2): 101-9
93. Mackinnon SE, Doolabh V, Novak CB, et al. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 1419-1429.
94. Mackinnon SE, Hudson AR. Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plast Reconst Surg* 1992; 90: 695-699
95. Mackinnon SE. Nerve allotransplantation following severe tibial nerve injury. *J Neurosurg* 1996; 84: 671-676
96. Maricevic A, Erceg M. War injuries to the extremities. *Mil Med* 1997; 162: 808-11.
97. Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Nakamura T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)- collagen tube filled with laminin coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res* 2000; 868 (2): 315-28.
98. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte- derived differentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215: 210- 22.
99. Matthews G. Neurotransmitter release. *Ann Rev Neurosci.* 1996; 19: 219-233.
100. McIntosh K, Zvonic S, Garret S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose- derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24: 1246- 53.
101. Meana A., Iglesias J., Del Rio M., Larcher F., Madrigal B., Fresno MF., Martin C., San Roman F. and Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*, 1998, 24, 621-630.

102. Meek MF, Jansen K, Steendam R et al. In vitro degradation and biocompatibility of poly (DLLA-E-CL) nerve guides. *J Biomed Mater Res* 2004; 68A: 43-51.
103. Meek MK, Coert JH. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-Approved Absorbable Nerve Conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Annals of Plastic Surgery* 2008; 60(4): 466-472
104. Millesi H. Microsurgery of peripheral nerves. *Hand* 1973; 5: 157-60.
105. Millesi H. Microsurgery of the peripheral nerves. *Hand* 1973; 5: 157-160.
106. Miyata t, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterials use. *Clin Mater* 1992; 9: 139-148.
107. Mohanna PN, Terenghi G, Wiberg M. Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long term evaluation. *Scand Plast Reconstr Surg* 2005; 39: 129-137
108. Mourad PD, Lazar DA, Curra FP, Mohr BC, Andrus KC, Avellino AM, et al. Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. *Neurosurgery* 2001; 48: 1136–40.
109. Munirah S., Kim S.H., Ruszymah B.H., Khang G. The use of fibrin and poly (lactic- co- glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis. *Eur Cell Mater* 2008; 21(15): 41 - 52.
110. Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res* 2004; 26: 124-138.
111. Myckatyn TM, Mackinnon SE. Surgical Techniques of Nerve Grafting. *Oper Tech Orthop* 2004; 14: 171-178.
112. Narakas A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am.* 1988 Jan; 19(1):187-99.
113. Neuss S., Apel C., Buttler P., Denecke B., Dhanasingh A., Ding X., Grafahrend D., Groger A., Hemmrich K., Herr A., Jahnen- Dechent W., Mastitskaya S., Perez- Bouza A., Rosewick S., Salber J., Waltje M., Zenke M.. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell - based tissue engineering. *Biomater* 2008; 29: 302- 13.
114. Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, Mackinnon SE. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2004 Dec; 190(2):347-55.
115. Nieto-Aguilar R, Serrato D, Garzon I, Campos A, Alaminos M. Pluripotential Differentiation Capability of Human Adipose-derived Stem Cells in a Novel Fibrin-agarose Scaffold. *J Biomater Appl.* 2010 Mar 17.

116. Nolan K, Millet Y, Ricard C, Stabler CL. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell transplant* 2008; 17(3): 241-3 Review.
117. Oedayrajsingh-Varma M, Van Ham S, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nu Lend J, Schouten TE, Ritt MJ, Van Milligen FJ. Adipose tissue- derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue- harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006; 8: 166- 77.
118. Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Surg* 2010; 8; 1-8.
119. Park DH, Borlogan CV, Eve DJ, Sandberg PR. The emerging field of cell and tissue engineering. *Med Sci Monit* 2008 Nov; 14(11): RA 206-20.
120. Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197: 441-456. 203
121. Raff MC, Withmore AV, Finn JT. Axonal self destruction and neurodegeneration. *Science* 2002; 296: 868-71.
122. Rao M, Mattson MP. Stem cell and aging: expanding the possibilities. *Mach Ageing Dev* 2001; 122(7): 713-4
123. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol*; 2009.
124. Reichl S. and Muller-Goymann C.C. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* 2003, 250, 191-201.
125. Robertson JD. The unit membrane of cells and mechanism of myelin formation in ultrastructure and metabolism of the nervous system. *Proc Assoc Nerv Ment Baltimore*. Williams and Wilkins, p 64, 1962.
126. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle nerve* 2000; 23:863-73.
127. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004; 57: 173-186.
128. Rouholamin E, Wootton R, Jamieson AM. Arthrodesis of the shoulder following brachial plexus injury. *Injury* 1991; 22: 271-4
129. Rowshan K, Jones NF, Gupta R. Current Surgical techniques of peripheral nerve repair. *Oper Tech Orthop* 2004; 14: 163-170.

130. Rudge P, Ochoa J, Gilliatt RW. Acute peripheral nerve compression in the baboon. *J Neurol Sci* 1974; 23: 403-20.
131. Saadeh P.B. Khosla R.K., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., McCormick S.A., DeVore D.P., Longaker M.T. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J Craniofac Surg* 2001; 12: 573- 79.
132. Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzón I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol. Histopathol* 2007; 22: 631-40.
133. Sarikcioglu L, Oguz N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Int J Neurosci* 2001; 109:173–7.
134. Schaffler A, Buchler C. Concise review: Adipose tissue- derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell- based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818- 27.
135. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1990; 13: 785-800.
136. Seddon H. Three types of nerve injuries. *Brain* 1943; 66: 237-88.
137. Seddon HJ(ed): surgical disorders of peripheral nerves. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1975.
138. Senes FM, Campus R, Becchetti F, Catena N. Upper limb nerve injuries in developmental age. *Microsurg* 2009; 29: 529-535.
139. Seol Y.J., Lee J.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Young - Ku, Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* 2004; 26(13): 1037-41
140. Serrato D, Nieto-Aguilar R, Garzón I, Roda O, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the histological architectural patterns of tissues generated by tissue engineering under different protocols of cryopreservation. *Histology and Histopathology* 2009; 24(12):1531-1540.
141. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 2002 Apr 15; 22(8):3052-60.
142. Shen ZL, Berger A, Hierner R, Allmeling C, Ungewickell E, Walter GF. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft. *Microsurgery* 2001;21(1):6-11.

143. Shin RH, Friedrich PF, Crum BA, Bishop AT, Shin AY. Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: a comparison of commercially available conduits. *J Bone Joint Surg* 2009; 2194-204
144. Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Brück W. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000 110:177–185.
145. Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res* 2004; 26: 218-225.
146. Sketelj J, Bresjanac M, Popović M. Rapid growth of regenerating axons across the segments of sciatic nerve devoid of Schwann cells. *J Neurosci Res* 1989 Oct;24(2):153-62.
147. Solchaga L.A., Gao J., Dennis J.E., Awadallah A., Lundberg M., Caplan A.I., Goldberg V.M. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan- based delivery vehicle. *Tissue Eng* 2002 8(2): 333-47.
148. Stanec S, Tonkovic I, Stanec Z, Tonkovic K, Dzepina I. Treatment of upper limb nerve war injuries associated with vascular trauma. *Injury* 1997; 28: 463-8.
149. Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials* 2005;26(36):7636-41
150. Stocum DL. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Rep Reg* 1998; 6: 276-290.
151. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: Participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 1989; 18: 671–683.
152. Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insight. *Brain Pathol* 1999; 9: 313-25.
153. Sun K, Zhang J, Chen T, Chen Z, Chen Z, Li Z, Li H, Hu P. Three dimensional reconstruction and visualization of the median nerve from serial tissue sections. *Microsurg* 2009; 29: 573-577.
154. Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore. Williams and Wilkins; 1978.
155. Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain* 1945; 68: 243.

156. Taniuchi m; Clarck HB, Johnson Jr EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4094-8.
157. Taras JS, Jacoby SM. Repair of lacerated peripheral nerves with nerve conduits. Tech Hand and Upper Extrem Surg 2008; 12(2): 100-106
158. Taras JS, Jacoby SM. Repair of lacerated peripheral nerves with nerve conduits. Tech in Hand and Upper Extrem Surg 2008; 12(2): 100-106.
159. Taras JS, Nanavati V, Steelman P. Nerve conduit. Journal of hand therapy 2005; 18(2): 191-7
160. Tark KC, Roh TS. Morphometric study of regeneration through vascularized nerve graft in a rabbit sciatic nerve model. J Reconst Microsurg 2001; 17: 109-114.
161. Terzis JK, Vekris MD, Soucacos PN. Outcomes of brachial plexus reconstruction in 204 patients with devastating paralysis. Plast Reconst Surg 1999; 104: 1221-40.
162. Thowfeequ S, Myatt EJ, Tosh D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. Dev Dyn. 2007 Dec; 236(12): 3208-17. Review
163. Tofaris G, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in process regulated by interleukin-6 and LIF. J Neurosci 2002; 22:6696–6703.
164. Tsai RY, Kittappa R, Mc Kay RGD. Plasticity, inches, and the use of stem cells. Dev Cell 2002; 2: 707-712.
165. Tung TH, Weber RV, Mackinnon SE. Nerve Transfers for the upper and lower extremities. Oper Tech Orthop 2004; 14: 213-222.
166. Tupper JW, Crick JC, Matteck LR. Fascicular nerve repairs. A comparative study of epineural and fascicular techniques. Orthop Clin North Am 1988; 19: 57-69.
167. Udina E, Ceballos D, Verdu E, Gold BG, Navarro X. Bimodal dosedependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. Muscle Nerve 2002; 26:348–55.
168. Vargas ME, Barres BA. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? Annu Rev Neurosci 2007; 30:153–179.
169. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK. Stem cells: sources and applications. Clin Otolaryngol 2002; 27: 227-232.

170. Walgenbach K.J., Voigt M ., Riabikhin A.W., Andree C ., Schaefer D.J ., Galla T.J. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery 2001; 263: 372 - 8.
171. 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. Philos Trans R Soc Lond 1850;140:423–429.
172. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. Clin Plast Surg 2005; 32:605–16.
173. Wei Y, Sun X, Wang W and Hu Y. Adipose- derived stem cells and chondrogenesis. Cytotherapy 2007; 9: 712 - 16.
174. Weinzierl K, Hemprich A and Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. J Craniomaxillofac Surg 2006; 34 : 466-471
175. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosebaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003; 112: 1796- 1808.
176. Weiss L. Histología. Ed. Ateneo. Madrid. 4º Edición, 1982. P 297-300.
177. Weiss P. Further experimental evidence against (neurotropism) in nerve regeneration. J Exp Zool 1944; 95: 233-57.
178. Weissman IL, Wagers AJ. Plasticity of adult stem cells. Cell 2004; 116: 639-648
179. Whitlock E, Kasukurthi R, Yan Y, Tung TH, Hunter DA, Mackinnon SE. Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. Microsurgery 2010; 30(3): 218-22.
180. Xu Y, Malladi P, Wagner DR and Longaker MT. Adipose- derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. Curr Opin Mol Ther 2005; 7 : 300- 305.
181. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors. Tissue Eng 2001 7(6): 679- 89
182. Yawo H, Kuno M. Calcium dependence of membrane sealing at the cut end of cockroach giant axon. J Neurosci 1985; 5: 1626-32.
183. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T and Harii K. Cell - assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose- derived stem cells, Dermatol Surg 2008; 34(9): 1178-85.

184. Young HE, Duplaa C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH y cols. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* 2001a; 263:350-360.
185. Young HE, Steele T, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins KC. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001b; 264:51-62.
186. Young HE. Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004 a; 280:71-109.
187. Young HE. Stem cells and tissue engineering. En *Gene Therapy in Orthopaedic and Sports Medicine* (Huard J, Fu FH, eds). Springer-Verlag, New York, 2000 pp 143-173.
188. Zavan B, Michelotto L, Lancerotto L, Della Puppa A, D'Avella D, Abatan gelo G, Vindigni V, Cortivo R.. Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurol Res* 2010 Feb; 32(1): 47- 54.
189. Zhang Z, Soucacos PN, Beris AE, Bo J, Ioachim E, Johnson EO. Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg* 2000 May; 16(4):303-11.
190. Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M et al. Specificity of muscle reinnervation following repair of the transected sciatic nerve. A comparative study of different repair techniques in the rat. *J Hand Surg Br* 1992; 17: 257-61.
191. Zochodne DW, Levy D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol* 2005; 51: 255-67.