



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
Instituto de Neurociencias

Evaluación de la electroconducción de la tubulización con quitosana y silicona aplicadas en la axotomía-tubulización del nervio ciático de la rata.

TESIS

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(opción Neurociencias)

presenta

Eduardo Emilio Castellanos Martínez

Comité Tutelar

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda (Director)

Dr. Jorge Juárez González

Dra. Marisela Hernández González

Dr. Manuel Rosales Cortés

Asesor

Mtro. Daniel Zarabozo E. de R.

Guadalajara, Jalisco

Junio de 2003

CONTENIDO

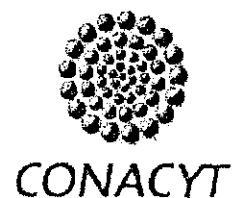
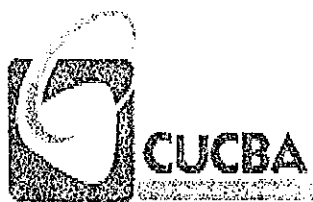
Abreviaturas.....	
Agradecimientos.....	
Resumen.....	X
Introducción.....	1
Planteamiento del problema.....	83
Hipótesis.....	84
Objetivos.....	85
Material y métodos.....	87
Resultados.....	98
Discusión.....	123
Conclusiones.....	136
Bibliografía.....	138
Anexo.....	

Abreviaturas

- ACTH.** *Hormona adrenocorticotropa.*
- ANOVA.** *Análisis de varianza aleatoria.*
- BDNF.** *Factor nervioso derivado de cerebro.*
- bFGF.** *Factor de crecimiento fibroblástico-b.*
- CAM.** *Molécula de adhesión celular.*
- CNTF.** *Factor neurotrófico ciliar.*
- GAP-43.** *Proteína de crecimiento axónico-43.*
- IFC.** *Índice funcional del ciático.*
- IGF-1.** *Factor de crecimiento nervioso 1 derivado de la insulina.*
- IL-1.** *Interleucina 1*
- L2.** *Lumbar 2*
- L3.** *Lumbar 3*
- L4.** *Lumbar 4*
- L5.** *Lumbar 5*
- L6.** *Lumbar 6*
- LTB₄.** *Leucotrieno B₄.*
- m/s.** *Metros/segundo.*
- mV.** *Milivolts*
- N-CADHERINA.** *Caderina neural.*
- N-CAM.** *Molécula de adhesión celular neural.*
- NGF.** *Factor de crecimiento nervioso.*
- PGE₂.** *Prostaglandina E2.*
- PMN.** *Polimorfonuclear.*
- Q.** *Quitosa.*
- S.** *Silicona.*
- S2.** *Sacra 2*
- SNC.** *Sistema nervioso central*
- SNP.** *Sistema nervioso periférico*
- T3.** *Hormona tiroidea 3.*
- T4.** *Hormona tiroidea 4.*
- VCN.** *Velocidad de conducción nerviosa.*

El trabajo se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con referencia numero 30437-M, y se llevó a cabo en el Laboratorio de Morfología del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45110. Tel. y Fax: (+52-33) 36 82 09 18.

***EVALUACIÓN DE LA ELECTROCONDUCCIÓN
DE LA TUBULIZACIÓN CON QUITOSANA Y
SILICONA APLICADAS EN LA AXOTOMÍA-
TUBULIZACIÓN DEL NERVIIO CIÁTICO DE LA
RATA.***



RESUMEN

Se evaluaron las propiedades de electroconducción de la tubulización en el nervio ciático de la rata axotomizado y tubulizado con prótesis bioactivas de quitosana en comparación con una prótesis sintética de silicona aplicadas para facilitar la reparación de una sección de 5 mm del nervio, esta técnica se llevó a cabo en la extremidad posterior izquierda del animal. Planteamos la hipótesis de que se puede mantener la conducción del impulso nervioso a través de la tubulización del nervio ciático axotomizado de la rata, siendo mejor la prótesis orgánica de quitosana que la de silicona aplicada en la reparación del nervio. Se utilizaron 36 ratas macho adultas de la cepa Wistar entre 250 y 300 gramos (18 para el grupo de quitosana y 18 para el grupo de silicona). La reparación del nervio ciático de la rata fue inducida en un defecto de 5 mm mediante la técnica de tubulización con prótesis bioactivas compuestas por el biomaterial quitosana y prótesis de silicona. Se determinó si ocurre conducción del impulso nervioso a través de la cámara de crecimiento axónico, para esto, se valoró el voltaje y velocidad del impulso, esta técnica se llevó a cabo a los 10, 30 y 60 días postlesión colocando un electrodo de estimulación y otro de registro en el muñón proximal y distal respectivamente a una distancia de 1 cm uno del otro. También se observó la recuperación de las funciones motoras mediante la prueba del índice funcional del nervio ciático en la rata por el método de De Medinaceli (Bain y col., 1989). Este se llevó a cabo en un túnel de deambulación en el cual se colocó papel xerográfico en el piso del túnel para que la rata dejara impresa la huella de la pata posterior izquierda, ya que esta previamente se impregnó de tinta negra. Con esta técnica se comparó la pisada del animal antes y después de la lesión, además se incluyó una prueba de sensibilidad mediante una descarga eléctrica 6 V, esta prueba fue aplicada antes y después de la lesión. La propuesta actual está basada en los resultados favorables que se han obtenido con este biomaterial estimulando la reparación del nervio ciático de la rata, conejo y del perro. En trabajos anteriores se demostró la reparación utilizando una prótesis bioactiva de quitosana, pero no se ha demostrado si la prótesis, al ser colocada entre los dos muñones, permite la conducción de impulsos, antes de que ambos muñones hagan contacto entre sí, o mejor aun, como es la conducción cuando ya se ha formado un cable de crecimiento dentro del tubo. Los resultados de la electroconducción que se obtuvieron con ambos tipos de prótesis fueron favorables, no habiendo diferencias significativas en la prueba del IFC (Índice funcional del ciático), pero parece haber una tendencia a ser mejor la prótesis de quitosana que la silicona, en cuanto a reparación del nervio ciático, ambas prótesis fueron exitosas ya que se observó tejido nervioso reparado. La recuperación sensorial fue buena para ambas prótesis, pero se obtuvieron resultados pobres en la recuperación motora.

INTRODUCCIÓN

Sistema nervioso periférico.

Esta constituido básicamente por los nervios, ganglios y terminaciones nerviosas, a su vez los nervios son clasificados en craneales y espinales, los nervios periféricos consisten de fibras miélinicas y fibras amielínicas y capas de tejido conectivo.

De manera general, los nervios sensitivos y motores se proyectan de uno a otro lado agrupados en un solo cordón, de lo que resultan nervios mixtos. Los nervios espinales son pares, se desprenden de la médula espinal a distintos niveles y se distribuyen simétricamente, en su trayecto emiten arborizaciones colaterales y terminales al final (Getty, 1989; Hildebrad, 1982).

La médula espinal es una masa cilíndrica alargada de tejido nervioso que ocupa dos tercios superiores del conducto raquídeo, está protegida por las vértebras, ligamentos y por las meninges que contienen líquido cerebro-espinal. En un corte transversal se distingue un masa interna de sustancia gris en forma de H rodeada por sustancia blanca (Lesson, 1987; Werner, 1988). Los brazos superiores de la H son llamadas astas dorsales de materia gris y los inferiores más cortos y anchos, astas ventrales. Los somas neuronales de asociación, que establecen sinapsis con las fibras somáticas sensoriales, se localizan en el lado medio de una asta dorsal. Los somas neuronales que sinaptan con las fibras viscerales están localizados en una zona mas pequeña, lateral y ligeramente más ventral de la columna dorsal. Los somas de las neuronas motoras somáticas se encuentran en las columnas ventrales. Por su parte, los somas neuronales motores viscerales se encuentran en una zona pequeña, intermedia y lateral. La zona de sustancia gris, justamente arriba y debajo del canal central, hace el

brazo intermedio de la H y contiene somas neuronales que proyectan fibras de un lado hacia el otro de la médula (Ganong, 1997; Getty, 1986; Hildebrad, 1982).

La sustancia blanca externa se encuentra dividida en lados derecho e izquierdo por el tabique dorsal medio y la fisura ventral de la médula. A su vez, cada lado está dividido por las astas de sustancia gris en tres funículos ó fascículos; el dorsal se localiza entre la columna dorsal y el tabique dorsal medio, proyecta los axones hacia el cerebro; el lateral se encuentra entre las columnas dorsal y ventral, transmite las fibras en esas direcciones, aquellas orientadas hacia el cerebro tienden a ser más superficiales; finalmente, a través del funículo ventral, corren fibras desde el cerebro hacia los dominios medulares correspondientes (Ganong, 1997; Getty, 1986; Hildebrad, 1982). Además de somas de neuronas motoras y sensitivas, en la médula espinal están presentes astrocitos, células de microglia, fibras mielinizadas y no mielinizadas (Lesson, 1987).

Estructura de un nervio periférico.

En la composición de un nervio periférico, hemos de considerar diversos elementos, concretamente el cilindro-eje o axón, que es la prolongación emitida por una célula nerviosa y las vainas de recubrimiento de naturaleza celular (citoplasma de las células de Schwann) o lipoproteica (mielina, formada por una envoltura repetida de la membrana de la célula de Schwann). Esto es lo que nos permite dividir a las fibras nerviosas en mielínicas y amielínicas. Las fibras mielínicas tienen una vaina de mielina y son de topografía periférica (en el nervio) o central (en la sustancia blanca). Las fibras amielínicas carecen de vaina de mielina y generalmente están agrupadas en el citoplasma de una célula de Schwann (en el nervio) o libres (terminaciones nerviosas).

La fibra nerviosa viaja, a su vez, inmersa en un tejido conectivo que la soporta y le proporciona su unidad anatómica, siendo en realidad quien nos permite actuar quirúrgicamente sobre el nervio periférico. El elemento que rodea a cada fibra nerviosa y sin solución de continuidad constituye un entreverado de tejido conjuntivo laxo que rellena los espacios libres, resultando el endoneuro. Un grupo de fibras nerviosas constituye un fascículo nervioso, que se encuentra envuelta en el perineuro, más duro y rico en fibras colágenas dispuestas perpendicularmente al eje longitudinal del nervio. El espacio interfascicular se encuentra relleno por un tejido conectivo laxo, por donde transcurren los vasos del sistema linfático y las arborizaciones vasculares del nervio, encontrándose todo agrupado gracias a un tejido conectivo abundante, con fibras de colágena longitudinales y que dotan al nervio de independencia macroscópica (epineuro) (González, 1992; Krinke, 2000).

La vaina de mielina de un nervio periférico está rodeada por el protoplasma de una célula de Schwann, también está presente una membrana basal, ambas estructuras envuelven el internodo, aislando las fibras nerviosas entre sí. Las cisuras de Schmidt-Lanterman aparecen en una sección longitudinal del nervio, como desdoblamientos de las líneas principales de las envolturas laminares que contienen citoplasma. En reconstrucciones tridimensionales se observó que los espacios de las cisuras están dispuestos siguiendo un trayecto espiral y sus contenidos citoplásmicos están intercomunicados. Las prolongaciones marginales de las células de Schwann se extienden e interdigitan en el ámbito de los nodos de Ranvier formando una cubierta entre ellos, en contraste con lo que sucede en las fibras centrales (Wynn, 1987) (Figura 1 y 2).

Durante el desarrollo posnatal, los axones no se han mielinizado y conforme maduran son envueltos por vainas de mielina, en los mamíferos son relativamente pequeños, su diámetro es de 20 μm o menos (Ganong, 1997), en el conejo, el diámetro normal del axón mielinizado varía de 1 a 10 μm y el espesor de mielina es de 1.2 μm (Chen y col., 1989; Spector y col., 1993), el diámetro del nervio regenerado en ratas varía de 4.01-15.16 μm (Chen y col., 1995), en el humano el diámetro del axón mielinizado varía de 2-14 μm (Dumitru, 1994; Ochoa, 1969). Las fibras mielinizadas se encuentran envueltas por las prolongaciones citoplasmáticas de una célula de Schwann, en el interior del axón están presentes mitocondrias y filamentos organizados en dirección longitudinal. Una característica distintiva para identificar un axón a nivel ultraestructural es la presencia de neurofilamentos (Elder y col., 1999; Kelly y cols., 1992; Zhu y col., 1999). El número de fibras mielinizadas varía entre los distintos fascículos axónicos del mismo nervio.

A diferencia de las fibras mielinizadas, varias fibras amielínicas pueden ser envueltas por una sola célula de Schwann, en humanos el diámetro de estas fibras varía de 0.2 a 3 μm (Ochoa, 1969). En nervios humanos, el endoneuro encierra axones, células de Schwann, fibroblastos, células endoteliales vasculares, pericitos y ocasionalmente células cebadas de origen mesodérmico (Dumitru, 1994; Ochoa, 1969; Spector y col., 1993;); entre las envolturas de tejido conectivo del nervio periférico se distinguen fibroblastos, fibras de colágena, macrófagos y mastocitos (Kable y col., 1988; Varon, 1993). Mediante microscopía de luz no es posible diferenciar las células de Schwann de fibroblastos; el núcleo de las primeras es regular, compacto y localizado cerca de las fibras mielinizadas y en las no mielinizadas pueden apreciarse expansiones citoplasmáticas de estas células, por su parte el núcleo de los fibroblastos

es alargado e irregular y en su periferia se observan acúmulos de cromatina; mediante ultraestructura puede hacerse la diferenciación morfológica entre ambos tipos celulares. Estudios en el nervio sural humano revelaron un 91.8% de células de Schwann y 8.2% de fibroblastos (Ochoa, 1969).

La mielina del sistema nervioso periférico.

En el sistema nervioso periférico, la mielina esta formada por diferenciación de la membrana plasmática de las células de Schwann. Schwann fue el primero en descubrir estas células, llamadas con su nombre hace 160 años aproximadamente; las cuales describió como células planas con núcleos alargados, orientados longitudinalmente a lo largo de la fibra. El aislamiento eléctrico hecho por las células de Schwann en las láminas de mielina, requiere de grandes cantidades de material no conductivo alrededor de los segmentos del axón y, por lo tanto, se elimina de la célula todo el material acuoso y citosólico que sea posible. Las células de Schwann están constituidas por una membrana plasmática rica en lípidos y con alto contenido de galactoesfingolípidos, junto con una cadena larga de ácidos grasos saturados, se encuentran envolviendo a la membrana del axón, ajustándose a ella y envolviéndola varias veces.

Casi todo el material celular y citoplasmático conductivo es excluido de la membrana por fusión de las grandes superficies de las láminas de la membrana plasmática (formando una línea densa mayor). El acceso a la estructura entera, esta asegurada por canales citoplásmicos estrechos que corren en espiral a través de la lámina (incisiones de Schmidt-Lanterman) a los límites internos y externos de la mielina compacta (mesaxones internos y externos), a los bordes laterales de cada segmento de mielina (la región paranodal de los nodos de Ranvier) y al cuerpo celular. La región compacta de cada segmento de mielina, localizada entre dos nodos de Ranvier, es

llamada internodo. Las células de Schwann sintetizan un segmento de mielina alrededor de un solo axón, cada segmento comprende un internodo y dos medios nodos de Ranvier. Así, el componente glial de cada nodo de Ranvier esta formado por regiones laterales no compactados de dos células de Schwann adyacentes. Cada fibra mielinizada esta rodeada por un mucopolisacárido de la membrana basal, que es secretado por las células de Schwann (Figura 1 y 2) (Garbay y col., 2000).

El papel principal de la mielina es permitir la rápida transmisión del impulso nervioso a lo largo de los axones, a los cuales envuelve. La membrana de los axones mielinizados expresan numerosas moléculas y actividades fisiológicas, las cuales intervienen directamente en la transmisión del impulso nervioso, como los canales de sodio que son sensibles al voltaje y son capaces de propagar el potencial de acción a lo largo del axón. Las láminas de mielina tienen baja capacidad eléctrica, lo que le permite a la membrana axonal internodal, la despolarización con un consumo mínimo de energía. Un axón no mielinizado puede tener un diámetro 40 veces más grande que un axón mielinizado y puede consumir hasta 5000 veces más energía.

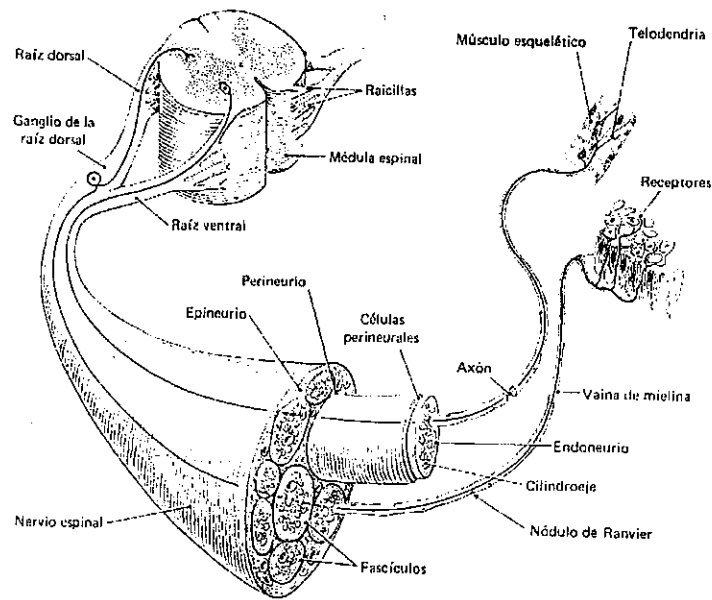


Figura 1. Diagrama que muestra las envolturas del nervio y sus relaciones con el Sistema Nervioso Central (Banks, 1986).

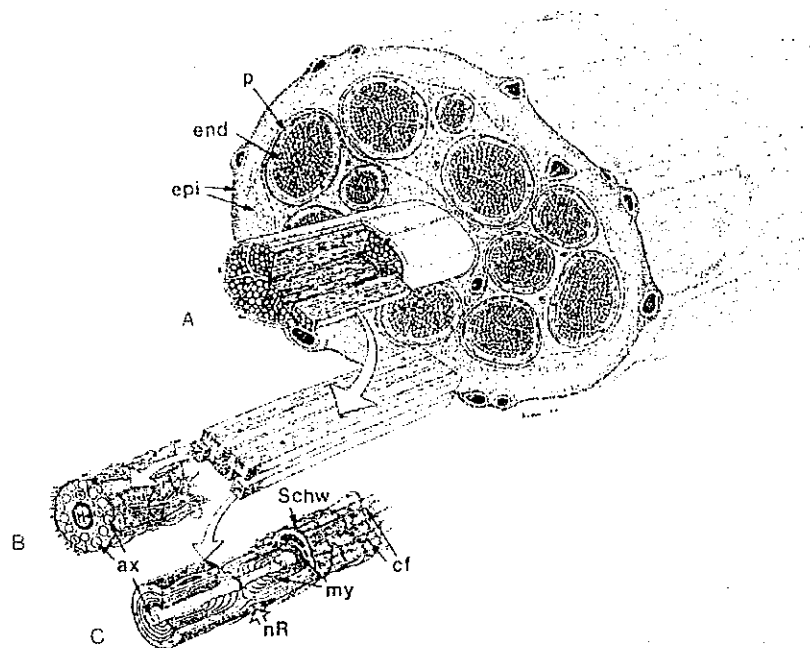


Figura 2. Microanatomía de un nervio periférico (Lundborg y col., 1996).

El papel del aislamiento que juegan las láminas de mielina es crucial para un correcto y eficiente funcionamiento del sistema nervioso, como se evidencia en enfermedades como el síndrome de Guillan-Barre y Charcot-Marie-Tooth, en el sistema nervioso periférico, en el sistema nervioso central se refleja como esclerosis múltiple; estas enfermedades son devastadoras, ya que se producen por pérdida de mielina.

La mielina juega el mismo papel tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central. Sin embargo, existe una multitud de diferencias importantes entre las láminas de mielina de estos dos sistemas, desde un nivel embriológico y celular hasta un nivel molecular (Garbay y col., 2000).

Las láminas de mielina son un complejo morfológico compuesto por membranas no compactadas y compactadas, cada membrana juega un papel importante en la integración de la función de las láminas de mielina. Este complejo estructural presenta un problema sustancial para la caracterización bioquímica de la mielina, ya que aún no existe un método que permita el aislamiento de las estructuras que componen a cada membrana, incluyendo estructuras subcelulares de la membrana como plasmalema, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, los cuales también se localizan en las células gliales y en otras células presentes en los nervios. Una excepción en este desierto de conocimientos, fue un método descrito por Norton y Poduslo en 1973, que llegaron a aislar una fracción altamente enriquecida con grandes fragmentos compactos de componentes de la membrana celular, denominándola "mielina aislada purificada o simplemente mielina". Es entonces cuando Mugnani (20 años atrás), es consciente de las propiedades relacionadas con la composición bioquímica de la mielina. Una de las mayores características bioquímicas que distinguen a la mielina de otras membranas biológicas, es su alta proporción lípido-proteína: la mielina aislada contiene de un 70-

80% de lípidos y un 20-30% de proteínas. Todas las grandes clases de lípidos (lípidos neutros, fosfogliceridos y esfingolípidos) y sus respectivas subclases encontradas en otras membranas, son también encontrados en la membrana mielinica. En especies mamíferas y no mamíferas, los lípidos forman el 72-78% de la materia seca de la mielina del sistema nervioso periférico y parece haber diferencias significativas entre la distribución cuantitativa de varias de las subclases de lípidos entre una especie y otra (Cuadro 1).

El colesterol forma parte del 20 al 30% del total de lípidos en el sistema nervioso periférico. En el nervio ciático de ratón y conejo, el colesterol se acumula continuamente a lo largo de un proceso denominado neo-mielogenesis y durante el período subsecuente de maduración de la mielina. Este patrón de acumulamiento por parte del colesterol, consiste en la estabilización y compactación de la membrana multilamelar de mielina. La esfingomielina se encuentra enriqueciendo a la mielina del sistema nervioso periférico, contribuyendo con el 10 al 35% del total de lípidos, más que la mielina del cerebro el cual cuenta únicamente con el 3 a 8% de los lípidos totales. Quizá la característica más sorprendente de la composición lípidica de la mielina, cuando es comparada con otras membranas biológicas, es su alto contenido en monogalactosilesfingolípidos, con cerebrósidos (Gal-C) y sulfátidos (SGal-C), contando con el 14-26% y 2-7% respectivamente, del total de la masa lípidica de la mielina del sistema nervioso periférico de adultos. El sistema nervioso periférico también contiene gangliósidos (esfingolípidos con oligosacáridos). En la mielina del nervio ciático de la rata, un 90% del total de gangliósidos son monosialogangliósidos, con sialosil-lactoneotetraosilamida (LM1) (60%) (Garbay y col., 2000; Garben y col., 1997).

Cuadro 1. Composición lipídica de la mielina del sistema nervioso periférico.

LÍPIDOS	BOVINO	HUMANO	CONEJO	RATA	RATON	POLLO
Colesterol ^a	24.7	23	27.2	27.2		20.5
Galactolípidos totales ^a	16.6	22.1	15.1	21.5		33.4
- Gal-C ^a	14.1			15.8		26.2
- SGal-C ^a	2.5			5.7		7.2
Fosfolípidos totales ^a	58.2	54.9	57.6	50.6		46.1
- Etanolamina PG ^b	28	35	39	38	52.8	39
*Colina PG ^b	21	15	16	19	11.7	12
-Serina PG + Inositol PG ^b	13	17	14	27	23.9	19
*Esfingomielina	27	34	31	17	11.5	31

^aExpresada como porcentaje del peso total de lípidos.

^bLos fosfolípidos son expresados como moles/100 moles del total de fosfolípidos. PG, fosfogliceridos, (Garbay y col., 2000)

Los componentes de ácidos grasos de la mielina también presentan una distribución distintiva cuando son comparados con los contenidos en las membranas de axones no mielinizados. El ácido oleico [C18:1] es el ácido graso de mayor contenido en la mielina del nervio ciático, comprendiendo del 30 al 40%. La composición de ácidos grasos parece ser similar en ratas y ratones.

Las proteínas del sistema nervioso periférico representan entre el 20 y 30% de la masa seca del total de mielina. Una de las características de las proteínas mielínicas, es que por lo menos un 60% son glicoproteínas. Las proteínas básicas se encuentran también enriqueciendo la membrana lipídica, donde representan el 20-30%, el 10-20% restante esta constituido por diversas proteínas (Garbay y col., 2000).

Durante el desarrollo temprano de un nervio, un manojito de axones desprovistos de mielina viene rodeado por un nivel simple de células de Schwann. El establecimiento de contacto entre estos, desencadena la proliferación de las células de Schwann. Los axones son segregados gradualmente conforme las células de Schwann proliferan.

Eventualmente se establece una relación 1:1 entre cada célula de Schwann un segmento axonal es aislado para ser mielinizado. Durante este tiempo, la Célula de Schwann experimenta un alargamiento lateral a lo largo del axón y secreta una lámina basal en la superficie abaxonal de la unidad axón/Célula de Schwann. La dependencia de la mielinización en el diámetro axonal fue descrito por Friede en 1972 por primera vez. Cada célula de Schwann tiene el potencial de formar una lámina de mielina, pero únicamente si entra en contacto con ciertos tipos de axones. Ciertamente, la mielinización ocurre únicamente si el diámetro del axón es mayor a $0.7 \mu\text{m}$. La pérdida de contacto axonal, como ocurre después de un daño al nervio, lleva a la baja de la expresión del gen mielinizante (Garbay y col., 2000). En cuanto a las fibras nerviosas mielínicas se dice que existe una relación entre el calibre del cilindro eje, el espesor de la vaina de mielina, la distancia entre los nodos de Ranvier y la velocidad de conducción del impulso nervioso.

Cuanto mayor es el calibre del axón, mayor es el espesor de la vaina de mielina, y más grande la distancia internodal. Por ello, cuando una fibra mielínica está creciendo, las distancias internodales aumentan progresivamente, se puede decir que en las fibras amielínicas se produce una propagación continua de la excitación, mientras que en las mielínicas la transmisión de los impulsos se realiza de forma saltatoria. Las bases morfológicas de este tipo de conducción se explican por la alternancia de segmentos cubiertos por mielina (internodos) y las zonas amielínicas (nodos de Ranvier) a lo largo del nervio. Este tipo de conducción es mucho más rápido y requiere menos energía que la propagación continua de la excitación (Lawrence y col., 1993).

Como mencionamos anteriormente, la vaina de mielina de un nervio periférico está rodeada por el protoplasma de una célula de Schwann, también está presente una membrana basal, ambas estructuras envuelven el internodo, aislando las fibras nerviosas entre sí. Las cisuras de Schmidt-Lanterman, aparecen en una sección longitudinal del nervio como desdoblamientos de las líneas principales de las envolturas laminares que contienen citoplasma. Su significado no es claro, pero pueden ser un artefacto o representar una deficiencia durante el ajuste en la formación de la mielina, o pueden simplemente representar una distensión de áreas de la vaina de mielina en la cual el citoplasma de la célula de Schwann queda en forma inadvertida por detrás, conforme la célula se enrolla alrededor del axón en el proceso de formación de la vaina de mielina (Afifi, 1999).

La resistencia mecánica de un nervio periférico depende de su contenido en fibras circulares elásticas. En los nervios de las extremidades, el perineuro actúa como un elemento de refuerzo adicional en las regiones articulares, el epineuro se dispone adyacente al perineuro y sus capas más internas forman estratos concéntricos, mientras que las capas más superficiales se continúan con tejido conectivo laxo que contiene grasa, vasos sanguíneos y linfáticos (Werner, 1988).

Anatomía del plexo lumbosacro y del nervio ciático de la rata.

El plexo lumbosacro conviene describirlo en dos partes, lumbar y sacro, aunque en ocasiones no encontremos claras líneas de demarcación entre ellos. A diferencia del plexo braquial, que presenta habitualmente pocas variaciones, el plexo lumbosacro varía considerablemente entre los distintos animales e incluso entre un mismo género. El plexo lumbosacro está formado por la unión de los ramos anteriores de los seis nervios lumbares y cinco sacros.

El plexo lumbar está formado por los primeros cuatro o cinco nervios lumbares y recibe a menudo fibras del 13° nervio torácico. Desde este plexo se configuran los nervios iliohipogástrico (T13-L1), ilioinguinal (L1-L2), furcalis (L4), obturador (L2-L3-L4) y femoral (L2-L3-L4). Los dos primeros nervios atraviesan el músculo psoas oblicuamente hasta su borde lateral para situarse entre el músculo cuadrado lumbar y el riñón o la pelvis respectivamente. El nervio obturador también atraviesa el músculo psoas en su porción inferior en la pelvis y acompaña la arteria hipogástrica. El nervio furcalis atraviesa el proceso transversal de la 5ª vértebra lumbar y su porción principal se une al plexo sacro. El nervio femoral aparece entre el músculo psoas menor y el músculo iliaco, atraviesa bajo el ligamento inguinal en compañía de los vasos iliacos externos y antes de entrar en el muslo del miembro trasero se divide en una porción anterior y otra dorsal. La porción anterior constituye los ramos musculares a los músculos pectíneo e iliaco. La porción posterior deja ramos de nervios musculares al cuádriceps femoral, mientras que el resto de fibras constituyen el nervio safeno (safeno largo) que atraviesa superficialmente hacia abajo la porción medial del muslo y pierna, acompañándose de la arteria safena y la vena safena larga.

El plexo sacro en la rata lo constituyen parte de L4 (*nervio furcalis*) y las raíces lumbares L5 y L6. Parte de sus fibras, mediante ramos comunicantes cortos, junto con el resto de nervios caudales, constituirán el plexo pudendo. El plexo sacro proporciona dos grupos de fibras de diferente distribución respecto a su origen, pero se consolida en la pelvis como un tronco único o nervio ciático. Este nervio es divisible bajo disección de dos componentes principales terminales, los nervios tibial y común peroneal. El nervio ciático en la pelvis menor está separado del nervio pudendo por la arteria glútea superior. Conjuntamente profundizan hasta el borde dorsal del isquión y de la raíz de la

cola. El nervio ciático entra al muslo a través de la porción caudal de la hendidura ciática, recorriéndolo hasta el hueco poplíteo, donde se divide en ramas terminales.

Desde el punto de vista de constitución anatómica se pueden considerar dos grupos de fibras diferentes según su origen y que dan lugar a nervios diferentes:

- De la porción anterior o ventral del plexo sacro, parte una serie de ramos terminales: nervio tibial, ramos musculares (a músculos de la corva, cuadrado femoral, gemelos y obturador interno) y ramo articular a la cadera. De ellos, el nervio tibial (o poplíteo interno) es el de mayor interés quirúrgico. Se encuentra en su inicio cubierto por una envoltura común con el nervio común peroneal, pero bajo disección microquirúrgica pueden ser aislados proximalmente hasta su origen en el plexo. Anatómicamente, ambos de forma conjunta atraviesan el muslo, cruzan el músculo obturador externo, cuadrado femoral y abductor mayor estando cubiertos en su trayecto por el bíceps femoral hasta la fosa poplíteo, el nervio tibial la atraviesa oblicuamente para descender a la pierna y atravesar la superficie medial de los vasos musculares superiores e introducirse entre las dos porciones del nervio gastrocnemius donde aporta ramos musculares, sus últimos ramos descienden hasta la porción plantar de la pata del animal.

- De la porción posterior o dorsal del plexo sacro parten los siguientes nervios: el nervio común peroneal, ramos musculares (a la porción anterior del músculo bíceps, piriforme, glúteo superior y glúteo inferiores) y ramos articulares a la rodilla. El nervio común peroneal tienen un primer trayecto común al nervio tibial. A nivel del trocánter mayor da un ramo interno o nervio sural que accede a la piel de la cara interna del miembro trasero. El resto del nervio peroneal común atraviesa la fosa poplíteo se coloca lateral a la arteria poplíteo y entra en la porción inferior del miembro trasero, entre el

bíceps femoral y la porción lateral superior del gastrocnemius. A diferencia del nervio tibial, estos nervios son fundamentalmente sensitivos y la porción distal del nervio común perineal bajo la rodilla sólo aporta algunos ramos musculares en sus dos ramos terminales (nervio peroneal superficial o músculocutáneo y nervio peroneal profundo) (González, 1992).

Morfometría del nervio ciático de la rata.

El nervio ciático, que se origina en el plexo lumbosacro y se extiende en el músculo caudal profundo, está localizado hacia la parte lateral del fémur. El bíceps femoral es un músculo lateral en relación al nervio ciático. Este músculo corre por el área perineal frente a la tibia y distalmente al final del fémur (Figura 3 y 4) (González, 1992; Krinke, 2000).

El nervio ciático (*nervus ischiadicus*) es frecuentemente tomado como modelo para un examen de tejido periférico en la rata, porque es el nervio más grande que contiene las fibras nerviosas más largas. Las fibras sensoriales del nervio ciático de la rata se originan en la región dorsal de las raíces ganglionares de la L3 a la L6, pero la L4 y la L5 son las más importantes y contribuyen cerca de un 98% a un 99% de todas las fibras sensoriales (González, 1992).

Dado que el nervio ciático de la rata es el sustrato experimental de gran cantidad de estudios experimentales, conviene conocer los datos elementales referentes a la distribución de las fibras de acuerdo a su tipo. Siendo calculados a partir de estudios histológicos convencionales y con microscopía electrónica con animales normales, sometidos a sección de sus raíces anteriores de L4, L5, L6 y con la simpatectomía lumbar bilateral desde L2 a S2. El nervio ciático contiene 7,800 fibras mielínicas, de las que 4,500 pertenecen al nervio tibial, 1,900 al peroneal, 1,050 al sural y 350 a la rama

cutánea. Las fibras eferentes mielinizadas, es decir motoras, son 1,600 mientras que las aferentes sensitivas constituyen las 6,200 restantes. Del total de las fibras motoras 1,000 circulan por el nervio tibial y las 600 restantes por el peroneal. El total de las fibras amielínicas es de unas 19,000; de las cuales 6,000 corresponden a las fibras simpáticas y las 13,000 restantes son aferentes sensitivas, lógicamente existen variaciones individuales con un margen entre 10% y 20% (González, 1992).

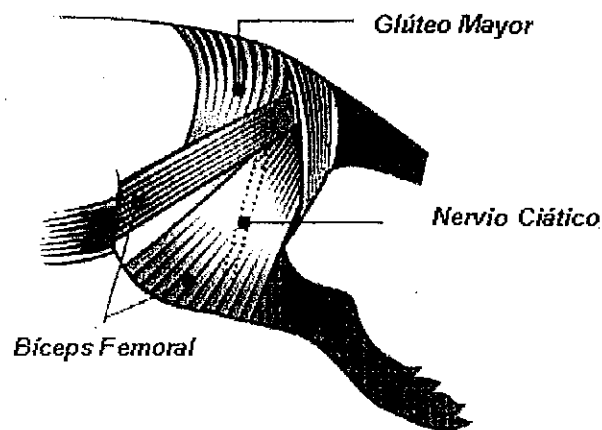


Figura 3. Localización del nervio ciático en la rata, entre el bíceps femoral, vista dorsolateral del miembro posterior (Krinke, 2000).

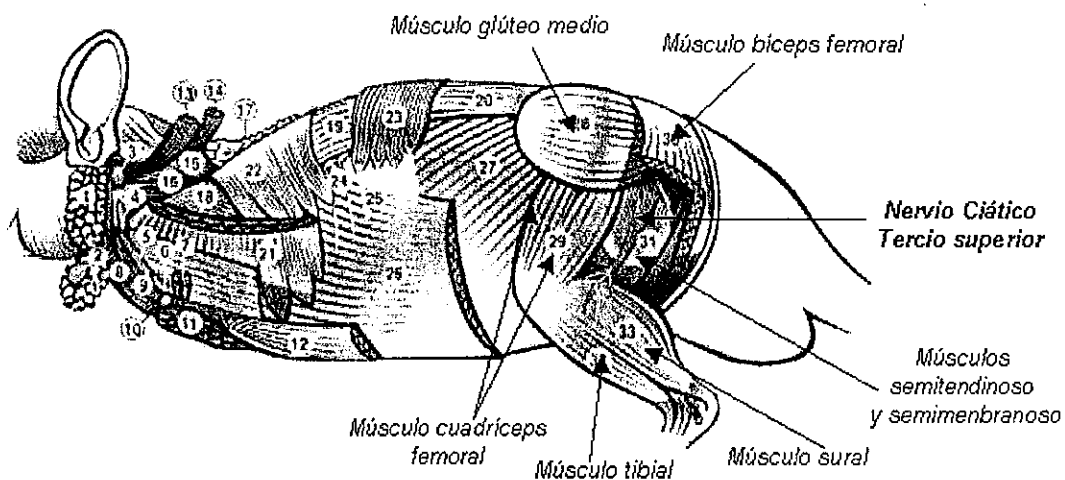


Figura 4. Origen y estructura del nervio ciático en la rata (Krinke, 2000).

Degeneración de nervios periféricos.

Los daños a los nervios periféricos se han reconocido durante siglos, mientras que la degeneración del axón en el miembro distal después de transección de las fibras nerviosas, fue descrito en el siglo pasado.

En la degeneración de nervios periféricos las células de Schwann se deprimen, pero los axones continúan vivos. Crecen con procesos muy delgados que se conectan con otros para formar una columna de células llamadas columnas de células de Schwann o bandas de Bünger. También se ha encontrado que la lámina basal de las células de Schwann continúan casi sin afectarse durante el proceso de degeneración Walleriana (De Castro y col., 2001).

En la mayoría de los casos la transección completa puede ocurrir. Esto causa interrupción de la microvascularización y efectos adversos que afectan la recuperación funcional del nervio (Dijkstra y col., 2000) . Después de la sección de un nervio, la primera respuesta sucede en el extremo distal de las fibras nerviosas, este fenómeno se conoce como degeneración anterógrada (degeneración Walleriana) (Chaudhry y col., 1992; Dumitru, 1994); luego se manifiesta en las fibras proximales de la lesión, fenómeno conocido como degeneración retrógrada (Chaudhry y col., 1992; Dumitru, 1994); en el soma celular suceden cambios degenerativos progresivos hasta la muerte neuronal (Dumitru, 1994; Ganong, 1997).

A pesar de los recientes avances en las técnicas microquirúrgicas y en el entendimiento de la regeneración nerviosa la recuperación funcional seguida de la sección del nervio periférico continua siendo pobres. Los resultados clínicos de la reparación de nervios periféricos continúan en desacuerdo ya que se presenta pérdida de la función muscular deterioro de la sensación y neuropatías del dolor. Los resultados

funcionales son pobres después de la reparación de nervios periféricos lo que ha motivado ha entender mejor los eventos moleculares y celulares ligados a la regeneración nerviosa (Varejão y col., 2001).

Puede ocurrir además degeneración neuronal retrógrada conocida como reacción axonal, degeneración axonal, degeneración retrógrada y cromatolisis central. El tipo de respuesta depende de la severidad de la lesión (Martin y col., 1999; Wang-Bennett y col., 1990), el soma celular puede recuperarse del daño o degenerarse (cromatolisis), en este caso sucede edematización de los cuerpos de Nissl (retículo endoplásmico granular) seguida de hinchamiento del soma neuronal, marginación de la heterocromatina y organelos membranosos así como excentricidad nuclear y nucleolar. En este estadio, la célula puede recuperarse (cromatosíntesis) (Jones, 1993 a y b; Kujawa y col., 1989;), ó continuar con la cromatolisis, hasta completar los cambios degenerativos: estallamiento de membrana plasmática, expulsión de organelos, retracción y condensación de fragmentos de membranas (Dumitru, 1994).

Degeneración Walleriana.

El papel de los macrófagos en los nervios periféricos dañados y su reparación, es una cuestión central en la corriente neural dedicada a la investigación de regeneración de nervios periféricos. Los macrófagos hematógenos son los responsables de remover los restos de mielina durante la degeneración Walleriana; y el grado de degradación de mielina se relaciona cercanamente con el grado de invasión de macrófagos (Bonnekoh y col., 1989; Müller y col., 1998).

En 1850 Waller describió la reacción neural en respuesta a lesión, fenómeno conocido como degeneración Walleriana (Chaudhry y col., 1992; Dumitru 1994). Los cambios inician con la desintegración de los componentes estructurales del

citoesqueleto axonal (Bajrovic y col., 1994; Chaudhry y col., 1992; Dumitru 1994), al interrumpirse el aporte de información y nutrientes desde el soma neuronal se produce pérdida del axoplasma y desintegración de organelos, con fragmentación de membranas, hasta quedar una vaina de mielina con residuos del axón (figura 5) (Chaudhry y col., 1992).

La velocidad de desintegración del citoesqueleto axonal difiere en cada especie (Miledi y col., 1970; Pellegrino y col 1986; Perry y col., 1990); en roedores puede ocurrir desde las primeras 24 hrs (Miledi y col; 1970), mientras que en humanos y gatos el axoplasma permanece intacto por varios días (Pellegrino y col., 1986; Stoll y col., 1989). El tamaño de la fibra nerviosa, edad y temperatura son los factores principales que influyen sobre el tiempo en que sucede la desintegración axonal (Chaudhry y col., 1992; Dumitru 1994); continúa la degeneración de la vaina de mielina, se reduce la síntesis de lípidos (Dumitru 1994; White y col., 1989) y el contenido del mRNA en las células de Schwann (Trapp y col., 1988), hasta producirse fragmentación de la vaina de mielina (Chaudhry y col., 1992). Al final de la tercera semana poslesión, en roedores y gatos gran parte de la mielina ha sido removida; los detritus restantes acumulados en el tercio distal condicionan la presencia de células de Schwann, éstas células forman la llamada banda longitudinal de *Büngner*, su presencia es indicativa de regeneración axonal favorable (Spencer y col., 1979). Posteriormente sucede la respuesta de macrófagos (Bonnekoh y col., 1989). Se sabe muy poco acerca del papel que desempeñan los macrófagos en la proliferación de las células de Schwann.

En situaciones normales, en los nervios periféricos están presentes macrófagos a lo largo de la lámina basal de vasos endoneurales, en respuesta a lesión migran específicamente hacia las fibras degeneradas, allí realizan funciones fagocíticas

(macrófagos adherentes) (Figura 5) (Dumitru 1994; Kubota y col., 2000; Stoll y col., 1989). Pueden encontrarse macrófagos desde las primeras 24 horas posteriores a la lesión nerviosa y su número aumenta progresivamente durante los primeros días poslesión. En roedores, la remoción de detritus de mielina sucede en el transcurso de un mes, mientras que en humanos puede tardar hasta 7 meses (Chaudhry y col., 1992). La infiltración de macrófagos tiene importancia neurobiológica por la producción de las citocinas; como interleucina-1 (IL-1) entre las principales, al parecer está implicada en la producción de NGF por células de Schwann denervadas (Lindholm y col., 1987).

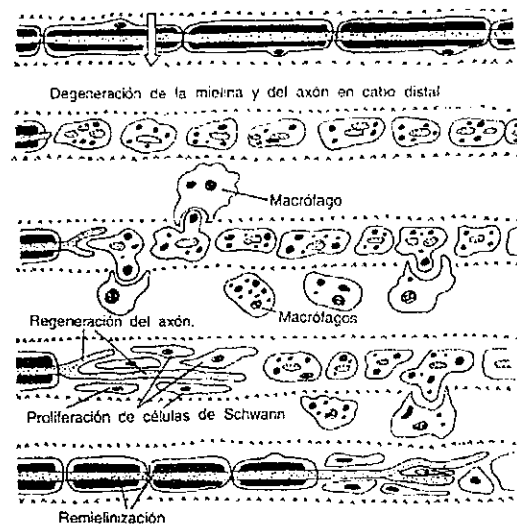


Figura 5. Degeneración Walleriana. Cuando se interrumpe una fibra nerviosa, el cabo proximal puede regenerar, el cabo distal sufre una degeneración walleriana y termina por desintegrarse (Danielsen, 1996).

La capacidad para regenerar de los nervios periféricos contrasta con la inhabilidad para regenerar del sistema nervioso central, su contraparte. Esta habilidad regenerativa del sistema nervioso periférico para regenerar ha sido atribuida al

microambiente que proveen las células de Schwann del muñón nervioso distal. A pesar de la capacidad regenerativa, la recuperación funcional después de daño a un nervio periférico es aún decepcionante, incluso después de aplicar inmediatamente la microcirugía para reparar el nervio. La experiencia clínica ha establecido que la recuperación funcional es particularmente pobre para daños en nervios grandes, como los que nacen del plexo lumbar, ya que necesitan recorrer grandes distancias para restablecer sus conexiones. En estos casos, los axones en regeneración deben atravesar grandes distancias para reinervar de nuevo sus células diana, las cuales han sido denervadas por el daño. El ritmo lento de regeneración, 1-3 mm/día, puede traducirse a meses, o incluso años. La concepción general es que los axones regenerados eventualmente regeneran a sus células diana, pero puede presentarse la inhabilidad de que estas células rechacen la reinervación de los axones (Sulaiman y col., 2000).

A inicios del siglo XX se propuso que; "sustancias humorales" originadas de la lesión tenían efectos sobre la regeneración axonal del sistema nervioso periférico (Forssman 1989, 1990; Ramón y Cajal 1928), durante los últimos 30 años, ha persistido la hipótesis que complejos humorales, celulares y factores extracelulares están relacionados con el crecimiento axonal (Baley y col., 1993), para demostrarlo se han desarrollado distintos modelos experimentales; de ellos, el uso de tubo de silicona entre dos segmentos nerviosos seccionados ha permitido conocer la secuencia de eventos durante el proceso de regeneración nerviosa (Hall, 1997; Lundborg y col., 1994; Varon, 1993; Weiss, 1944; Williams y col., 1987).

Las primeras respuestas celulares están encaminadas a incrementar la supervivencia neuronal, mediante participación de factores tróficos producidos por

células de Schwann y neuronas, después de la lesión (Barakat, 1998; Hall, 1997; Ide, 1998; Salonen y col., 1987; Weinstein, 1999); así como la formación de una matriz extracelular incipiente compuesta por laminina, colágena tipo IV, fibronectina, moléculas de adhesión celular y neural (CAM, N-CAM, LI y N-cadherina), implicadas en la unión celular axon-axon y axon-célula de Schwann (Ide, 1996; Spector y col., 1993).

También sucede incremento de componentes celulares que promueven la elongación de neuritas y remielinización por células de Schwann y fibroblastos perineurales (Barakat, 1999; Danielsen, 1996; Melcangi y col., 2000; Spector y col., 1991b, 1992, 1993; Weinstein, 1999; Williams, 1987). Las integrinas $\alpha 1-\beta$ y $\alpha 6-\beta 1$, la proteína quinasa C y la proteína de crecimiento axónico (GAP-43) intervienen en la adhesión al sustrato y crecimiento axónico, respectivamente (Ide, 1996; Salonen 1987); a su vez, la tirosina quinasa, la cual es generada en neuronas y células de Schwann, principalmente, está implicada en las señales para que suceda producción intracelular de factores tróficos y moléculas adhesivas que faciliten la reorganización de axones (Barakat, 1999; Ide, 1996).

Por otra parte, la regeneración nerviosa depende del tipo de lesión; en lesiones por aplastamiento (axonotmesis) resulta una mayor proporción de regeneración exitosa, debido que se preserva la continuidad de la vaina endoneural, así como la vasculatura y citoarquitectura completa en el muñón distal, a través del cual los axones se regeneran (Brigde y col., 1994; Mackinnon y col., 1984). El daño más frecuente resulta en la desconexión de los muñones proximales y distales, lo cual puede dar como resultado el incremento de la retracción de los muñones con el tiempo (Maquet y col., 2000). Por lo contrario, secciones completas del nervio con pérdida de un segmento

provocan destrucción total de la vasculatura y vaina endoneural (desconexión de los elementos pre y post sinápticos), esto dificulta la regeneración axonal al interrumpirse el soporte trófico; por lo que sucede degeneración del muñón distal (Salonen y col., 1987; Spector y col., 1993; Varon, 1993), acompañada de atrofia y desaparición de las columnas de células de Schwann.

La regeneración del nervio periférico comprende la formación de brotes axónicos, proyección del axón regenerado y finalmente la reinervación al tejido diana –formación de placa terminal (Ganong, 1997; Hall, 1997; Ide, 1996; Spector y col., 1992). Se desconocen los factores que controlan la regeneración de nervios periféricos (Barakat, 1999). Estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado la importante participación de moléculas de matriz extracelular sobre el crecimiento de neuritas (Davis y col., 1985; Salonen y col., 1987), así la menor capacidad regenerativa del SNC depende de la composición y localización de la matriz extracelular. En el SNP la membrana basal y colágena son abundantes y escasas en el SNC (Salonen y col., 1987; Sanes y col., 1985). La matriz extracelular (compuesta por laminina, colágena tipo IV, fibronectina y moléculas adhesivas neurales) (Bajrovic y col., 1994; Barakat, 1999; Spector y col., 1993) actúa como guía de axones y células de Schwann durante la regeneración, y participa en la diferenciación y morfogénesis de células y tejidos (Figura 6) (Chen y col., 1989; Ide, 1987; Salonen y col., 1987).

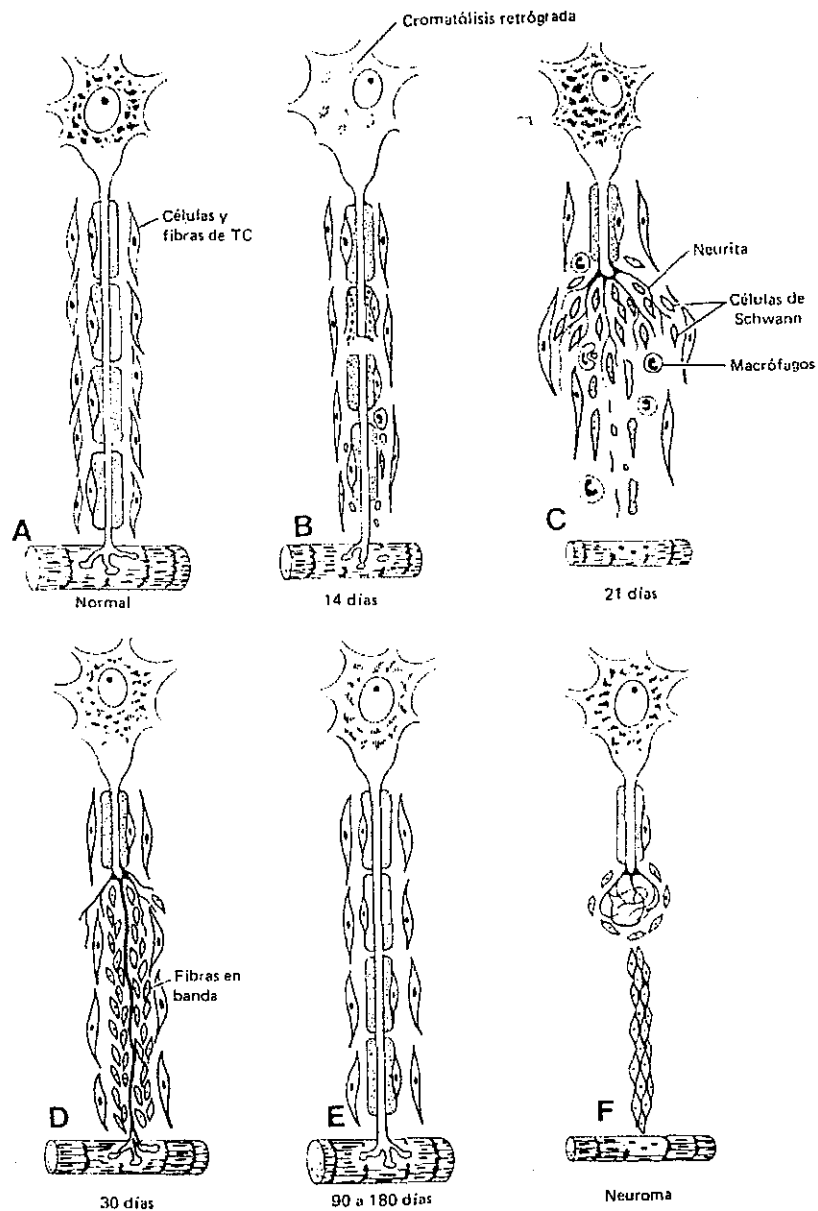


Figura 6. Diagrama que demuestra la degeneración y regeneración de la fibra nerviosa. **A**, relaciones neuromusculares normales con el tamaño muscular normal. **B**, degeneración primaria con atrofia muscular. **C**, macrófagos y células de Schwann reactivas y neuritas que han empezado a crecer. Puede apreciarse la degeneración distal. La atrofia muscular está en avance. **D**, bandas de fibras que forman un marco tubular por las neuritas. **E**, reestablecimiento de la inervación. Masa muscular regenerada. **F**, formación de un neuroma en el segmento proximal (Banks, 1986).

En aquellas lesiones nerviosas en las que se tubulizó el nervio seccionado, el primer evento necesario para la regeneración nerviosa es la formación de una matriz acelular fibrinoide entre ambos segmentos, ésta actúa como puente para el crecimiento axonal, permite la migración de células no neuronales y el crecimiento axonal (Baley col., 1993; Salonen y col., 1987; Varon, 1993); más tarde aparece la fibronectina (FB) y laminina (LMN); son glucoproteínas presentes en lámina basal, con efectos importantes sobre el crecimiento axonal (Baley y col., 1993). Experimentos *in vitro* revelaron la participación de colágena tipo I y IV, fibronectina y laminina en la adhesión de neuritas al substrato (Davis y col., 1985), asimismo, mediante cultivos de células nerviosas, de Schwann y fibroblastos, se ha evidenciado la importancia de una membrana basal para lograr la regeneración axonal exitosa (Bunge y col., 1982). El componente más importante es la laminina, presente en todas las membranas basales, estructura esencial para que suceda regeneración axonal (Hall, 1996; Salonen y col., 1987), por esta razón se produce una regeneración más rápida en lesiones por aplastamiento, en comparación con la sección nerviosa completa (Ide, 1983; Salonen y col., 1987; Varon, 1993).

Los efectos sinérgicos de todos los componentes de la matriz extracelular aceleran el crecimiento de neuritas, promueven la migración de células de Schwann (Millaruelo y col., 1988; Weinstein 1999), facilitan la respuesta regenerativa y supervivencia neuronal (Baley y col., 1993; Salonen y col., 1987).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) producido por células no neuronales (Bates y col., 1991; Spector y col., 1993) es transportado retrógradamente hacia el soma celular y se une a receptores de alta afinidad (Levi-Montalcine y col., 1982), Durante el proceso regenerativo se incrementan los niveles de NGF, NGF-mRNA,

receptores NGF y NGF-receptor-mRNA (Baley col., 1993; Heumann y col., 1987); estos últimos influyen favorablemente sobre las células de Schwann y el cono de crecimiento axonal, -indicativo de regeneración nerviosa, al estimular la producción de factores tróficos (Chen y col., 1995; Weinstein, 1999). El NGF mantiene su actividad durante 6 hrs, posiblemente actúa directamente sobre las células de Schwann, facilitando la regeneración y mielinización (Rich y col., 1987), el NGF es necesario para el desarrollo y supervivencia de neuronas colinérgicas, sensitivas y simpáticas (He y col., 1992; Spector y col., 1993). También se han realizado estudios con otros compuestos neurotróficos, con el propósito de facilitar la regeneración nerviosa y acelerar la mielinización, entre ellos; NGF, BDNF, T3 (Barakat, 1999; He y col., 1992; Spector y col., 1993).

Una vez que se ha iniciado la organización de la matriz extracelular y que se ha formado una red de fibroblastos, las células de Schwann migran a lo largo de los puentes de tejido fibroblástico (Guénard y col., 1992; Madison y col., 1994; Salonen y col., 1987; Weinstein, 1999; Williams y col., 1993) y se forman rebrotes axónicos conocidos como neurofibrillas (Dumitru, 1994), ellos penetran dentro del área dañada, algunos se reabsorben y otros persisten para llegar a formar un axón dominante (cono de crecimiento axónico), las terminales axónicas continúan creciendo y emiten colaterales (neuritas) que, mediante movimientos ameboides se conectan en el área lesionada (Dumitru, 1994), en mamíferos, las neuritas crecen a una velocidad que va desde 1.0 hasta 3.0 mm/día (Dumitru, 1994; Ganong, 1997; Varon, 1993).

Cuando el axón finalmente alcanza el extremo distal del tubo endoneural, las células de Schwann se alinean, empiezan a enrollarse y forman una estructura membranal multilaminar, precursora de la vaina de mielina (Dumitru, 1994; Smith,

1964) en humanos, esto sucede dentro de los primeros 9-20 días, así; el axón incrementa su diámetro en una dirección de proximal a distal en un promedio de 4 mm/día (Dumitru, 1994; Kable y col., 1988). Posteriormente se separan las células de Schwann, forman los nodos de Ranvier y la región internodal, donde se localizan sus núcleos (Dumitru, 1994; Ganong, 1997).

En humanos la maduración completa de la vaina de mielina puede tardar hasta un año (Dumitru, 1994; Navarro y col., 1994), después de una lesión, la recuperación funcional del nervio depende de la capacidad de regeneración de los axones lesionados y la reinervación del órgano diana denervado (Navarro y col., 1994). Las funciones nerviosas autónomas, sensitivas y motoras no pueden alcanzar una regeneración total en adultos (Ganong, 1997; Lundborg y col., 1994, 2000; Navarro y col., 1994), alrededor de 1-7 fibras nerviosas pueden terminar en el órgano diana (Dumitru, 1994), de ellas las primeras en regenerarse son las nociceptivas, los axones de menor diámetro tienen mayor capacidad de reinervar áreas grandes, en comparación con axones de mayor calibre y mielinizados (Ganong, 1997; Navarro y col., 1994).

Distintos factores pueden influir en los resultados de la regeneración nerviosa; especie animal, sexo, edad, localización del daño, el tipo de lesión (aplastamiento, sección), tiempo de reparación y la técnica quirúrgica utilizada (Medinaceli y col., 1983), entre los principales. La reparación de nervios periféricos con autoinjertos presenta varios defectos como el inadecuado retorno de la función y regeneración aberrante (Hadlock y col., 1998). Se ha encontrado que en ratas que son sometidas a correr como parte de una ejercitación y entrenamiento después de sufrir daño en el nervio ciático, presentan un retardo en la recuperación sensorial y motora como consecuencia del estrés a que son sometidas (van Meeteren y col., 1998). Cuando el nervio periférico es

dañado, un neuroma comienza a desarrollarse en el muñón distal. Los neuromas distales son la fuente de vías sensoriales. En algunos humanos estas vías pueden causar dolor neuropático espontáneo. La transección de los nervios ciático y safeno en la rata puede producir también neuromas en el muñón distal. Las fibras aferentes en las cuales los neuromas emiten espontáneamente vías ectópicas coinciden al mismo tiempo con la aparición de lamido continuo, rascado y automutilación del miembro denervado (autotomía). Esta conducta es considerada como la expresión espontánea de sensaciones desagradables como parestesia, disestesias o dolor neuropático (Zeltser y col., 2000).

Técnicas quirúrgicas para reparar nervios.

La evolución de las técnicas quirúrgicas en la reparación nerviosa ha pasado a través de varias etapas. Desde hace 1800, años se han realizado esfuerzos para lograr la reparación de nervios seccionados, a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas las lesiones de nervios periféricos continúan generando problemas clínicos, económicos y sociales (Hurtado y col., 1987; Lundborg y col., 2000; Terris y col., 1993). Fue Galeno en el año 200 DC., el primer médico que discutió la posibilidad de la regeneración nerviosa (Terris y col., 1993); más tarde, en el año 600 DC., Paul de Argina, realizó la primera reparación nerviosa mediante suturas; técnica quirúrgica conocida hoy como neurorrafia, - aproximación de los segmentos del nervio lesionado mediante sutura.

El siguiente fue Waller que en 1850 introduce estudios sobre regeneración y degeneración de nervios periféricos. Posteriormente Seddon en 1947 introdujo los injertos nerviosos, técnica quirúrgica que se realiza con la implantación de aloinjertos y autoinjertos nerviosos debido a pérdida de segmento nervioso, cuya reparación no es posible mediante neurorrafia (Seddon, 1994). Highet y Sanders propusieron técnicas de

elongación para eliminar la tensión en la reparación de nervios y posteriormente se iniciaron los injertos nerviosos vascularizados. Con la introducción de la microcirugía se mejoraron las técnicas quirúrgicas (Smith, 1964) así; Langley y Hashimoto introdujeron la reparación fascicular y perineural con sutura (Terris y col., 1993), aunque fue Millesi en 1972 quien reportó por primera vez la reparación interfascicular.

Otros avances en la reparación de nervios periféricos, en sustitución al implante de aloinjertos y autoinjertos, ha sido la tubulización introducida por Weiss en 1944 (Brian, 1991; Terris y col., 1993), que se basa en la utilización de una cámara para el crecimiento axónico, son estructuras cilíndricas en las cuales se introducen los extremos de un nervio seccionado para promover su reparación.

En forma paralela se han introducido avances en materiales de sutura, ordinariamente se utilizan filamentos de sutura de nylon 9-0 y 10-0 para la reparación de nervios (Edshage y col., 1968); sin embargo, recientemente se han propuesto nuevos productos y procesos quirúrgicos que ofrecen mayor fuerza mecánica, mejoran los resultados funcionales y requieren menor habilidad técnica; entre ellos están el adhesivo de fibrina y el uso de láser, este último permite reparar nervios muy pequeños en áreas de difícil acceso, causando así menos daño quirúrgico y mejor cicatrización que la resultante de suturas (Brian, 1991; Terris y col., 1993).

Por otra parte, las técnicas quirúrgicas y los factores mecánicos que determinan el éxito de la reparación nerviosa están bien identificados, se ha centrado la atención de las investigaciones en mejorar la regeneración nerviosa utilizando factores neurotróficos que promuevan el crecimiento nervioso (Bates y col., 1991; Chen y col., 1989; Lawrence 1993; Müller y col., 1987; Sjöbeerg y col., 1990; Spector y col., 1993; Varon 1993), estas sustancias principalmente han demostrado su eficacia *in vitro* y han sido

poco estudiados *in vivo*, algunos actúan además como neuritogénicos; entre los principales destacan por sus efectos, el factor de crecimiento neural (NGF) (Brian, 1991; Lipton y col., 1989;), influye favorablemente sobre la regeneración neural (Snider y col., 1998), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), (Esch y col., 1985) y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I), (Sjöbeerg y col., 1990).

Diversos autores han reportado la importante participación del sistema endocrino en la reparación neural, se ha demostrado que sustancias como ACTH, T3, T4 y testosterona (Barakat, 1999; Jones, 1993 a y b, Terris y col., 1993; 1997) incrementan la regeneración nerviosa. Por otra parte, actualmente se realizan experimentos sobre los posibles efectos benéficos de esteroides neuroactivos sobre la regeneración del tejido nervioso lesionado, estos compuestos fueron recientemente descritos y son conocidos como neuroesteroides (Baulieu, 1981, 1990, 1991, 1997, 2000; Desarnaud, 1998; Rupprecht, 1999); debido a que sintetizan en el tejido nervioso, independientemente de la actividad esteroideogénica glandular periférica, entre los principales se encuentran las moléculas progenitoras: pregnenolona (Kabbadj y col., 1993), progesterona, (Jung-Testas, 1989, 1994; Koenig, 1995) y dehidroepiandrosterona (Akwa y col., 1993 a y b), todos ellos han producido efectos benéficos en la regeneración nerviosa del nervio facial y ciático de roedores (Baulieu, 1997; Chávez-Delgado y col., 1997; Desarnaud, 1998; Gómez, 1998; Gómez-Pinedo y col., 1998; Rupprecht, 1999).

Diagnostico de las lesiones de los nervios periféricos.

La sección de un nervio motor condiciona la pérdida del tono muscular así como la imposibilidad para la contracción voluntaria por debajo del nivel lesional. En la práctica clínica se acepta el método descrito por Daniels y col., (Ayala, 1997), (Cuadro

2) para valorar la potencia muscular en el que diferencia 6 grados de potencia muscular. Hay que tener en cuenta la posible aparición de movimientos falsos producidos por la utilización de músculos auxiliares, además de las posibles anomalías de inervación y la asociación a lesiones de las estructuras tendinosas, musculares u óseas, que alteran el patrón normal de movimiento.

Cuadro 2. Escala de potencia muscular (Ayala, 1997).

0	Parálisis total
1	Contracción sin desplazamiento
2	Movilidad activa (sin la influencia de la gravedad).
3	Movilidad activa y en contra de la gravedad.
4	Movilidad activa en contra de la gravedad y ligera resistencia.
5	Fuerza muscular normal.

Si se afecta un nervio sensitivo se produce déficit de la sensibilidad en una zona cutánea determinada. Las manifestaciones dolorosas en la zona de inervación son más frecuentes en las secciones parciales y en caso de sección completa rara vez duran más de tres semanas. De todos los tipos de sensibilidad: táctil, térmica, dolorosa y profunda, la exploración de la sensibilidad táctil y dolorosa son las más útiles en la práctica clínica. Si un nervio es seccionado se origina normalmente una recuperación de la sensibilidad parcial a consecuencia de la superposición de dermatomas (un dermatoma es un área de la piel la cual esta inervada por un nervio espinal). Esta superposición no sobrepasa, sin embargo, la zona de inervación denominada autónoma

aunque, al igual que para la motilidad, pueden existir variaciones en la zona de inervación cutánea.

Las fibras sensitivas y simpáticas se hallan íntimamente entremezcladas, y tienen una misma distribución periférica, por ello la zona cutánea sensitiva y simpática son superpuestas. La alteración simpática vegetativa va a producir lesiones vasomotoras, sudorales y del reflejo pilomotor, que van a manifestarse por cambios en la temperatura, color de la piel, textura, tejido celular subcutáneo y faneras (Ayala, 1997).

Clasificación de Seddon para las lesiones a los nervios periféricos.

Es clásica y universalmente aceptada la clasificación que introdujo Seddon en 1943, en la que establece tres grados de lesión de un tronco nervioso, tratando de simplificar la gran variedad de lesiones existentes y dando a la vez una visión de las posibilidades de regeneración que pueden obtenerse de manera espontánea y marcando por lo tanto una pauta de actuación tras una lesión nerviosa (Seddon, 1994).

Estos tres tipos de lesión se hallan en estado puro muy pocas veces, como el propio Seddon reconoce, siendo lo más frecuente la existencia de combinaciones entre ellas en la misma zona lesionada. Por todo ello, Sunderland (Seddon, 1994; Sunderland, 1990) estableció otra clasificación que engloba las variantes más frecuentes en cinco grupos (Cuadro 3):

1. Neuropraxia o lesión de primer grado.

Término que expresa una interrupción de la conducción motora por fragmentación segmentaria de la mielina, con integridad de los axones y de las cubiertas conjuntivas. Suele deberse generalmente a compresiones de corta duración o a isquemias transitorias.

Clínicamente se produce una alteración motora y una mínima o nula repercusión sobre las fibras sensitivas y simpático vegetativas que evolucionará hacia el retorno a la normalidad absoluta de forma espontánea en días, semanas o pocos meses, siguiendo un patrón anárquico. Este tipo de lesiones requiere exclusivamente tratamiento conservador.

Cuadro 3. Clasificación anatomoclínica de las lesiones de los nervios periféricos (Seddon, 1994).

	Déficit Motor	Déficit Sensitivo	Déficit Vegetativo	EMG*	Anatomía Patológica	Evolución	Tratamiento
Neuroapraxia	Total	Mínimo o Nulo	Mínimo o Nulo	Persiste conducción distal. No actividad voluntaria.	Desmielinización selectiva. No atrofia muscular.	Restitución completa.	Abstención.
Axonotmesis	Total	Total	Total	Interrupción de la conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria.	Degeneración Walleriana del axón. Atrofia muscular progresiva.	Restitución completa (1-3 mm/día) según patrón de regeneración.	Fisioterapia.
3° Grado de Sunderland	Total	Total	Total	Interrupción de la conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria.	Desmielinización. Interrupción del axón. Degeneración Walleriana del axón, fibrosis intrafascicular.	Regeneración lenta e imperfecta.	Fisioterapia.
4° Grado de Sunderland	Total	Total	Total	Interrupción de la conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria.	Desmielinización. Interrupción del axón, degeneración Walleriana del axón, rotura del perineuro, Fibrosis intra y perineural.	Regeneración espontánea incompleta.	Quirúrgico.
Neurotmesis	Total	Total	Total	Interrupción de la conducción. Fibrilación en reposo. No actividad voluntaria.	Sección total del nervio: desmielinización, interrupción del axón, interrupción de estructuras conectivas, atrofia muscular.	No restitución espontánea.	Quirúrgico.

* Electromiograma.

2. Axonotmesis o lesiones de segundo grado.

Este grupo integra aquellas lesiones que cursan una interrupción del axón y de la vaina de mielina que lo recubre, quedando indemnes los tejidos conjuntivos endo, peri y epineurales, la fuerza actuante no es suficiente para originar una sección completa nerviosa.

Clínicamente existe una pérdida completa de todas las funciones con atrofia de los músculos denervados. El tiempo de recuperación viene condicionado por el nivel de la lesión. La recuperación de este tipo de lesión es siempre completa necesitando solamente como tratamiento la ayuda de una buena fisioterapia que evite la atrofia de la musculatura de la zona correspondiente y la aparición de alteraciones fibrosas irreversibles.

3. Lesiones de tercer grado.

Esta lesión es un grado superior en donde además de la lesión miélnica de la fibra nerviosa se produce una desorganización del tejido conjuntivo endoneural estando conservado el perineuro y epineuro.

La evolución, aunque tiende a la regeneración espontánea, se realiza de forma lenta e imperfecta debido a la fibrosis endoneural que obstaculiza la regeneración axonal, retrasándola, bloqueándola o desviando los axones a otros tubos endoneurales diferentes a los que primitivamente pertenecían. El tratamiento es semejante al de las lesiones de segundo grado.

4. Lesiones de cuarto grado.

Se deben a una mayor agresividad del agente que lesiona el nervio, originando una destrucción casi completa del nervio conservando solamente el epineuro.

La regeneración depende de que los axones regenerantes puedan encontrar los tubos endoneurales distales correspondientes a través de la fibrosis. Por lo tanto, puede existir un cierto grado de regeneración espontánea, aunque esta es siempre incompleta y raramente llega a un grado útil. Por lo tanto, el tratamiento adecuado en este caso es quirúrgico.

5. Neurotmesis o lesiones de quinto grado.

La neurotmesis constituye el último grado de la clasificación de Seddon y engloba aquellas lesiones nerviosas que incluyen, además de la fragmentación de la mielina interrupción del axón, la rotura o pérdida de continuidad de los tejidos conjuntivos que los envuelven.

El cuadro histológico que podemos observar es el de una secreción completa del nervio, o bien una gran fibrosis intraneural que bloquea la regeneración de las fibras nerviosas. Por todo ello, se puede presumir que no existirá una regeneración espontánea y que la única posibilidad de recuperación viene dada por la reparación quirúrgica de la lesión.

Clasificación según patrón fascicular.

Los troncos nerviosos presentan distintos tipos de modelos fasciculares en distintos nervios y a distintos niveles dentro del mismo nervio.

1. **Monofasciculares.** Compuestos por una única agrupación fascicular. Corresponden a nervios unifuncionales como los colaterales digitales o la rama sensitiva cutánea del nervio radial.
2. **Oligofasciculares.** Son los nervios que agrupan a escasos fascículos. Un ejemplo es el nervio cubital.
3. **Polifasciculares.**

- *Con grupos definidos.* Es el caso de los nervios que presentan numerosos fascículos con agrupación fascicular definida, como el nervio mediano.
- *Sin grupos definidos.* Cuando aparecen abundantes fascículos sin una agrupación delimitada. El nervio ciático común cumple estas características.

Tratamiento del nervio lesionado.

En términos generales, el tratamiento de una lesión nerviosa puede ser de dos tipos, conservador o quirúrgico y depende de un diagnóstico preciso de la naturaleza, localización y gravedad de la lesión. A partir de estos hallazgos hay que decidir si el nervio se debe tratar de inmediato con técnicas quirúrgicas o si debe retrasarse la intervención quirúrgica y dejar pasar cierto tiempo con medidas conservadoras. Sin embargo, la reparación quirúrgica de los nervios no elimina la necesidad de mantener un tratamiento rehabilitador después de la operación hasta que la regeneración ha cesado y no quepa esperar una mayor recuperación (Cuadro 4).

1. ***Tratamiento conservador.*** Antes del comienzo de la recuperación, el tratamiento conservador va dirigido a mantener los tejidos denervados en el mejor estado posible a la espera de su reinervación. Este tratamiento está indicado principalmente en los casos de neuroapraxia o de axotnmesis en las que la recuperación espontánea del nervio suele ser lo normal, aunque también está indicado en todas las lesiones subsidiarias de cirugía, evitando la degeneración de fibras musculares, la formación de tejido fibroso y adherencias, que limitan en gran medida el restablecimiento de la función después de la reinervación. Este tratamiento se basa en dos pilares terapéuticos; la medicación y la fisioterapia.

Los antiinflamatorios son los medicamentos más útiles para disminuir la reacción inflamatoria traumática que sigue a la lesión, disminuyendo la aparición de fibrosis cicatricial que pueda interferir en el proceso espontáneo de la regeneración nerviosa.

Dentro del tratamiento rehabilitador para el tratamiento postural es esencial evitar retracciones capsulares, posturas viciosas o elongaciones tenomusculares que dificultan su recuperación posterior. Esta técnica se realiza por medio de férulas, que pueden ser fijas o móviles. El mantenimiento constante de un grado completo de movimientos pasivos en todas las articulaciones ayuda a evitar las adherencias tendinosas y contrarresta el desarrollo de contracturas invalidantes, deformidades y rigidez articular. Es importante que el masaje y los movimientos sean suaves, ya que las fibras musculares denervadas son particularmente sensibles a las lesiones mecánicas que conducirán a una mayor fibrosis y rigidez.

2. **Tratamiento quirúrgico.** Es el tratamiento adecuado en los casos de neurotmesis con sección completa del nervio o lesión grave de la estructura noble y de sostén interno, pudiendo existir un epineuro relativamente intacto. Además de estos problemas de sección nerviosa, existen con frecuencia lesiones por compresión extrínseca (túnel carpiano, fibrosis cicatriciales, tumores.....) o fricción (túnel epitrocleo olecraneano) que condicionan un problema isquémico cicatricial y acaban lesionando total o parcialmente el nervio.

La reinervación distal de la musculatura y de los órganos receptores de la sensibilidad es posible siempre que no existan obstáculos al crecimiento de los axones. Para ello se precisan unas vías que conduzcan el tejido neoforado hasta las terminaciones distales sensitivas y motoras. De no existir estas vías de conducción el crecimiento de los axones sería desordenado e inefectivo, dando lugar a la formación

de un neuroma. La cicatrización y la desorientación fascicular por rotación de los fascículos son los principales factores que dificultan la recuperación total. Por lo tanto, la actuación quirúrgica sobre un nervio periférico lesionado debe ser minuciosa y precisa para conseguir una orientación fascicular adecuada con el mínimo de reacción cicatricial.

Objetivos de la cirugía:

- a. Reparar un nervio que se sabe que ha sido seccionado.
- b. Mejorar la compresión o tensión responsables de la alteración de la función o del retraso de la recuperación en una lesión en que no exista pérdida de la continuidad del tronco nervioso.
- c. Exponer la naturaleza de una lesión nerviosa de patología no aclarada cuando se sospecha una sección parcial o completa por las pruebas clínicas.

Idoneidad del tratamiento:

La reparación primaria se define como la aproximación nerviosa dentro de los seis primeros días tras lesión, mientras que si se realiza pasados los seis días se denomina reparación secundaria. Es la reparación primaria la que conseguiría una mayor tasa de recuperación funcional.

Hay que tener en cuenta una serie de factores a la hora de decidirse por la realización de una reparación nerviosa primaria o secundaria:

- a. *Mecanismo de lesión.*
- b. *Tiempo transcurrido entre lesión y el tratamiento.*
- c. *Carácter de la herida: si son limpias o contaminadas y si existe cobertura adecuada de partes blandas o no.*
- d. *Presencia de otras lesiones concomitantes.*

e. Tipo de nervio.

Cuadro 4. Indicaciones de cirugía primaria y secundaria (Ayala, 1997). La aproximación epineural se realiza en el primer tiempo quirúrgico como preparación para la reconstrucción secundaria.

			Con condiciones operatorias mínimas	Sin esas condiciones mínimas
Nervios monofasciculares Independientemente del tipo de lesión			Sutura epineural	Sutura epineural
Nervios Polifasciculares	En heridas recientes incisas y limpias	Lesión aislada	Sutura fascicular	Aproximación epineural
		Lesión asociada	Alineación fascicular	Aproximación epineural
	En heridas tardías o contusas o contaminadas	Con pérdida de sustancia	Aproximación epineural	Aproximación epineural
		Sin pérdida de sustancia	Aproximación epineural	Aproximación epineural

La aproximación epineural sería la técnica elegida como paso previo a la realización de una reparación secundaria del nervio lesionado. Si hay que buscar algunas ventajas a la reparación nerviosa secundaria éstas son: la presencia de un epineuro y perineuro engrosados que facilitan la sutura entre los extremos y mejoran la resistencia de la misma, la disminución de la inflamación y edema concomitantes, la delimitación de los tejidos desvitalizados, la reabsorción de hematomas adyacentes, la valoración clínica precisa de la lesión nerviosa; aunque también tiene desventajas, como encontrar un tejido cicatricial que impida una disección cómoda.

Es la lesión de patología no establecida la que presenta los mayores problemas de diagnóstico. Si se ha sobrepasado el plazo previsible para la recuperación espontánea (periodo latente) el nervio debe explorarse quirúrgicamente sin demora. Para calcular el periodo latente es necesario conocer la distancia hasta el primer músculo inervado por debajo de la lesión y la velocidad de regeneración (1 a 3 mm/día).

Los retrasos prolongados se asocian con más frecuencia a lesiones altas y se deben a lesiones de mayor gravedad y con alteración neuronal medular retrógrada. A la vista de los estudios clínicos, el resultado final de la reparación nerviosa es significativamente peor si se realiza seis o más meses desde la lesión inicial.

Tipos anatomopatológicos de lesión nerviosa.

Una vez que se explora el nervio podemos encontrarnos con distintas situaciones ante las que debemos responder: una lesión en continuidad, una lesión parcial o una sección completa del nervio.

1. Lesiones en continuidad. El problema sobre qué hacer con el nervio expuesto cuando mantiene su continuidad siempre es difícil cuando dicho nervio no conserva una apariencia y consistencia normales, de forma que no es posible predecir el desenlace en caso de que el nervio no se intervenga. Es de la mayor importancia evitar la resección y sutura en los casos en que se puede esperar una recuperación espontánea si no se interviene. El primer paso es liberarlo del tejido cicatricial practicando una neurlisis externa. La resección del segmento lesionado y su reparación mediante sutura están justificadas sólo cuando se ha sobrepasado el tiempo en que cabía esperar una recuperación espontánea, el aspecto y consistencia son desfavorables para la regeneración y no existe respuesta motora a la estimulación. La existencia de un neuroma no justifica en sí mismo la resección y sutura.

2. Lesiones parciales. Los pacientes con lesiones parciales pueden mostrar en el examen una pérdida de función completa o parcial en el territorio de los nervios lesionados. El tratamiento quirúrgico de la lesión parcial depende de la forma clínica que adopte. Las lesiones que en la exploración quirúrgica aparecen como una sección parcial presentan un problema particularmente difícil. A menos que el nervio este casi

por completo seccionado, realizando resección completa y sutura, existen dos posibilidades, preservar las fibras supervivientes, practicando una endoneurolisis y reparar el defecto mediante sutura o un injerto fascicular (figura 7), o bien, pueden sacrificarse las fibras supervivientes mediante resección y sutura terminoterminal. La sección parcial se soluciona de forma mucho más fácil mediante reparación primaria que mediante reparación secundaria.

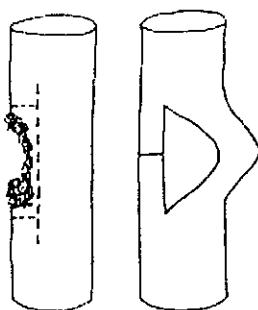


Figura 7. Lesión parcial de un nervio y reparación mediante sutura (Ayala, 1997).

3. Sección completa. La sutura terminolateral es el método de elección para reparar el nervio, con tal que la unión pueda efectuarse en condiciones que aseguren una adecuada irrigación sanguínea de la línea de sutura, un lecho satisfactorio y la ausencia de una tensión desfavorable en esa línea. Si no es posible realizar la sutura terminolateral existen otros métodos alternativos.

Técnicas quirúrgicas.

Las diferentes técnicas quirúrgicas que podemos emplear en relación con la lesión que presenta el nervio son las siguientes:

1. *Liberación.*
2. *Transposición.*
3. *Neurolisis: exoneurolisis y endoneurolisis.*

4. *Sutura nerviosa: sutura epineural, aproximación epineural, sutura fascicular.*
5. *Injertos nerviosos.*
6. *Anastomosis cruzadas.*
7. *Tubulizaciones.*

La liberación, transposición y neurlisis son técnicas que se aplican sobre un nervio lesionado sin solución de continuidad. Estas técnicas pueden aplicarse solas o asociadas.

1. Liberación. Este tipo de tratamiento quirúrgico puede aplicarse cuando un nervio queda comprimido en alguna zona de su trayecto, que habitualmente suele coincidir con canales o desfiladeros anatómicos. Estos desfiladeros anatómicos a veces son un problema de espacio para las estructuras nerviosas que los atraviesan bien por alteración de sus paredes (ganglionares, hipertrofia de estructuras óseas, acromegalias, artrosis....) o bien porque las estructuras que acompañan al nervio sufran un aumento de volumen (tenosinovitis). En una fase inicial de la compresión se produce un sufrimiento nervioso, sin alteración intrínseca de la anatomía nerviosa. En estos casos la simple liberación mediante la apertura de estos desfiladeros es suficiente para que regrese la sintomatología. En la extremidad inferior, el tronco del ciático común puede ser comprimido por el piramidal (síndrome de Robinson), el ciático poplíteo externo a su paso por el cuello del peroné y el ciático poplíteo interno a nivel del canal del tarso.

2. Transposición. Si la tensión sobre el nervio en el canal persiste, a pesar de la liberación, será necesario cambiar su recorrido, siendo el ejemplo típico la colocación del nervio cubital por delante de la epitroclea. En toda transposición debe respetarse al máximo la vascularización del nervio evitando el acomodamiento del mismo, que condicionaría a la larga una nueva patología comprensiva. En cirugía más compleja, si

existe pérdida de sustancia nerviosa, puede utilizarse la transportación para aproximar los extremos nerviosos.

3. Neurolisis. En ocasiones una lesión nerviosa menor puede convertirse en más grave, ya que el tejido cicatricial circundante constriñe el nervio y altera su irrigación sanguínea. Por lo tanto, será necesario liberar el nervio de la zona cicatricial que le rodea y que puede invadir el interior del mismo. La neurolisis externa consiste en liberar el tronco nervioso de su lecho, mientras que la interna constituye la liberación de los distintos componentes fasciculares del tejido fibroso que los rodean. Conviene reseñar que la realización de una endoneurolisis excesiva puede ser perjudicial, bien por producir una alteración vascular con isquemia o bien por destruir estructuras nerviosas durante su realización. Para realizar endoneurolisis, una vez localizado y aislado el nervio, realizando una exoneurolisis si es necesario, se procede a la apertura del epineuro longitudinalmente separando los bordes epineurales y reseándolos. Posteriormente, se procede a la individualización de los fascículos extirpando el tejido fibroso interfascicular, cuidando de no lesionar los fascículos ni sus interconexiones.

4. Sutura nerviosa. La sutura nerviosa o neurorrafía consiste en restablecer la continuidad de un nervio seccionado. Este tipo de técnica quirúrgica se ha venido empleando en aquellos casos en que el nervio ha sufrido una neurotmesis (Figura 8). Los distintos tipos de sutura que se pueden practicar en el nervio son la aproximación epineural, la sutura epineural, alineación fascicular y la sutura fascicular o perineural.

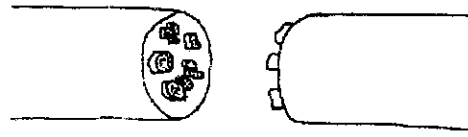


Figura 8. Sección completa de un nervio (Ayala, 1997).

a. **Aproximación epineural.** Es una sutura epineural simplificada, que tiene como finalidad evitar la retracción de los extremos nerviosos y mantener una orientación para la reparación posterior. La aproximación epineural debe emplearse en secciones de nervios que asienten en heridas que no reúnan condiciones locales adecuadas. Se colocan simplemente unos puntos en el epineuro hasta conseguir aproximar o coaptar los extremos nerviosos.

b. **Sutura epineural.** La sutura epineural consiste en restablecer el contacto de los extremos nerviosos mediante puntos de sutura apoyados en el epineuro (Figura 9).

Para conseguir un alto nivel de éxito al realizar este tipo de sutura debemos conseguir una tensión adecuada en la línea de sutura, preservar la irrigación sanguínea del nervio y mantener la alineación axial correcta de los extremos. Una tensión indebida es una amenaza para la regeneración y afecta de forma negativa la recuperación funcional, pero una ligera tensión para aproximar los extremos del nervio no impide por sí misma una buena recuperación. El cirujano dispone de varias técnicas que pueden ayudarle a cerrar el defecto. Entre ellas se encuentran la *elongación*, la *movilización de los extremos*, la *flexión articular*, la *creación de nuevos trayectos* y en algunos casos especiales, los reimplantes y el *acortamiento del hueso*. El problema principal de este tipo de reparación radica fundamentalmente en que los fascículos proximales no suelen

quedar perfectamente contactados con sus correspondientes fascículos distales, por lo que los axones regenerantes no evolucionan por el túbulo endoneural correspondiente. Por otra parte la fibrosis que origina el propio epineuro (Milledi y col., 1970; Ayala, 1997) puede interferir con la regeneración axonal. A esta fibrosis cicatricial se sobreañade la reacción granulomatosa producida por el propio material empleado.

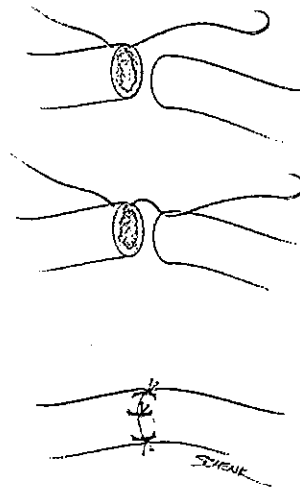


Figura 9. Sutura epineural.

La sutura epineural está indicada en la sección de nervios monofasciculares (colaterales de los dedos, rama cutánea radial, etc.) en los que las alteraciones rotacionales no influyen en los resultados y polifasciculares sin grupos definidos. La sutura epineural es de utilidad en la sección limpia inmediata o en aquellos casos en los que las condiciones del enfermo pueden no justificar realizar técnicas con una mayor complejidad.

La técnica quirúrgica consiste en refrescar los extremos nerviosos, extirpando todo resto de fibrosis, hasta conseguir dos superficies paralelas y una apariencia sana de los fascículos. Para realizar la correcta orientación de los fascículos de este tipo de

sutura se utilizan puntos epineurales de referencia, sirviéndonos como ayuda la estructura plana oval de la sección nerviosa, la disposición de los vasos longitudinales de nervio y el tamaño de los fascículos, si no ha existido una pérdida de sustancia importante. Una vez orientados correctamente los extremos nerviosos procedemos a suturar con puntos simples que atraviesan solamente el epineuro (Figura 9). Hay que tener especial cuidado al aplicar la tensión de la sutura, ya que si se ejerce excesiva presión puede producirse la dispersión de los fascículos dentro de la sutura. Una vez completada, se debe colocar en un lecho de tejido sano y blando, en donde tenga asegurada una buena irrigación sanguínea y una posición protegida, donde las posibilidades de afectarse por adherencias y cicatrices sean mínimas.

c. ***Alineación fascicular.*** Esta técnica, denominada de alineación fascicular, fue descrita con pequeñas variantes por Smith y Hakstian (Smith, 1964). Se realiza introduciendo unos puntos guía por el espacio interfascicular o por el perineuro que coaptan y orientan mejor los fascículos, completando la reparación con puntos de sutura epineural. Esta indicada en las lesiones de los nervios mixtos polifasciculares sin patrón definido.

d. ***Sutura fascicular.*** La sutura fascicular o perineural consiste en la reparación de un nervio seccionado mediante la conexión individual de sus fascículos o grupos de fascículos, previa extirpación del epineuro (Figura 10 y 11). Esta técnica representa un positivo esfuerzo para mejorar las posibilidades de restauración del patrón original de inervación durante el período de regeneración. Fue propuesta ya en 1917 por Langley y Hashimoto, aconsejada también por Sunderland en 1945, siendo actualizada en 1967 por Bora, Goto y Millesi. Dichos autores demostraron que la penetración de axones en los tubos endoneurales relacionados funcionalmente puede facilitarse si se identifican

sistemas fasciculares en los extremos y se suturan por separado. Las ventajas de su utilización consisten en la extirpación total del epineuro en los extremos nerviosos a suturar, con lo cual eliminamos el efecto fibrinogénico de esta estructura y posibilitamos un mejor afrontamiento individual fascicular. Existen 3 desventajas asociadas a la técnica: el *aumento de tiempo necesario para la intervención*, la *posibilidad de aumentar la reacción del tejido conjuntivo en la línea de sutura* y *lesión de vasos sanguíneos* que podría interferir con la vascularización de los fascículos aislados. La sutura fascicular individual, a diferencia de la de grupos de fascículos, resulta a veces impracticable y no se aconseja salvo en condiciones especiales.

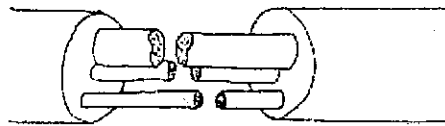


Figura 10. Organización fascicular de un nervio (Ayala, 1997).

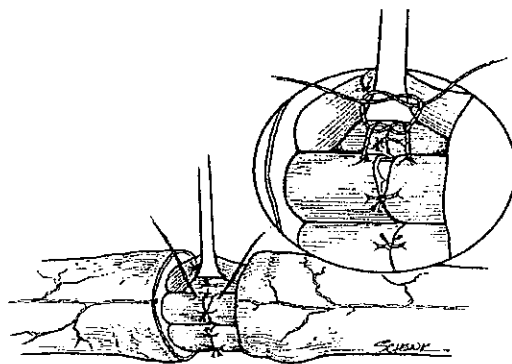


Figura 11. Sutura fascicular.

La principal indicación de este tipo de técnica quirúrgica se presenta cuando cada grupo fascicular está compuesto por fibras nerviosas que representan una rama particular o una función determinada y ocupa una posición constante en el nervio, o bien, es lo bastante para permitir una unión aislada. Esta cirugía es idónea en nervios oligofasciculares o polifasciculares con grupos definidos, como los nervios mediano y cubital en la muñeca. Como norma no debe realizarse en cirugía de urgencia, siendo de elección su aplicación en reparaciones secundarias o en secciones parciales del nervio.

Se sacrifica aproximadamente entre 0.5 y 1 cm de epineuro, adoptando toda clase de precauciones para no inferir la irrigación sanguínea de la región y evitar la lesión de los fascículos. Los fascículos y los grupos de fascículos se anastomosan en función de su tamaño, posición y tipo de agrupamiento. Se puede forzar la sutura con adhesivo de fibrina preparado, que confiere una mayor consistencia a la misma (Figura 9 y 10).

Injertos nerviosos. Si en una lesión nerviosa existe una pérdida de sustancia que imposibilita el afrontamiento de los extremos sin tensión, o bien si a nivel de la lesión existe un componente de fibrosis que obliga a una extirpación amplia, la mejor es el injerto nervioso. El principal objetivo es proporcionar un armazón para los axones regenerantes que no solo los guíe hacia el muñón distal sino que también lo haga de forma que restablezcan el patrón original de inervación del modo más idóneo. Arterias, venas, músculo y duramadre han sido empleados de origen no neural con distintos resultados, aunque ninguno ha superado al injerto de tejido neural, que puede proceder del mismo individuo (autoinjerto), de otro individuo de la misma especie (homoinjerto) o de diferentes especies (aloinjerto). Estos injertos pueden utilizarse frescos, conservados o después de tratamiento mediante predegeneración o irradiación. Las experiencias con

injertos heterólogos y homólogos han dado resultados desalentadores debido a la fibrosis o rechazo que experimentaban, llegándose a la conclusión de que en la actualidad los únicos injertos viables son los autólogos. Existen tres tipos principales de autoinjertos: totales, en cable e interfasciculares. A estos grupos debe añadirse otro, el injerto libre de nervio vascularizado, que es una forma especial de injerto total en el que la irrigación sanguínea del nervio se transfiere al mismo tiempo que el nervio. Un injerto total se compone de un fragmento de nervio de un diámetro semejante al del nervio receptor y que posee todas las estructuras nerviosas (tejido conjuntivo, linfáticos, *vasa nervorum*). Este tipo de injerto tiene el inconveniente de su grosor, ya que si sobrepasan los 5 mm de diámetro, se puede llegar a producir una isquemia central y fibrosis posterior. Los injertos interfasciculares (Millesi, 1976), suponen la anastomosis planificada entre fascículos relacionados funcionalmente (Figura 12). La elección de un nervio para autoinjerto está limitada a los nervios cutáneos de los miembros, aunque han sugerido que los nervios intercostales podrían resultar también aconsejables. Sunderland y Ray en 1947 (Sunderland, 1990) llegaron a la conclusión de que los nervios sural y radial superficial son superiores al resto de los cutáneos tanto en la forma, como en el grosor y la longitud disponibles antes de su ramificación.

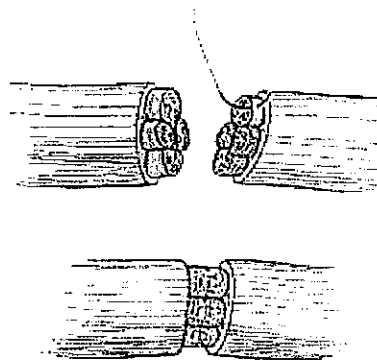


Figura 12. Injerto fascicular.

Siempre se realiza una exploración del nervio con neurolisis e identificación de los fascículos proximales y distales en un primer tiempo. Una vez identificados se seccionan por la zona sana mediante un corte perpendicular y a distintos niveles, para evitar la superposición cicatricial. Una vez obtenido el injerto nervioso se divide en tantos fragmentos como fascículos o grupos fasciculares existan, procediéndose a continuación a la sutura, bastando únicamente 1 o 2 puntos por cada fascículo para su orientación y coaptación.

5. Anastomosis cruzadas. Existen métodos alternativos a los autoinjertos libres que han sido ideados por distintos autores con resultados dispares. Entre ellos se encuentran el injerto pediculado, la sutura terminolateral y las transferencias nerviosas o neurotizaciones. Son técnicas que han sido utilizadas anteriormente con resultados dispares, aunque en la actualidad están siendo redescubiertas abriendo un amplio horizonte en el campo de la reconstrucción nerviosa. El injerto pediculado ha sido abandonado debido a sus resultados mediocres y formación de neuromas.

a. Neurotización. En este método, un nervio donante normal se sacrifica de manera completa o parcial y se utiliza para reinervar el segmento distal del nervio seccionado (Figura 13). El restablecimiento de la función de un nervio seccionado solo se obtendrá si el nervio donante posee una composición en fibras nerviosas semejante al receptor, ya que no tiene sentido la unión de un nervio sensitivo a otro predominantemente motor y viceversa. La reinervación precisa de adaptaciones a nivel cortical para compensar la alteración de los patrones de inervación. No obstante, las posibilidades de reeducación central varían enormemente, por lo que la recuperación es imperfecta. Este método está especialmente indicado en las lesiones del plexo braquial. Esta técnica, también ha resultado útil en la corrección de algunas lesiones irreparables

del nervio facial, seleccionándose el muñón proximal del donante y el espinal accesorio. De todas ellas, sólo la unión cruzada ha permanecido en la práctica clínica.

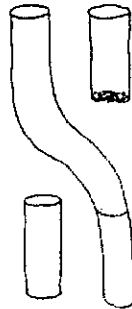


Figura 13. Neurotización (Ayala, 1997).

b. **Sutura terminolateral.** El muñón distal del nervio seccionado se inserta a través de un defecto longitudinal realizada en el epineuro de un normal adyacente. (Figura 14). El objetivo es conducir axones desde el nervio sano al lesionado. Esta técnica está en la actualidad en fase de experimentación, existiendo pocos casos clínicos que contrasten su eficacia.



Figura 14. Sutura terminolateral (Ayala, 1997).

Tubulización.

Los métodos de sutura para reparar nervios seccionados fueron desarrollados en el siglo XVII (Spector y col., 1991) y las técnicas de tubulización nerviosa evolucionaron

espontáneamente a la mitad del siglo XIX (Ramón y Cajal 1928; Spector y col., 1991 b). En los primeros años del siglo XIX, la carencia de materiales adecuados para sutura favoreció el desarrollo de estas cámaras para facilitar el crecimiento axónico como un método alternativo a la neurografía (Brian, 1991).

La cámara de tubulización es una estructura cilíndrica donde se introducen los extremos de un nervio seccionado para promover su regeneración (Brian, 1991); durante varias décadas se han utilizado distintas clases de materiales para formar las prótesis para tubulización nerviosa y así estudiar los mecanismos tanto celulares como moleculares de regeneración, (Baley y col., 1993; Bates y col., 1991; Chen y col., 1995; Danielsen y col., 1996; Kanje y col., 1988; Lundborg y col., 1994; Salonen y col., 1987; Williams, 1987). Para ello se han empleado distintas clases de nervios en diferentes especies animales: el nervio ciático de la rata ha sido uno de los más utilizados, así como la rama bucal superior del nervio facial del conejo y el nervio ciático del perro (Chen y col., 1989; He y col., 1992; Lundborg y col., 1994; Rosales- Córtes y col., 1998; Spector y col., 1991 a y b, 1993; Varon, 1993).

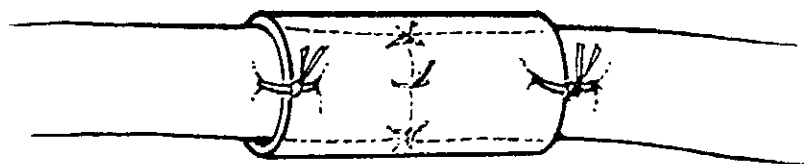


Figura 15. Tubulización.

Los compuestos utilizados en la tubulización varían desde materiales sintéticos como la silicona (Spector y col., 1991 b, 1992, 1993), Gortex (Terris y col., 1993), millipore (Campbell y col., 1961), surgicel (Gabrielsson y col., 1996), colágena (Braun y

col., 1966) y ácido poliglicólico (Pham y col., 1991), hasta materiales endógenos, como duramadre, vena y componentes de membrana basal (Brian y col., 1991; Terris y col., 1993).

Recientemente, se han empezado a estudiar biomateriales como la quitosana para analizar sus posibles efectos favorables sobre la regeneración nerviosa, debido a las características físico-químicas que posee, especialmente propicias para integrarse a los tejidos y contribuir a la reorganización del tejido lesionado (Chávez-Delgado y col., 1997; Gómez-Pinedo y col., 1998; Rosales-Cortés y col., 1998).

Proceso de regeneración en nervios tubulizados.

El proceso comienza con la exudación de líquido acelular en la cámara axónica (Brian y col., 1991), la mayor parte del líquido es suero y en cantidad variable; sangre, líquido extracelular y detritus citoplasmáticos intracelulares, incluyendo organelos intracitoplasmáticos como membranas del retículo endoplásmico provenientes de los extremos nerviosos proximal y distal (Spector y col., 1991 a y b).

En esta matriz líquida están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas que favorecen el crecimiento celular, migración, mitogénesis y elongación (Baley y col. 1993; Chen y col., 1995; Ide, 1996; Lundborg y col., 2000; Spector y col., 1993; Williams, 1987; Varon, 1993). Después sucede crecimiento de células de origen mesodérmico, particularmente fibroblastos perineurales, procedentes de ambos extremos seccionados (Williams, 1987), estas células se extienden a través de la matriz que actúan como soporte estructural para orientar la migración de axones y células de Schwann (Baley y col., 1993; Salonen y col., 1987; Williams y col., 1987), las bandas de fibrina y colágena forman vías para el rebrote de neuritas que contribuyen a formar el epineuro primitivo (Spector y col., 1991a). Al mismo tiempo migran macrófagos, ellos

fagocitan eritrocitos, cristales originados de la compactación de los restos celulares y otros remanentes tisulares que aparece delimitados por vacuolas fagocíticas en su interior, estas células aparecen dispersas entre los componentes de la matriz en formación (Spector y col., 1991a; Varon, 1993).

Diversos estudios han reportado que con las cámaras de crecimiento axónico se obtienen mejores resultados que con las suturas (Brian y col., 1991; Terris y col., 1993), tanto en modelos animales como en seres humanos (Lundborg y col., 1994; 2000), sin embargo no es posible comparar la eficacia de estos estudios debido a la gran variabilidad de condiciones experimentales y los parámetros empleados para valorar la recuperación (Brian y col., 1991; Danielsen y col., 1996; Terris y col., 1993). La aplicación clínica de estos métodos será en el futuro cercano, debido a que no se conocen los efectos secundarios por la presencia de prótesis para formar cámaras de crecimiento nervioso, elaboradas con diversos biomateriales (Brian, 1991; Danielsen y col., 1996; Terris y col., 1993). La propuesta de aplicar una sutura en nervios seccionados, es alinear y llevar a cabo con la mayor precisión posible, la correspondiente unión de los componentes fasciculares del segmento nervioso proximal y distal (Lundborg y col., 2000). No obstante a lo anterior, por ahora la técnica de tubulización es un recurso invaluable para obtener muestras del microambiente que rodea a los axones en regeneración y así obtener información precisa de los mecanismos de reparación nerviosa, frente a las diferentes variables analizadas a través de la manipulación experimental (Brian y col., 1991).

Independientemente del material utilizado, en los nervios tubulizados se producen los siguientes eventos:

a. La cámara actúa como un túnel de orientación para el crecimiento de axones y mantiene la comunicación química entre los extremos proximal y distal del nervio seccionado (Brian, 1991; Spector y col., 1991b).

b. Permite que se concentren los factores tróficos y compuestos mitógenos naturalmente producidos por los tejidos lesionados (Spector y col., 1993; Varon, 1993).

c. Hace posible la aplicación "*in situ*" de diversos compuestos al nervio lesionado (Kanje, 1988; Sjöberg y col., 1990), entre ellos; precursores de matriz extracelular - Laminina (Baley y col., 1993; Salonen y col., 1987), fibronectina (Baley y col., 1993; Williams y col., 1987), solución salina, plasma, FNT, FPN (Chen y col., 1989, 1995; He 1992; Spector y col., 1993; Varon 1993), bFGF (Bates y col., 1991; Danielsen y col., 1988), IGF-I (Sjöberg y col., 1990) y hormona tiroidea (T3) (Barakat, 1999), entre los principales.

De distintos estudios con nervios axotomizados-tubulizados de roedores se ha evidenciado que el éxito de la regeneración depende fundamentalmente de los siguientes factores (Spector y col., 1991b; Terris y col., 1993):

1. Variaciones en el diámetro del tubo (Williams y col., 1987).
2. Distancia entre los segmentos del nervio -10 mm/15 mm etc. (Lundborg y col., 1994; Spector y col., 1991b; 1993; Williams y col., 1987).
3. El uso de diferentes sustancias tróficas como el NGF (He, 1992; Kanje y col., 1988).
4. El uso de materiales sintéticos o biomateriales para la elaboración de los implantes o prótesis (Brian, 1991; Terris y col., 1993).
5. Aplicación de precursores de matriz extracelular: laminina, fibronectina (Baley y col., 1993).
6. Naturaleza del traumatismo nervioso.

7. Propiedades de las paredes del material utilizado en la tubulización: permeable, semipermeable, etc. (Hurtado y col., 1987; Rende y col., 1991; Spector y col., 1992).

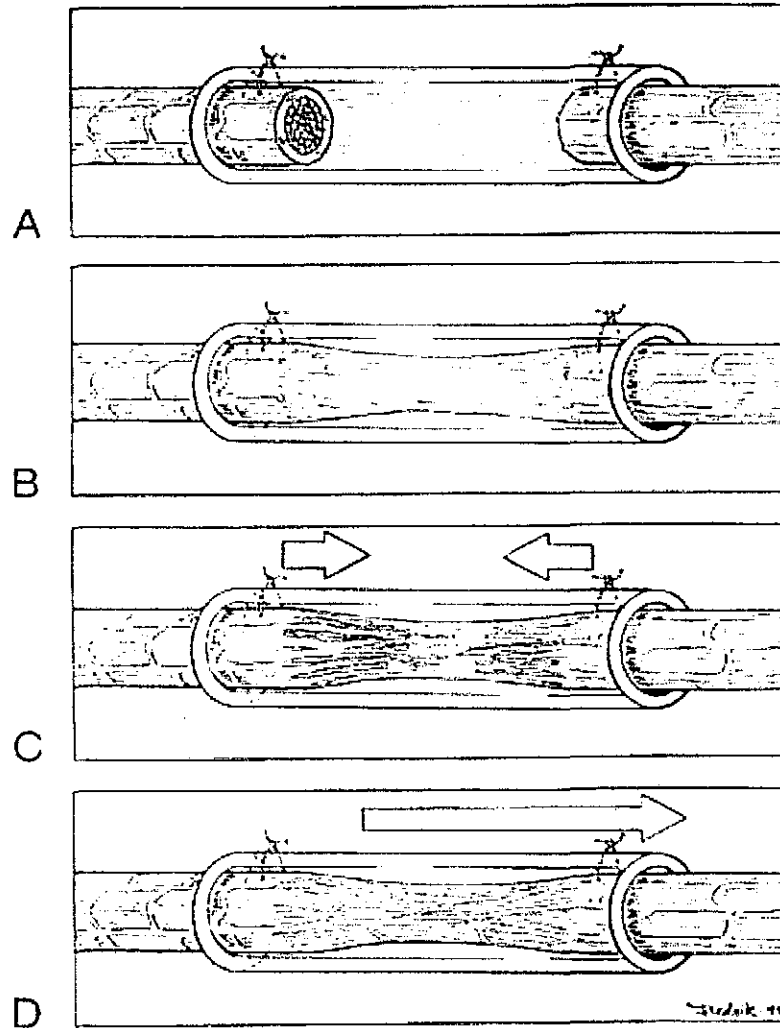


Figura 16. Eventos estructurales y celulares en una cámara de silicona después de su implantación. **A.** Horas. Acumulación de fluido que contiene factores neurotróficos y células inflamatorias. **B.** Días. Se forma una matriz de fibrina bien organizada, el muñón proximal y distal contienen macrófagos. **C.** Semanas. La matriz de fibrina es invadida por células de Schwann y fibroblastos. En el muñón proximal y distal comienzan a crecer los axones y microvasos sanguíneos. **D.** Meses. El crecimiento de fibras nerviosas se nota en el segmento nervioso, hay una matriz bien organizada con reensamble de la estructura vascular nerviosa (Dahlin y col., 2001).

En cámaras axónicas de 10 mm de longitud se han alcanzado favorables resultados en la regeneración nerviosa; debido a una organización adecuada de la matriz de fibrina (Williams y col., 1987), esto no sucede con distancias de 15 mm ó mas; a causa del mayor volumen libre en el interior de la cámara, no se forma una matriz extracelular organizada (Rende y col., 1991; Williams y col., 1987).

Como hemos visto, la regeneración nerviosa a nivel del sistema nervioso periférico implica una compleja interacción de células y sustancias que promueven el crecimiento del nervio con la intención de restaurar las funciones motoras y sensoriales (González, 1992). En las últimas tres décadas se han mantenido sin cambios las técnicas quirúrgicas para la reparación de nervios periféricos. Sin embargo, se ha estudiado el efecto de diversas sustancias que pueden aplicarse directamente en el nervio o a través de una cámara de tubulización con el propósito de facilitar la regeneración. Estas sustancias en su mayoría poseen efectos neurotróficos, actúan como mitógenos potentes y son neuritogénicas. Entre las más conocidas están; el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento tipo 1 semejante a la insulina (IGF-I) y los neuroesteroides, como la pregnenolona, progesterona y dehidroepiandrosterona (Ide, 1996; Salonen y col., 1987; Utley, 1996).

Una de las principales tendencias para el futuro, es la utilización de compuestos neurotróficos y biomateriales que hagan posible la aceleración de la regeneración nerviosa o la recuperación exitosa de lesiones en las que sucede pérdida de segmentos extensos de nervios como lo ha demostrado con bastantes limitaciones la silicona el millipore, el ácido poliglicólico (De Medinaceli y col, 1983) y la quitosana (Rosales-Cortés y col., 1998).

Por lo que, la reparación de nervios seccionados mediante tubulización en aquellos defectos mayores de 5 mm (Langone y col., 1995) y aplicando compuestos neurotróficos, en teoría tiene un excelente futuro.

Biomateriales.

Los biomateriales son definidos como materiales no-viables utilizados como dispositivos médicos que intentan interactuar con los sistemas biológicos. La aplicación de biomateriales para reemplazar, mejorar o reconstruir órganos enfermos o dañados es actualmente de gran interés para muchos investigadores. El concepto detrás del uso de materiales biodegradables es que ningún cuerpo extraño interrumpa en el hospedero su función (den Dunnen y col., 2000). Los métodos en ingeniería de la regeneración nerviosa periférica para lesiones, se ha enfocado en la implementación de tubos como implantes. La regeneración nerviosa difiere de otros mecanismos regenerativos, como el del tejido conectivo, muscular y epitelial, en que la mitosis de las células parénquimales no es requerida por el nervio, la regeneración de un nervio, depende del crecimiento (alargamiento) de los procesos celulares (axones) que previamente han sido destruidos por algún agente dañino (Chamberlain y col., 1997), y es por esto que existe la necesidad de buscar nuevas alternativas para reparar nervios periféricos, en particular cuando hay defectos en la continuidad del nervio (Brandt y col., 1999).

Los biomateriales pueden estar compuestos por distintas clases de polímeros naturales como: celulosa, pectinas, almidón, etc., pese a la abundancia de estas materias primas, actualmente se estudian diferentes clases de compuestos, algunos de ellos son producto de la síntesis química, los cuales se utilizan ordinariamente en diferentes aplicaciones clínicas; tubos de acetato de celulosa para diálisis, dacrón en

injertos vasculares, poliuretanos de grado comercial en el desarrollo de corazones artificiales, etc. (Matsumaru, 1997).

Se han evaluado los efectos por el uso de distintos biomateriales en el tratamiento de enfermedades cerebrales como; malformaciones arteriovenosas, aneurismas y, tumores en cabeza y cuello (Plant y col., 1997; Stichel y col., 1998), los resultados favorables obtenidos permiten inferir que existe una gran diversidad de posibles aplicaciones biomédicas para ellos. Por otra parte, existe una relación directa entre el desarrollo de biomateriales y la posibilidad de nuevos tratamientos específicos contra diversas clases de trastornos neurodegenerativos (Stichel y col., 1998).

Recientemente, en el área de neurociencias, se han utilizado biomateriales para elaborar hidrogeles, utilizados como implantes cerebrales con resultados favorables. Este recurso terapéutico es de gran importancia para el manejo clínico del tejido nervioso lesionado (Aoki y col., 1998; Woerly, 1999).

Se ha intentado utilizar una gran variedad de conductos para reparar defectos nerviosos. Los materiales de origen natural han aparecido para mejorar la biocompatibilidad, disminuir los efectos tóxicos y estimular la migración de células de Schwann (Evans y col., 2000). Se ha intentado utilizar una gran variedad de conductos para reparar defectos nerviosos. Los materiales de origen natural han aparecido para mejorar la biocompatibilidad, disminuir los efectos tóxicos y estimular la migración de las células de Schwann. Materiales sintéticos y naturales han sido empleados como plataforma para la implantación en defectos articulares en cartílago y para reparar daños en nervios periféricos. Estos materiales incluyen fibrina, geles de colágena, vena, laminina, fibronectina, colágena y esponjas (Evans, 2000; Shen y col., 2000).

Una de las desventajas de los polímeros no biodegradables, como el polietileno y la silicona, es la reacción inflamatoria que provocan en el hospedero a causa de las características de superficie y el contacto a largo plazo en los tejidos. Coleman y colaboradores, apoyan la hipótesis de que el uso de implantes de cápsulas de silicona representa complicaciones como lo son el desarrollo de una herida tridimensional alrededor de los implantes, clínicamente el uso de tubos de silicona causa problemas a largo plazo. Los tubos se encapsulan con tejido fibroso, esto produce compresión del nervio y se necesita un procedimiento quirúrgico para remover el tubo, además Lundborg y col. (1991) reportan que las cámaras de silicona no deben ser utilizadas como una alternativa para sustituir injertos nerviosos en grandes longitudes debido a su impermeabilidad (Gibson y col., 1989; Lundborg y col., 1991).

En general, los biomateriales tienen una gran cantidad de aplicaciones; tanto farmacológicas como quirúrgicas. Sin embargo; a pesar del gran impacto favorable que han tenido para su utilización biomédica, es necesario desarrollar mejores compuestos para hacerlos más biocompatibles (Habbell, 1998; Matsumaru, 2000) y conferirles cualidades que les permitan tener comportamiento bioactivo (Süheyla, 1997), es decir; que faciliten la reparación de los tejidos lesionados con los que se ponen en contacto. Esto para favorecer la regeneración y que ésta sea lo más parecida a las condiciones originales del tejido (Park, 2000).

En la última década se han utilizado diferentes compuestos bioactivos en la tubulización, ellos son biodegradables y pueden provenir de fuentes naturales o de síntesis química, entre los biomateriales de origen orgánico destaca la quitosana homopolímero natural de estructura lineal con enlaces beta N-acetilglucosamina (Drozd y col., 1994; Langone y col., 1995; Muzzarelli, 1994; Yoshimoto, 1995), se obtiene con

la deacetilación de la quitina componente del caparazón de algunos invertebrados (Drozd y col., 1994), del tallo de algunas plantas y hongos. Es bien conocido que la quitosana puede formar complejos de polielectrolitos con varios glicosaminoglicanos bioabsorbibles, como sulfato de condroitina y el ácido hialurónico. Se ha demostrado recientemente que la quitosana da mejores resultados si se encuentra en conexión a células en proliferación (Shen y col., 2000).

Sin embargo, por la abundancia de exoesqueletos disponibles como producto de desecho de alimentos, la quitosana es primariamente manufacturada de crustáceos y puede fabricarse de diversas formas en solución, hojuelas, polvo, gotas y fibras (Shepherd, 1997).

La quitina y sus derivados poseen características favorables para su aprovechamiento industrial, así mismo ha despertado interés comercial por sus propiedades únicas de solubilidad dependiente del pH, se muestra insoluble en agua, solventes orgánicos y en soluciones alcalinas hidrosoluble en medios ácidos (Broussignac, 1968; Lorenzo-Lamosa, 1998; Kas, 1997; Shepherd, 1997). Es bioabsorbible y biodegradable, propiedad de mayor interés en aplicaciones biofarmacéuticas. Se ha demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro*, que es lentamente degradada por las enzimas quitosinasas y lisozimas, con la primera la biodegradación sucede en el 75% y hasta un 35% con lisozimas (Kumar, 1999; Tomihata y col., 1997; Várum y col., 1996).

Otra propiedad de este biomaterial es la capacidad de formar un heteropolímero con los fijadores aldehídos con la finalidad de endurecer las superficies de los productos de quitosana por entrecruzamiento y prolongar su biodegradación y liberación de sustancias (Akbuga y col., 1996; Bayomi y col., 1998). Este biomaterial tiene un

porcentaje de deacetilación menor a 74% (Jameela y col., 1995, 1998) y un peso molecular de 50,000 daltons (Genta y col., 1998). Además de la solubilidad y todos son factores que influyen para que suceda liberación de sustancias (Kotzé, 1999; Kumar, 1999; Onishi y col., 1999; Wang, 1994), se ha considerado catiónica por ser un ión positivo con una base amino (NH_2), funciona atrayendo moléculas cargadas negativamente (Monteiro, 1999) su actividad antibacteriana implica el entrecruzamiento entre una quitosana policatiónica y los aniones sobre la superficie bacteriana que cambian la permeabilidad de la membrana celular (Tsai y col., 1999); otras propiedades descritas han sido; baja toxicidad (Illum, 1998; Jameela y col., 1995; Kas, 1997; Rao y col., 1995), es hidrofílica (Allan y col., 1984; Illum, 1998; Rao, 1995), estable frente a la putrefacción, moldeable y modelable (Figura 17) (Broussignac, 1968).

Por las propiedades de este biomaterial se han conferido múltiples aplicaciones biomédicas (Cuadro 5) (Allan y col., 1984) facilita el proceso de cicatrización en heridas, lesiones por quemaduras y la recuperación de lesiones cutáneas crónicas (Saintigny y col., 1993), esto mediante la activación de macrófagos, estimulación de fibroblastos (Muzzarelli, 1994) proliferación y unión celular (Denuziere, 1998) además ha demostrado ser un biomaterial biocompatible con los condorcitos (Suh y col., 2000). Se ha utilizado en membranas de hemodiálisis, como piel artificial, en columnas de hemoperfusión, liberación prolongada de drogas en sistemas orgánicos, también, como agente hemostático, en perros que presentan heridas abiertas; como cicatrizante, para acelerar la infiltración de células polimorfonucleares y producción de colágena por fibroblastos. Además la quitosana fomenta el constante crecimiento nervioso y ha demostrado ser histocompatible con las células de Schwann (Haipeng y col., 2000; Kuang y col., 1998; Sharma, 1993; Ueno y col., 1999).

Cuadro 5. Algunas aplicaciones de la quitosana (Han, 2001).

Tratamiento de Aguas residuales.	<ul style="list-style-type: none"> - Remoción de metales - Floculante/Coagulante: <ul style="list-style-type: none"> • Proteínas • Colorantes • Aminoácidos
Industria alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> -Vendajes -Control del colesterol sanguíneo -Control en la liberación de fármacos. -Inmovilización enzimática -Recuperación celular. -Cromatografía -Inmovilización celular
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> -Cubierta de semillas -Fertilizante -Control en la liberación de agroquímicos.
Pulpa y Papel	<ul style="list-style-type: none"> -Tratamiento de superficie -Papel fotográfico
Membranas	<ul style="list-style-type: none"> -Permeabilidad y control. -Osmosis reversa

No obstante, todos los materiales utilizados, ya sea de origen natural o sintéticos, concebidos como ideales en la reparación de tejidos, pueden presentar algunas dificultades. Los materiales naturales pueden inducir respuestas inmunológicas indeseables, en función del paciente y del origen del material utilizado.

A partir de la problemática potencial de los materiales naturales, es que se han utilizado los materiales sintéticos. Algunas variaciones en las propiedades químicas y en la ingeniería de los materiales sintéticos, permiten que se hagan alteraciones geométricas en su configuración. La variación en los parámetros antes definidos, puede traer consecuencias dramáticas que pueden alterar la habilidad de los axones para proliferar (Evans y col., 2000).

Por la específica biodegradabilidad y pH dependiente (Kotzé, 1999; Wang y col., 1994), la quitosana se ha utilizado como vehículo de liberación prolongada de compuestos (Felt, 1998; Lorenzo-Lamosa 1998; Macleoid y col., 1999), utilizando el recurso de formar distintos grados de entrecruzamiento con glutaraldehído y formaldehído (Akbuga y col., 1996; Bayomi y col., 1998; Jameela y col., 1998).

Estudios *in vitro* e *in vivo* previos, han demostrado que la quitosana tiene efecto estimulador sobre la producción de macrófagos, óxido nítrico y quimiotaxis; la primera es atribuida a la unidad N-acetilglucosamina, el efecto inmune estimulador es específico de otros glucosaminoglucanos (N-acetil-manosamina y N-acetil-D-galactosamina) que no tienen efectos en la producción de óxido nítrico (Kosaka y col., 1996; Peluso y col., 1994). Implantes subcutáneos de quitosana (Peluso y col., 1994) demostraron quimiotaxis de neutrófilos dentro de las primeras 24 a 96 horas (Kosaka y col., 1996; Macleoid y col., 1999), además se identificaron elevadas concentraciones de productos del ácido araquidónico (LTB₄ y PGE₂), implicados en la migración de PMN (polimorfo nucleares) en regiones donde fue implantado este biomaterial (Jameela y col., 1998).

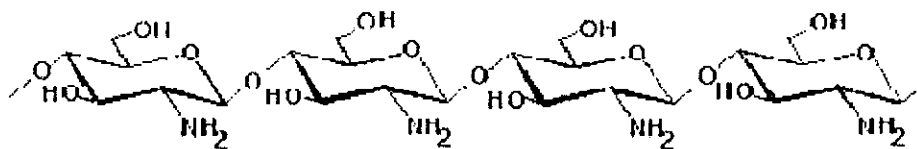


CAPARAZONES PROVENIENTES DEL PROCESO DE ALIMENTOS

DESCALCIFICACIÓN en dilución acuosa en solución de HCL

DECOLORACIÓN en $KMnO_4$ al 0.5% y en acido Oxalico o al sol

QUITINA



DESACETILACIÓN en solución caliente de NaOH concentrada (40-50%)

QUITOSANA

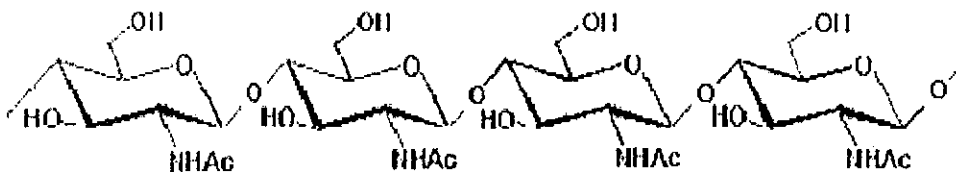


Figura 17. Preparación de la quitosana (Han y col., 2001).

Métodos electrofisiológicos para el sistema nervioso periférico.

Los métodos electrofisiológicos clásicos se han concentrado en las técnicas de estimulación-registro. Colocando electrodos de registro en las estructuras nerviosas que nos interesan y el cátodo de estimulación en el punto nervioso deseado, podemos conocer la velocidad de conducción, latencia del impulso y otros datos que traducen la funcionalidad del nervio. Si aplicamos múltiples impulsos en el cátodo de estimulación, el registro obtenido una vez integrado nos permitirá conocer una medida que se aproxima al valor real. Este sistema es el empleado por ejemplo en los potenciales de acción somatosensoriales (desde la unión neuromuscular hasta su integración cortical), la frecuencia de impulsos más frecuentemente empleada es de 2.048 pulsos/seg. La duración de un pico individual a cada estímulo varía inversamente con la velocidad de conducción de la fibra de manera que a 37°C la duración de un pico es de 0.35 ms para una fibra que conduce a 70 m/s y es de 0.60 ms para la que lo hace a 10 m/s (González, 1992).

La activación eléctrica del sistema nervioso es una técnica utilizada para restaurar la función a individuos con desordenes neurológicos. Las prótesis requieren de una interfase que estimule una activación selectiva de grupos específicos de neuronas.

Mielina y electroconducción.

Existe una relación entre el calibre del cilindro eje, el espesor de la vaina de mielina, la distancia entre los nodos de Ranvier y la velocidad de conducción del impulso nervioso, cuanto mayor es el calibre del axón, mayor es el espesor de la vaina de mielina y más grande la distancia internodal. Por ello, cuando una fibra miélica está creciendo, las distancias internodales aumentan progresivamente. Se puede decir que

en las fibras amielínicas se produce una propagación continua de la excitación, mientras que en las mielínicas la transmisión de los impulsos se realiza de forma saltatoria. Las bases morfológicas de este tipo de conducción se explican por la alternancia de segmentos cubiertos por mielina (internodos) y las zonas amielínicas (nodos de Ranvier) a lo largo del nervio. Este tipo de conducción es mucho más rápida y requiere menos energía que la propagación continua de la excitación (Lawrence, 1993).

Velocidad de conducción nerviosa (VCN) y grosor de la fibra.

La velocidad de conducción nerviosa (VCN), es la velocidad con la cual una señal nerviosa viaja a través de las fibras nerviosas en un nervio periférico, la VCN puede ser medida *in vitro* en un nervio extirpado, o *in vivo* exponiendo al nervio mediante técnicas quirúrgicas, o también en animales intactos. Para medir la VCN solo un segmento del nervio seleccionado puede ser suficiente, la medición exitosa depende de la temperatura (alrededor de 37° C) por lo que es importante controlar esta variable cuidadosamente en el tejido (González, 1992; Krinke, 2000).

Utilizando estímulos espaciados y variando el intervalo entre estos estímulos es posible la medición en el tiempo requerido por el nervio para restaurar el equilibrio iónico y generar el segundo potencial de acción, ya que existe un periodo refractario en el cual el nervio no respondería al estímulo (Krinke, 2000).

Funcionalmente, las fibras nerviosas se dividen según la existencia o no de mielina, grosor de la fibra y velocidad de conducción, considerándose los siguientes tipos:

- **Tipo A:** fibras mielínicas gruesas (5-20 μ) y de conducción rápida (10-120 m/s). Son fibras motoras y sensitivas somáticas.
- **Tipo B:** fibras mielínicas de diámetro menor de 5 μ m y de velocidad de conducción entre 2-15 m/s. Son fibras mayormente vegetativas.
- **Tipo C:** fibras amielínicas de calibre mínimo y con velocidad de conducción inferior a 2 m/s. Son fibras vegetativas y sobre todo sensitivas, transmisoras de impulsos sensitivos procedentes de receptores de alto umbral.

La resistencia mecánica de un nervio periférico depende de su contenido en fibras circulares elásticas. En los nervios de las extremidades, el perineuro actúa como un elemento de refuerzo adicional en las regiones articulares, el epineuro se dispone adyacente al perineuro y sus capas más internas forman estratos concéntricos, mientras que las capas más superficiales se continúan con tejido conectivo laxo que contiene grasa, vasos sanguíneos y linfáticos (Werner, 1988).

Distribución y velocidad de conducción del impulso.

Esta descrito que al lesionar el nervio ciático de la rata, antes de su ramificación, queda denervada la zona diana y tanto funciones motoras como sensitivas de los músculos externos del miembro quedan disminuidas por completo. Esto puede ser comprobado utilizando una estimulación computarizada con pantalla de osciloscopio, mediante la cual se puede graficar la actividad del nervio ciático (voltaje, velocidad de conducción, etc.), cabe hacer el señalamiento que es de gran importancia la posición de los electrodos y la zona de la estimulación (Soto y col., 1990) así como la temperatura del tejido (González, 1992; Krinke, 2000).

La máxima velocidad de conducción de potenciales compuestos (potenciales evocados), entre los muñones proximal y distal en el nervio safeno del perro, fue determinada con estimulaciones directas sobre el nervio, colocando electrodos bipolares de plata en dos puntos diferentes de registro. Primeramente se colocó un electrodo en el muñón proximal que registró una velocidad de conducción de 66.3 ± 2.2 m/s y otro en el muñón distal con una velocidad de 62.3 ± 2.0 m/s (Whalen y col., 1982). También se han utilizado multielectrodos en espiral, con éstos se logró una estimulación selectiva de fibras del nervio ciático del perro diseccionándolo, estimulando y registrando su actividad con seis electrodos colocados en diferentes puntos de su trayectoria (Rozman y col., 1981).

Por otro lado, diferentes modelos de animales se han utilizado para determinar las características fisiológicas del nervio ciático y aunque el calibre del nervio en las especies es diferente, no lo es el número de fibras mielinizadas y no mielinizadas. Si a este nervio le aplicamos una estimulación computarizada de 25 microvolts, la velocidad de conducción del impulso en promedio es de 41 a 60 m/s (Robertson y col., 1994).

Efecto de la edad sobre las fibras melinizadas de nervios periféricos en la rata.

Esta aceptado que el SNP y SNC se deterioran con la edad. Existe una acumulación de estudios electrofisiológicos y morfológicos en la cual describen los efectos en nervios somáticos periféricos, los cuales nos indican que las fibras nerviosas autónomas no están sujetas a un gran efecto por la edad. Únicamente algunos estudios han reportado lo contrario. Soto y col. (1990) han demostrado que la máxima velocidad de conducción de las fibras mielínicas en el nervio vago de la rata disminuye cerca del 10 %, mientras que la velocidad de conducción de las fibras no mielinizadas estuvo sin

cambio. Recientemente Soltanpour y Santer (1996) cuantificaron el número de fibras en el nervio vago y no encontraron diferencias significativas en el total de las fibras mielinizadas y una disminución ligera en el total de las fibras no mielinizadas por mm^2 en ratas adultas de avanzada edad (Navarro y col., 1994; Nakayama y col. 1998).

En estudios electrofisiológicos se ha comprobado que en ratas viejas se presenta una reducción del 25 % en el número de fibras en el nervio pélvico específicamente en las fibras que presentan un diámetro de $0.7 \mu\text{m}$, también se demuestra que no hay cambios significativos en la velocidad de conducción máxima, el número total y diámetro de fibras mielinizadas y, la velocidad de conducción máxima de las fibras no mielinizadas (Nakayama y col., 1998).

Este estudio electrofisiológico mostró que la velocidad de conducción máxima de la fibras mielinizadas del nervio pélvico es aproximadamente de 10 m/s y los diámetros de la mayoría de las fibras fueron más pequeñas que $7 \mu\text{m}$. Estos resultados indican que la mayoría de las fibras del nervio pélvico de rata son fibras tipo A δ . También se ha demostrado que puede perderse el registro de los potenciales evocados de las fibras mielinizadas grandes. Esto porque las distancias interpolares (distancia entre el electrodo de estimulación y el de registro) de los electrodos son muy cortas para registrar los potenciales de acción, cuyas velocidades de conducción fueran mucho más rápidos.

En las fibras mielinizadas somáticas periféricas pequeñas no se han encontrado cambios fisiológicos o morfológicos en las fibras mielinizadas A δ del nervio pélvico. Las pequeñas fibras A mielinizadas en los nervios somáticos y viscerales han demostrado ser resistentes al envejecimiento, en contraste a las fibras grandes mielinizadas de los

nervios somáticos periféricos, en los cuales se ha reportado desmielinización y atrofia axonal durante el envejecimiento.

La velocidad de conducción máxima de las fibras motoras periféricas disminuyen en un 10-30 % en humanos y animales de laboratorio. Se ha reportado que las fibras sensoriales aferentes mantienen sus niveles de velocidad de conducción máxima en adultos normales hasta avanzada edad en el nervio sural de humanos y en el nervio que inerva el músculo flexor *hallocis longus* de ratas. También existen reportes donde se menciona una disminución de la velocidad de conducción de los nervios sensitivos con el envejecimiento y esto se ha comprobado en estudios con el músculo gastrocnemius medial de ratas así como en el nervio sural y mediano de humano. Pero la porción mayor de las fibras mielinizadas en el nervio pélvico de ratas pertenecen al tipo de sensoriales y responden a las fibras nerviosas pélvicas aferentes para incrementar la presión intravasal, la cual es bien mantenida en ratas viejas. Por lo tanto, las fibras sensoriales mielinizadas en los nervios autonómicos son más resistentes al envejecimiento.

En estudios donde toman como modelo experimental al nervio pélvico, el cual esta compuesto primariamente por fibras mielinizadas, se ha demostrado que el número total de fibras disminuye durante la vejez, en el proceso de envejecimiento se ha observado que el número de fibras no mielinizadas delgadas más pequeñas que $0.7 \mu\text{m}$ de diámetro van disminuyendo selectivamente, mientras que el numero de fibras no mielinizadas más grandes $0.7 \mu\text{m}$ de diámetro no cambiaron con la edad. Existen también algunos datos que nos indican que durante el envejecimiento el número de neuronas autonómicas preganglionares disminuye a nivel de la rama T6 - T8 en

humanos y el núcleo motor dorsal del nervio vago en ratones, es por ello que la capacidad de contracción de la vejiga urinaria disminuye con la edad (Nakayama y col. 1998).

Electrodos que se utilizan para estimular nervios periféricos.

La activación eléctrica del sistema nervioso mediante estimulación eléctrica es una técnica utilizada para restaurar la función sensorial y motora a individuos con desordenes neurológicos. Las prótesis estimulan selectivamente a grupos específicos de neuronas. Son una tecnología emergente utilizada para restaurar la función a individuos con daño en el sistema nervioso. Las prótesis neurales se aplican clínicamente en el sistema sensorial y motor. La activación eléctrica de las motoneuronas se utiliza para restaurar los movimientos funcionales de individuos paralizados por daño en la médula espinal, infarto o lesiones cerebrales. Las aplicaciones actuales incluyen la restauración de las funciones de la vejiga, función sexual, respiración electrofrénica y restauración de las funciones de la mano (apretar-soltar).

Un requerimiento fundamental de las prótesis neurales es que constituyen una interfase que sea capaz de seleccionar y graduar la activación específica de determinados grupos neuronales (fibras nerviosas). Estos dispositivos deben ser estables durante el período de estudio y no deben ser dañinos para tejido donde son implantados (Grill, 2001).

Los electrodos activan selectiva y gradualmente al tejido diana (músculo) de forma repetitiva sin dañar al tejido circundante. Los electrodos deben tener biocompatibilidad activa y pasiva. La biocompatibilidad pasiva se refiere a la reacción del tejido, a la composición, forma y propiedades mecánicas del material de que esta

formado. La biocompatibilidad activa se refiere a la función del dispositivo bajo estimulación: el paso de la corriente a través del electrodo no debe causar reacciones electroquímicas que permitan la formación de químicos tóxicos alrededor del electrodo o activar el tejido a tal grado que se ocasione daño neuronal. El nivel de activación y la posición del electrodo se deben mantener bajo condiciones dinámicas, lo cual permite el movimiento del electrodo sin causar daño o evita una reacción inmune en el tejido circundante (Grill, 2001).

Los electrodos pueden ser colocados en áreas específicas para minimizar las fallas mecánicas. Los electrodos no deben provocar movimiento en las fibras nerviosas motoras.

Los electrodos deben detectar umbrales provenientes del nervio a estimular. El uso de corrientes de excitación baja, permite que se utilicen electrodos pequeños que incrementan la excitabilidad sin riesgo de corrosión. Estos requerimientos los hacen ser componentes ideales para implantarse como prótesis en el sistema neural.

Los electrodos controlan la activación de las fibras nerviosas y tienen un control más refinado de la contracción muscular.

Los electrodos para nervios se encuentran en contacto directo con el tejido neural y pueden ser colocados e implantados mediante un procedimiento relativamente sencillo. Requieren de una exposición quirúrgica abierta para identificar el tronco nervioso a estimular, la movilización del tronco nervioso y en algunos casos la identificación de componentes nerviosos (Grill, 2001).

Los electrodos deben ser seguros y estables, deben estar compuestos de materiales inertes, que sean pasivos cuando se encuentren sujetos a estimulación eléctrica; que no se deterioren. Los materiales utilizados para electrodos son: platino,

iridium y agujas de acero como conductores y como agentes aislantes goma de silicona, politetrafluoroetileno o polimida (Cuadro 6).

Para los estudios de conducción nerviosa en el nervio ciático se ha estimulado a través de un par de electrodos colocados en la raíz del nervio ciático. Pulsos eléctricos rectangulares de 0.05 ms de duración se han aplicado durante este tipo de pruebas electrofisiológicas los animales son colocados en una plancha caliente controlando la temperatura de la piel de la planta del pie manteniéndola por encima de los 32°C.

Métodos para evaluar la recuperación funcional en ratas.

Para evaluar diferentes estrategias en la reparación de nervios periféricos, el modelo animal más utilizado es la rata. Frecuentemente se presentan lesiones al nervio ciático donde los espacios se unen por diferentes materiales y la recuperación es medida por métodos funcionales morfológicos y eléctricos. Ya que los aspectos funcionales de la recuperación nerviosa son generalmente pobres, existe la necesidad de correlacionarlos con datos histomorfométricos y electrofisiológicos. (De Medinaceli y col., 1982; Munro y col., 1998).

Varios métodos de evaluación sensorial y de recuperación motora han sido diseñados en la investigación experimental. La mayoría de estos métodos incluyen la prueba de pinchado y mediciones de velocidad de conducción. El uso de la prueba de retracción no invasiva es un método confiable de evaluación nerviosa sensorial. En el análisis de patrón de caminado de la rata registran sus huellas, este método es empleado ampliamente para evaluar la recuperación motora después de daños en nervios periféricos (Dijkstra y col., 2000; Howard y col., 2000; Varejão y col., 2001).

Después de su primera descripción, el método de De Medinaceli (De Medinaceli y col., 1982) ha experimentado algunas modificaciones que se han enfocado en el

refinamiento de este método y en la cuantificación de algunos aspectos del patrón de las huellas. El método original de De Medinaceli utiliza papel fotográfico y se ha ido reemplazando por papel blanco y pintura soluble en agua diluida en pintura negra o polvo para huellas digitales. La modificación más reciente es el uso de papel xerox saturado con azul de bromofenol, el cual cambia de naranja a azul marino cuando entra en contacto con el pie hidratado de la rata. Algunos problemas se han originado, ya que las ratas mutilan sus dedos particularmente cuando se producen contracturas de las patas.

En la transección del nervio ciático se obtiene, en general, una buena recuperación en la respuesta de retracción después de estimular eléctricamente la planta del pie. Para la prevención de autotomía se pueden cubrir los miembros con una loción que generalmente es utilizada para desalentar que los niños se coman las uñas. Al aplicar esta loción se reduce en un 40 % la automutilación de los dedos (Sporel-Ozakat y col., 1996), cabe mencionar que la automutilación no ocurre en ratas de la cepa Lewis (Carr y col., 1992) y en ratas hembras disminuye (Bain y col., 2001). El ritmo de autotomía también puede ser utilizado para comparar diferentes técnicas de reparación o prótesis utilizadas para la regeneración de un nervio seccionado. Si la recuperación nerviosa es exitosa, menos automutilación será observada. Las deformidades de las patas y un caminado dañado da como consecuencia la imposibilidad de medir los parámetros de la huella digital, estas deformidades fueron descritas previamente como deformidades crónicas de la piel que permiten la inversión y eversión. Esto junto con contracturas de la articulación interfalángica dorsiflexión del tobillo resultan patrones de caminado que hacen imposible el análisis válido de caminado.

La recuperación de los nervios sensoriales puede ser evaluada mediante la respuesta de retracción después de aplicar una corriente eléctrica pequeña a la planta del pie. El estímulo puede aplicarse en la planta del pie utilizando un electrodo bipolar de cobre (con un diámetro de 1mm). La corriente debe incrementarse gradualmente de 0.1 mA a 1.0 mA máximo y nos dará como resultado una buena prueba para estimar la recuperación sensorial motora.

Cuadro 6. Comparación de electrodos extraneurales e intraneurales para nervios periféricos (Branner y col., 2000).

INVESTIGADOR	TIPO DE ELECTRODO	SITIO DE IMPLANTACIÓN	TIPO DE EXPERIMENTO	PARADIGMA DE ESTIMULACIÓN	CARGA POR FASE
Electrodos extraneurales					
Grill y col., 1996	Electrodo en espiral; 4 electrodos Pt tripolares .	Nervio ciático de gato.	Estimulación aguda.	4-5 mA, 10 μ s de duración, 0.5 Hz, contracción tetanica monofasica.	40-50 nC/fase.
Koller y col., 1992.	Electrodo epineural, aguja de acero.	Nervio ciático de rata.	Estimulación crónica.	400 μ A, 600 μ s de duración, 28 Hz, umbral de estimulación bifásica.	240 nC/fase.
Loeb y col., 1996.	Electrodos en espiral; 3 electrodos Pt.	Nervio peroneal, y sural superficial del gato.	Estimulación crónica y registro.	20-50 μ A, 100 μ s de duración, 1-3 Hz, umbral de estimulación bifásica.	2-5 nC/fase.
McNeal y col., 1989.	Electrodo en espiral, 3 electrodos bipolares Pt.	Nervio tibial de gato.	Estimulación aguda y crónica.	100-150 μ A, 200 μ s de duración, pulsos monofasicos individuales para el umbral de estimulación.	20-30 nC/fase.
Rozman y col., 1994.	Electrodos en espiral, 7 electrodos bipolares Pt.	Nervio peroneal común de perro.	Estimulación aguda.	1-10 mA, 50 μ s de duración, 20 Hz, contracción tetanica bifásica.	50-500 nC/fase.
Sweeney y col., 1995.	Electrodos en espiral, 12 electrodos tripolares.	Nervio ciático de conejo.	Estimulación aguda.	120-250 μ A, 100 μ s de duración, pulsos individuales monofasicos para el umbral de estimulación.	12-25 nC/fase.
Electrodos intraneurales					
Bowman y col., 1985.	Helice intraneural, Helice de alambre, aguja de acero.	Nervio tibial de conejo y gato.	Estimulación crónica.	70-200 μ A, 200 μ s de duración, 50 Hz, umbral de estimulación monofasica.	14-40 nC/fase.

Branner y col., 1996.	Electrodos intrafasciculares, de 25-100 agujas de silicon.	Nervio ciático de gato.	Estimulación aguda y registro.	10 μ A, 200 μ s de duración, de 1 a 2 Hz, pulsos bifásicos para estimular el umbral.	2 nC/fase.
Liang y col., 1991.	Electrodos intrafasciculares, de 16Au electrodos.	Nervio ciático de la rana.	Estimulación aguda.	5-15 μ A, 100 μ s de duración, pulsos bifásicos para estimular el umbral.	.5-15 nC/fase.
Nannini y col., 1991.	Electrodos intrafasciculares, alambres longitudinales.	Nervio ciático de gato.	Estimulación cronica y registro.	75 μ A, 50 μ s de duración, pulsos bifásicos para una contracción media maxima.	3.75 nC/fase.
O'Donovan y col., 1983.	Electrodos de raíz ventral, 12 microalambres.	Raíz ventral de la L5 del gato.	Estimulación cronica y registro.	5-10 μ A, 50 μ s de duración, pulsos bifásicos o monofásicos para umbral de estimulación.	.25-5 nC/fase.
Rutten y col., 1991.	Electrodos intrafasciculares; 12 electrodos de silicon.	Nervio común peroneal de rata.	Estimulación aguda.	2.5 mA, 10 μ s de duración 0.5 Hz, estimulación del umbral monofásico (6.5 mA; 90 % de activación).	.25-5 nC/fase.
Tyler y col., 1997.	Electrodos interfasciculares: contactos Pt en silicona	Nervio ciático de gato.	Estimulación aguda.	10 μ A, 100 μ s de duración, pulsos bifásicos para estimulación del umbral.	1 nC/fase.
Veltink y col., 1989.	Electrodos intrafasciculares; alambres de acero.	Nervio común peroneal de rata.	Estimulación aguda.	15 μ A, 60 μ s de duración, 70 Hz pulsos monofásicos.	.9 nC/fase.

Evaluación funcional de la regeneración de nervios periféricos en la rata (análisis de caminado).

A pesar de los recientes avances en las técnicas microquirúrgicas y en el entendimiento de la regeneración nerviosa, la recuperación funcional seguida de la sección del nervio periférico, continua siendo deficiente.

Los resultados clínicos de la reparación de nervios periféricos continúan en desacuerdo ya que se presenta pérdida de la función muscular, deterioro de la sensación y neuropatías de dolor. Los resultados funcionales son pobres después de la reparación de nervios periféricos, lo que ha motivado a entender mejor los eventos moleculares y celulares ligados a la reparación nerviosa (Varejão y col., 2001).

En las ciencias biológicas se han desarrollado modelos animales para estudios en la reparación de nervios periféricos. El modelo experimental de elección para muchos neurocientíficos, como se menciona anteriormente, continua siendo la rata. Esta provee de una fuente económica de tejido nervioso mamífero de un stock genético idéntico lo cual hace fácil de trabajar y estudiar. El nervio ciático muestra una capacidad equivalente para regenerar en ratas y primates no humanos. El nervio ciático de rata como modelo es utilizado para evaluar la función motora y sensorial al mismo tiempo. Los métodos tradicionales para evaluar la recuperación después de un daño del nervio periférico y su reparación son la electrofisiología y la histomorfometría, mientras que los empleados universalmente en experimentos de regeneración neural, no necesariamente se correlacionan con el retorno de las funciones sensoriales y motoras. Por lo tanto la extrapolación de los parámetros electrofisiológicos incluyen la velocidad de conducción nerviosa, la amplitud del pico del potencial de acción y el área del potencial compuesto lo que puede llevar a una interpretación inapropiada del retorno de la función. En 1982, De Medinaceli, reportó que el Índice funcional del ciático podría ser utilizado para evaluar la función total del miembro, incluyendo músculo, nervio y función articular en la rata lesionada. Desde que surgió este método, varios investigadores han utilizado el análisis del caminado para evaluar la recuperación funcional después de lesión al nervio ciático o después de aplicar algún método de reparación. Este método

Muchos investigadores han tomado el músculo tríceps sural como control y experimental y lo han pesado para obtener la masa muscular, aunque se ha observado tejido fibroso y adiposo en músculos denervados lo cual puede incrementar su peso. La medición de la fuerza de contractilidad muscular es un método sensible y real para evaluar la función de músculos. Por otra parte, provee de información no específica de la función motora integral.

Utilizando una vía confinada (el túnel) para analizar el caminado de la rata, algunos investigadores han desarrollado un método relativamente simple y novedoso para estudiar las enfermedades neurológicas en modelos animales que causan disfunciones en la locomoción. El análisis del patrón de caminado normal, en ratas, indica que la locomoción espontánea libre en animales es altamente consistente y fácilmente cuantificable. Un conjunto de pruebas conductuales, incluyendo análisis de caminado, provee de una técnica sensible y fiable para detectar, cuantificar y diferenciar varios síndromes atáxicos. Algunos investigadores han diseñado nuevos métodos para registrar y evaluar la función motora en el pollo (Varejão y col., 2001).

Como ya se menciona anteriormente, De Medinaceli y col., (1982), diseñaron un método cuantitativo para analizar la función del nervio ciático de la rata conocida como índice funcional del ciático (IFC). Para la pista de caminado el animal debe ser colocado en una vía con una terminal oscura. A todas las ratas se debe entrenar de 2 a 3 veces, ya que durante el entrenamiento las ratas se detienen continuamente para explorar el corredor pero después caminarán regularmente a la caja oscura. El papel blanco se corta de las dimensiones apropiadas y se coloca en el centro de la pista para que con la tinta o pintura que tenga en sus patas deje impresa la huella para su posterior análisis matemático (Varejão y col., 2001).

de evaluación tiene la ventaja de no ser un método invasivo, lo cual evita la interacción con el proceso regenerativo que se está llevando a cabo en el nervio lesionado (Varejão y col., 2001). Se han diseñado varios métodos de evaluación sensorial y motora en la investigación experimental de lesiones al nervio ciático debidas a la pérdida de la continuidad de mismo, estos métodos no necesariamente se correlacionan con el retorno de las funciones sensoriales y motoras. La mayoría de estos métodos incluyen histomorfometría, la prueba de pinchado (pinzas de Kelly), la prueba de electroestimulación (Meek y col., 1999, Young y col., 1940) y electrofisiología (Dellon y Mackinnon, 1989; Zeng y col., 1994, van Meeteren y col., 1997). Una vía para evaluar la recuperación de la función sensorial del nervio ciático es la prueba de retirada (reflejo de retracción), originalmente descrita por Young y Medawar en 1940. Dicha prueba se lleva a cabo por medio de la estimulación del talón con una corriente eléctrica para provocar un reflejo de retracción en el miembro lesionado (también llamada prueba de electroestimulación) (van Meeteren y col., 1997; Meek y col., 1997). La respuesta de retracción aplicando una pequeña corriente eléctrica en el miembro lesionado es un método fácil y simple de aplicar, evalúa la respuesta inmediata del retorno de la función sensorial. La técnica fue utilizada por primera vez por De Koning y col. en 1986 obteniendo buenos resultados, ellos mencionan que la aplicación local de pequeños estímulos eléctricos al pie de la rata es un método rápido no invasivo, fácil y muy preciso para evaluar el retorno de la función nerviosa sensorial después de lesión nerviosa (De Koning y col., 1986). Otras técnicas han sido descritas en el pasado, pero no fueron exitosas para evaluar las diferentes áreas en el talón de la rata (Bijlsma y col., 1981) o fueron demasiado subjetivas (Devor y col., 1979).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En trabajos anteriores se demostró que el biomaterial orgánico quitosana en combinación con esteroides facilitó la reparación del nervio ciático de la rata (Gómez y col., 1998), el nervio facial del hámster (Chávez y col., 1997) y el nervio ciático del perro (Rosales-Cortés y col., 1998). Sin embargo, en estos y otros trabajos donde se ha utilizado este biomaterial dentro el área biomédica, no se han encontrado referencias que indiquen si la tubulización del nervio seccionado es capaz de conducir electroestímulos y que características tiene la electroconducción en diferentes etapas de la reparación del nervio ciático de la rata axotomizada y tubulizada con quitosana.

Por sus propiedades físicas, la quitosana cuenta con la posibilidad de ser una prótesis capaz de conducir estímulos entre los muñones proximal y distal, ya que es una de las condiciones necesarias para que se reestablezca la actividad motora y sensitiva en el nervio denervado.

HIPÓTESIS

1. La tubulización con quitosana del nervio ciático axotomizado es capaz de mantener la comunicación eléctrica entre ambos muñones, facilitando la recuperación motora y sensitiva del miembro lesionado, superando a la prótesis de silicona en las mismas condiciones.
2. La comunicación eléctrica del nervio ciático reparado por axotomía-tubulización con quitosana es mejor que la comunicación eléctrica del nervio ciático reparado por axotomía-tubulización con silicona a los 30 y 60 días poslesión en las mismas condiciones.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades de electroconducción de la quitosana y silicona aplicadas en la axotomía-tubulización del nervio ciático de la rata a los 10, 30 y 60 días postlesión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si la prótesis de quitosana o silicona son capaces de conducir electroestímulos a los 10, 30 y 60 días postlesión entre ambos muñones.
- 2.- Determinar la velocidad de conducción del estímulo a través de la prótesis de quitosana y silicona a los 10, 30 y 60 días postlesión.
- 3.- Determinar el voltaje del estímulo entre los muñones proximal y distal en ambos grupos a los 10, 30 y 60 días postlesión.
- 4.- Observar macro y microscópicamente la capacidad de regeneración del nervio ciático axotomizado-tubulizado con quitosana o silicona.
- 5.- Evaluar la sensibilidad del miembro lesionado mediante la prueba de retracción en ambos grupos a los 10, 30 y 60 días postlesión.
- 6.- Evaluar el Índice funcional del nervio ciático de la rata a los 10, 30 y 60 días postlesión.

OBJETIVOS TÉCNICOS

- 1.- Selección de ratas macho, adultas jóvenes con un peso de 250 a 300 gr.
- 2.- Habituar los animales una semana antes de la intervención quirúrgica al área donde permanecerán durante toda la prueba.
- 3.- Selección de los animales para formar dos grupos: I - tubulización con quitosana y II - tubulización con silicona (n total = 36, por grupo n = 18, se dividieron en subgrupos con una n = 6).
- 4.- Entrenamiento de los animales en el túnel de deambulación para evaluar el IFC (Bain y col., 1989), a cada uno de los animales al finalizar el periodo experimental.
- 5.- Realizar la axotomía-tubulización a cada uno de los animales, con las prótesis de quitosana o silicona previamente manufacturadas.
- 6.- Evaluar a todos los animales la sensibilidad del miembro lesionado al finalizar el periodo experimental mediante la respuesta de retracción del miembro.
- 7.- Evaluación electrofisiológica para determinar el voltaje y la velocidad de conducción del estímulo entre los muñones proximal y distal (a través de las prótesis) en ambos grupos a los 10, 30 y 60 días postlesión.
- 8.- Perfusión intravascular de los animales a los 30 y 60 días postlesión y obtención de los nervios reparados para su proceso histológico y análisis microscópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso de 250-300 grs.

Se entrenó a las ratas para caminar por el túnel de deambulaci3n, 3-5 repeticiones por rata para valorar el IFC.

Grupo I (n=18)
Axotomía-tubulizaci3n del nervio ciático con Quitosana.

Grupo II (n=18)
Axotomía-tubulizaci3n del nervio ciático con Silicona.

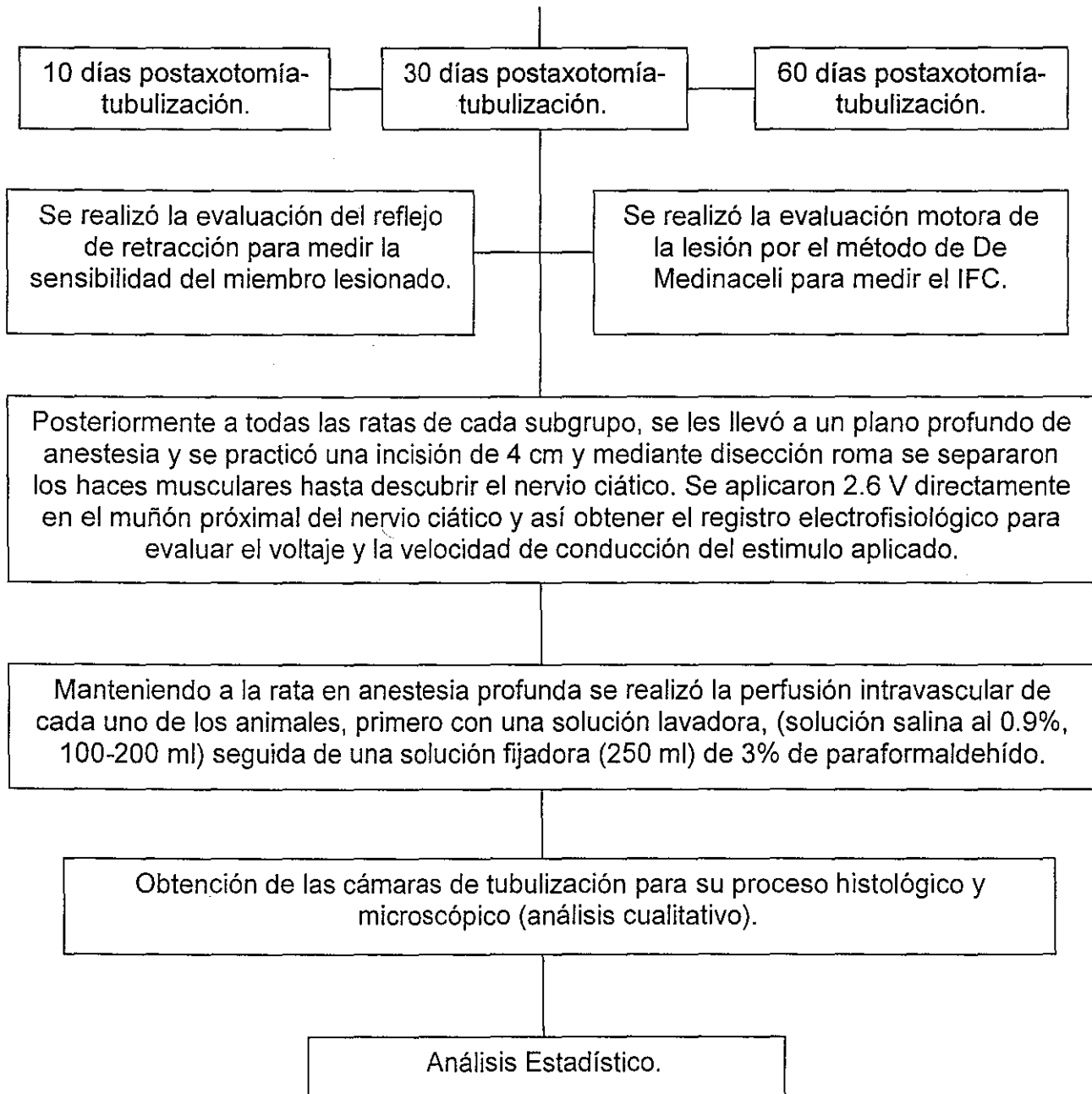
En el día cero todos los animales recibieron una inyecci3n intraperitoneal de pentobarbital s3dico (50 mg/kg) para alcanzar un plano profundo de anestesia, posteriormente se colocaron en decúbito lateral derecho para exponer la cara dorsal del muslo izquierdo.

Se les practicó una incisi3n en la piel de 4 cm y mediante disecci3n roma se separaron los haces musculares hasta descubrir el nervio ciático.

Se les realizó axotomía-tubulizaci3n del nervio ciático a nivel del tercio superior del muslo y se reconstruyó la herida quirúrgica.

En el periodo de recuperaci3n se aplicó 20,000 UI de penicilina benzatínica (dosis única).





MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ratas macho adultas de la cepa Wistar entre 250 y 300 gramos, se dividieron en 2 grupos de 18 animales, que a su vez se dividieron en subgrupos de $n=6$ (subgrupo IA 10 días, IB 30 días, IC 60 días para tubulización con quitosana; IIA, IIB, IIC para tubulización con silicona). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de bioterio, con agua y alimento balanceado *ad libitum*, con ciclos de 12 horas luz, 12 horas de oscuridad y humedad relativa del ambiente. Al primer grupo de animales se le implantó una prótesis de quitosana y al segundo grupo se le implanto una prótesis de silicona en el miembro posterior izquierdo. Una semana antes de provocar la lesión, se entrenó a las ratas para caminar en un túnel de deambulación, se realizaron 5 repeticiones en el caminado completo del túnel.

Preparación de las prótesis de quitosana. Se utilizaron caparazones de camarón (*Penaeus spp.*) cocido que fueron deshidratados y desecados a 60°C durante 48 horas en una estufa, para ser pulverizado. Posteriormente se utilizaron 200 gramos del material pulverizado y se agregaron 400 ml de hidróxido de sodio 2 M, agitando durante 3 horas a una temperatura de 50–70°C para desnaturalizar y precipitar proteínas. A continuación, la mezcla se lavó en cinco ocasiones con tampón tris 0.1 M con un pH de 8, durante 20 minutos cada vez, después se procedió a desmineralizar la quitina digiriéndola con 200 ml de ácido clorhídrico 1N, por espacio de 2 horas y nuevamente la mezcla se lavó cinco veces por 20 minutos con solución tampón tris 0.1 M con un pH de 8. La mezcla se secó durante 48 horas a una temperatura de 60°C y el material desecado resultante se deacetiló durante 5 horas a $100 \pm 20^\circ\text{C}$ adicionando

400 ml de hidróxido de sodio 2 M. Finalmente, el material se puso a secar durante 48 horas a 60°C obteniendo un producto final de hojuelas de quitosana blancas y delgadas.

Estas hojuelas se mezclaron en ácido acético al 3% pH 4 con agua destilada. Una vez diluida, se vaciaron en moldes de teflón y se precipitaron con una solución del 5% de hidróxido de sodio, haciendo lavados con agua bidestilada para eliminar los restos de hidróxido y después de varias capas sobrepuestas una a una, los tubos se secaron a una temperatura de 45 a 60°C durante 24 horas, obteniendo prótesis de aproximadamente 1.5 cm. Una vez que se secó la quitosana y se obtuvieron las prótesis que fueron cortadas a 10 mm de longitud para someterlas a esterilización mediante rayos de luz ultravioleta durante 24 horas, posteriormente se almacenaron en alcohol isopropílico.

Axotomía-Tubulización. Todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg. de peso) para alcanzar un plano de anestesia profunda. El animal anestesiado se colocó en decúbito lateral derecho para exponer la cara dorsal externa del muslo izquierdo, se rasuró la zona y se aplicó un antiséptico, para luego practicar una incisión en la piel de 4 cm.

Mediante disección roma, se separaron los haces musculares sin seccionarlos, hasta descubrir el nervio ciático, éste se liberó de sus tejidos circundantes y se seccionó un segmento de 5 mm a nivel del tercio superior del muslo y después se sustituyó con el tubo de quitosana y silicona respectivamente. Para evitar la pérdida del contenido axonal de ambos segmentos, inmediatamente después de la axotomía se insertaron 2.5 mm del muñón axónico proximal y distal respectivamente en los extremos del tubo

(tubos de quitosana o silicona de 10 mm de longitud con 1 mm de espesor y 2 mm de diámetro interno) ambos muñones del nervio se fijaron al tubo mediante 2 puntos de sutura epineural con sutura Nylon Ethilon 10/0 (Polyamida 6 Monofilamentos Negro, Ethicon) a 180° uno de otro, para formar así una cámara de crecimiento axónico de 5 mm de longitud (Figura 18). Las prótesis antes de su colocación, se preincubaron durante 2 hrs a 37° C en solución salina al 0.9%.

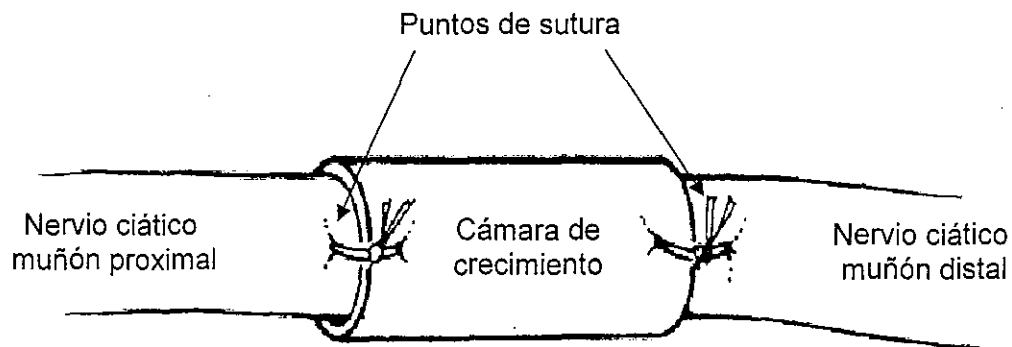


Figura 18. Tubulización del nervio.

La herida quirúrgica se reconstruyó por planos con catgut crómico 4-0 y puntos simples separados en piel con nylon 2-0. Los animales se recuperaron en un ambiente tibio (tapete térmico a 37°C) antes de regresarse a sus condiciones habituales de bioterio. Al finalizar la cirugía se aplicó una inyección única, intramuscular profunda de una solución de penicilina benzatínica de 20,000 UI para prevenir una posible infección durante el periodo postoperatorio. Diariamente se realizó un examen clínico de cada animal. Diez días después de la axotomía, se realizó la primera evaluación de la

evolución de la lesión mediante observación de la capacidad de locomoción del animal evaluando el Índice funcional del ciático (Bain y col., 1989) prueba que se realizó a todos los animales al finalizar su periodo experimental 10, 30 y 60 días postlesión respectivamente.

Evaluación motora, Índice funcional del nervio ciático. Para este propósito se fabricó una caja de madera, la cual tiene 10 cm de ancho, 140 cm de largo, 11 cm de alto y una cubierta superior del mismo material al final del túnel, además de una puerta de entrada y otra de salida. previamente el piso fue cubierto de papel blanco xerográfico (Papel Bond Precisión, blanco, especial para copias xerográficas y plotter, Kronaline, S.A. de C.V.) cortado de las dimensiones adecuadas, en el cual las ratas dejaron impresa la huella de la extremidad posterior izquierda, ya que se les impregno de tinta negra en pasta para protectoras de cheque y foliadores (Protectocheck®, Sandford de México, S.A. de C.V.). Posteriormente se analizaron las huellas que quedaron impresas sobre el papel (se realizaron 2 ensayos de cada uno de los animales lesionados para asegurar un buen registro), se invalidaron todas aquellas huellas con manchas irregulares y en las que hubo deformación de la impresión por el arrastramiento del miembro caudal [para medir el IFC, se utilizó el método de De Medinaceli (Bain y col., 1989)]. La reparación del nervio ciático axotomizado de la rata se indujo mediante la técnica de tubulización con prótesis bioactivas de quitosana y prótesis sintéticas de silicona. Después de la axotomía-tubulización de 5 mm de nervio ciático se determinó la conducción del impulso nervioso a través de la cámara de crecimiento axónico entre el muñón proximal y el distal mediante una técnica electrofisiológica para valorar el voltaje

y velocidad del impulso, decidimos usar un grupo con prótesis de silicona para poder comparar la eficiencia de la prótesis de quitosana en la axotomía tubulización del nervio ciático de la rata, además para observar la recuperación de las funciones motoras.

De las huellas se analizaron los siguientes parámetros:

- Distancia del talón al dedo medio. *Longitud de la huella (PL)*
- Distancia del 1°- 5° dedo. *Desplazamiento de dedos (TS)*
- Distancia entre el 2°- 4° dedo. *Desplazamiento del dedo intermedio (IT)* (Figura 19).

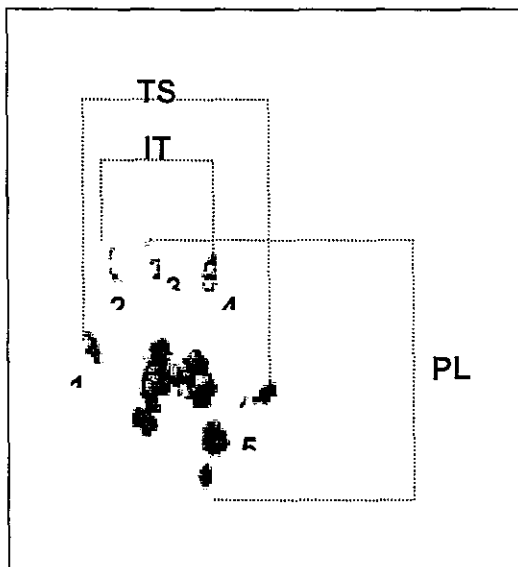


Figura 19. Parámetros analizados en la evaluación del Índice Funcional del Ciático, TS= desplazamiento del 1 al 5 dedo, IT= desplazamiento del 2 al 4 dedo, PL= distancia del talón al dedo medio.

$$SFI = -38.3 (EPL - NPL) + 109.5 (ETS - NTS) + 13.3 (EIT - NIT) - 8.8$$

- **SFI:** Índice funcional del ciático (Sciatic functional index)
- **IT:** Desplazamiento de los dedos intermedios (intermediary toe spread)
- **PL:** Longitud de la huella (print length)
- **TS:** Desplazamiento del dedo del pie (toe spread)
- **N:** Normal
- **E:** Experimental

Figura 20. Fórmula de De Medinaceli modificada por Bain (1989) para calcular el Índice funcional del nervio ciático.

Para fines de interpretación se consideró como referencia los valores promedio de las huellas obtenidas de la pierna izquierda antes de ser lesionada, ellos se compararon con los resultantes después de la axotomía-tubulización a los 10, 30 y 60 días postlesión respectivamente. Se aplicó la fórmula de De Medinaceli (Bain, 1989) para calcular el IFC sobre una escala de 0 a -100. Cero representa función normal y -100 total incapacidad (Lowdon y col., 1988; Bain y col., 1989; Johnston y col., 1991; Shen y col., 1995), (Figura 20). Se invalidaron aquellas huellas que presentaron deformación a causa de formación de contracturas, engarruñamiento, dorsiflexión, inversión o eversión del tobillo, autotomía, o manchas por arrastramiento del miembro caudal sobre la huella con la tinta fresca (Dellon y col., 1989).

Prueba de sensibilidad. Para esta prueba se utilizó una caja de descargas eléctricas convencional a la cual se le adaptaron dos electrodos. Para su ejecución, un electrodo se colocó en uno de los espacios interdigitales (entre el dedo 3 y 4), el otro electrodo se colocó en la región del tobillo (articulación tibio-tarsiana) por el lado anterior de la parte superior de la pata de la rata esta prueba cualitativa y no invasiva nos permitió observar la recuperación de la función sensorial mediante la respuesta de retracción del miembro lesionado al recibir una descarga eléctrica (Chamberlain y col., 2000; Meek y col., 1999; Young y col., 1940).

Esta prueba se realizó a todos los individuos al finalizar su periodo experimental 10, 30 y 60 días postlesión, cada uno de los animales recibió una descarga eléctrica de 6 V, que se aplicó después de que el animal pasó por el túnel de deambulación.

Técnica de electroestimulación y registro. Para esta prueba se utilizó un electroestimulador computarizado integrado por una tarjeta múltiple de ganancia

programada (PCLS_812PG de 16 canales) y un electrodo de acero inoxidable en forma de gancho que nos permitió aplicar estímulos superficiales sobre el segmento previo a la tubulización del nervio. Este electrodo sostuvo al nervio por su cara muscular interna. Al mismo tiempo, en otro punto posterior al segmento tubulizado del nervio, se colocó el electrodo de registro con las mismas características y sujeto de su cara muscular interna (Figura 21). Estos electrodos estuvieron conectados a un amplificador 7DA (Grass polygraph D.C. Driver Amplifier), que regresó la señal de nuevo a la computadora. Los músculos que rodean al nervio fueron aislados mediante un recubrimiento de vaselina para evitar interferencia de los mismos (la distancia entre el electrodo de estimulación y el de registro fue de 1 cm). Este equipo nos permitió dar una serie de 10 estímulos de 2.6 V con intervalos de 300 ms entre un estímulo y otro (refracción). Estos estímulos fueron dados de forma automática. Finalmente, el programa de la tarjeta mencionada grafico los datos en forma de pantalla de osciloscopio, esto nos permitió analizar las características del voltaje registrado después de la aplicación de un estímulo de 2.6 Volts sobre el nervio ciático de la rata. Mediante la fórmula: distancia entre los electrodos/tiempo, obtuvimos la velocidad de conducción en m/s. Esta técnica se aplicó a los nervios intactos, que en este caso fueron los nervios del miembro contralateral (nervio ciático de la extremidad derecha) y también a los nervios axotomizados y tubulizados (extremidad izquierda) (Kobayashi y col., 1997).

Para ambos registros se utilizaron los mismos electrodos y se mantuvo de igual manera la distancia y posición de los electrodos en cada nervio, esto se realizó de la siguiente manera:

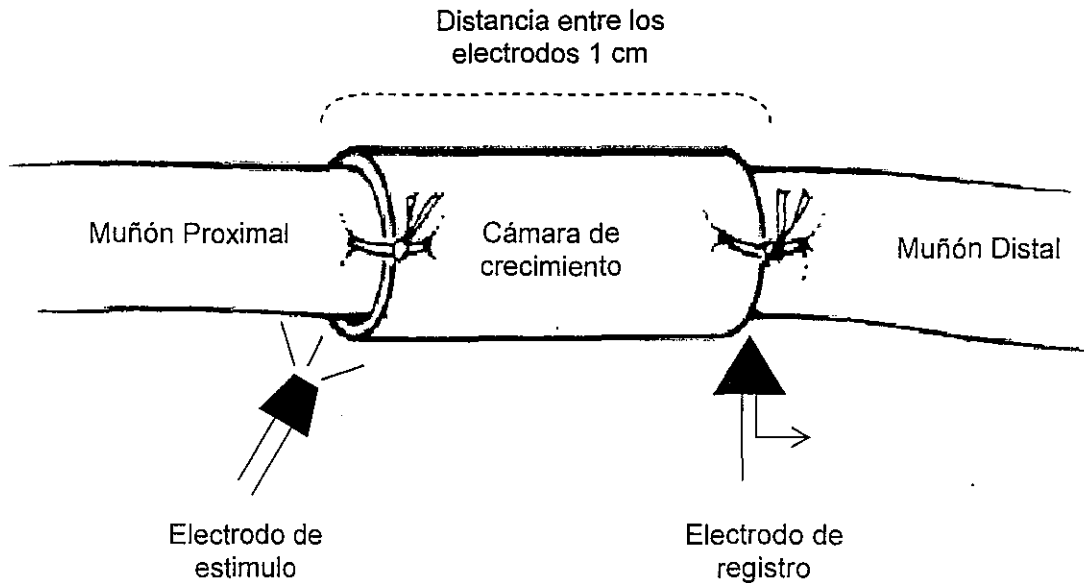


Figura 21. Estimulación electrofisiológica del nervio.

A través del estudio, todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas y siguiendo las recomendaciones de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el manejo y la utilización de animales de laboratorio para experimentación.

Estudio Histológico. De la zona distal del nervio reparado, a intervalos de 2mm, se obtuvieron fragmentos de tejido con 1mm/lado, fueron posfijados durante 1 hora en tetraóxido de osmio (Sigma O-5500) al 1% amortiguado en fosfatos 0.1 M, pH 7.4, y se deshidrataron mediante cambios crecientes de alcohol (Sigma R-8382) y acetona (Sigma A-4206) (2 x 30 minutos en agitación), los tejidos deshidratados fueron preincludidos en mezclas de resinas epóxicas (SPI 02660-AB); 20 minutos en una mezcla de resinas y solvente en proporción 1:3, seguida de una mezcla de Epon y solvente 1:1 (20 minutos en agitación), y una mezcla 3:1 de Epon y solvente (30 min),

después de esto los tejidos fueron sumergidos durante 1 hora en resina pura, se hizo un cambio y se dejaron durante 12 horas a temperatura ambiente con movimientos suaves. Finalmente los fragmentos de tejido fueron incluidos en cápsulas Been (16659-1 Polysci), antes de polimerizar se orientaron para regularizar la cara de corte y se dejó polimerizar la resina durante 48 horas a 60° C. De los tejidos incluidos en resinas, se hicieron cortes (con cuchillas de vidrio) de 773 nm de espesor en un ultramicrotomo Sorvall y se tiñeron con azul de toluidina (Sigma T-0394). El tejido obtenido fue analizado estructuralmente mediante microscopía de luz en un analizador de imágenes (Leica Qwin) para identificar componentes celulares (análisis cualitativo).

Análisis Estadístico. Para la evaluación del índice funcional del nervio ciático se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para grupos independientes. Los datos electrofisiológicos fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza aleatorizado (ANOVA) de una sola vía, seguido en su caso de pruebas de *Tuckey*. Siempre utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Wayne., 1996).

RESULTADOS

En la elaboración de las prótesis de quitosana no hubo complicación alguna, ya que fueron manufacturadas de acuerdo a las necesidades del estudio. Las prótesis de silicona se obtuvieron del material silicona con las dimensiones adecuadas. Ambas prótesis fueron seccionadas a una longitud adecuada y se mantuvieron estables después de fijarlas a los muñones (proximal y distal) del nervio axotomizado (Figura 22). Con los cuidados postoperatorios necesarios las heridas quirúrgicas en las ratas evolucionaron satisfactoriamente a los 10 días, aproximadamente. El aspecto de la herida se fue normalizando iniciando un proceso desinflamatorio durante la primer semana en ambos grupos de animales (quitosana y silicona). Se observó una cicatriz organizada en los bordes de la herida, se retiraron las suturas y la piel finalizó su periodo de cicatrización. No se observó posteriormente inflamación de la herida ni signos de dolor a la presión, lo que indica que las prótesis fueron bien toleradas por los animales y que el manejo quirúrgico y posquirúrgico produjo traumatismo mínimo. En todos los grupos experimentales se observó una incapacidad motora, así como una claudicación muy marcada del miembro lesionado en los primeros días de recuperación posteriores a la cirugía. En este período, el miembro lesionado de todos los animales se flexionaba al momento de caminar durante la prueba del índice funcional del nervio ciático. El engarruñamiento de la extremidad lesionada se hizo evidente a los 30 días poslesión en el 50% de las ratas que fueron implantadas con tubos de silicona. Además de que algunos animales arrastraban el miembro lesionado al momento de caminar (Figura 23). Esta situación condujo a que se presentara flexión de los metatarsos y falanges, lo que ocasionó el arrastre de los dedos.

A 30 días después del implante de las prótesis se recuperó en un 10% la función normal de los animales que se sometieron a axotomía-tubulización con las prótesis de quitosana y silicona.

Posteriormente se observó una mejoría del caminado llegando a tener una recuperación en promedio de un 20 a 30% a los 60 días posteriores a la axotomía-tubulización con ambas prótesis. Sin embargo, el porcentaje de recuperación no fue suficiente para poder evidenciarlo a simple vista, ya que los animales apoyaban el miembro lesionado en el túnel de caminado para la prueba del índice funcional, pero presentaban incapacidad motora y una deficiente coordinación de la extremidad lesionada.

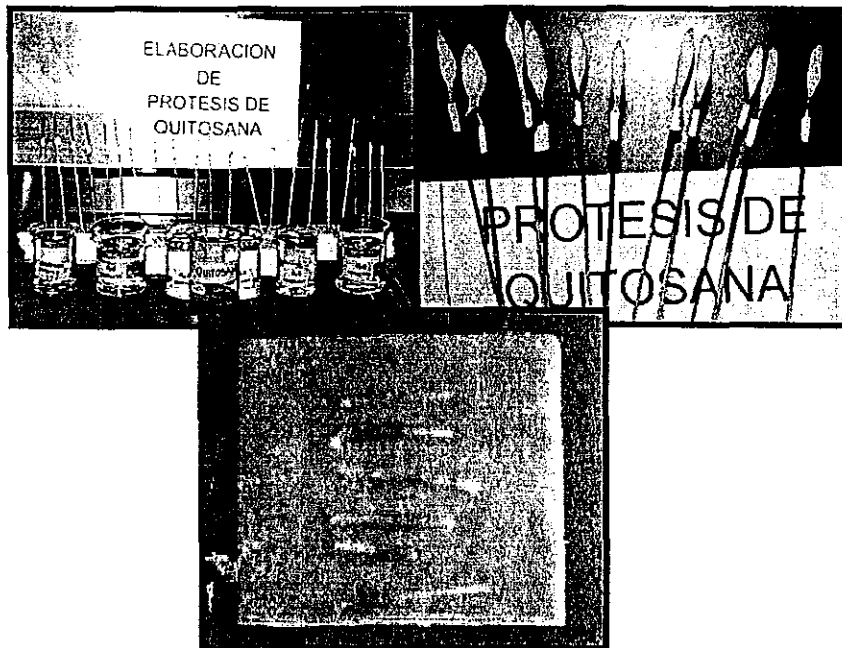


Figura 22. Elaboración de prótesis de quitosana.

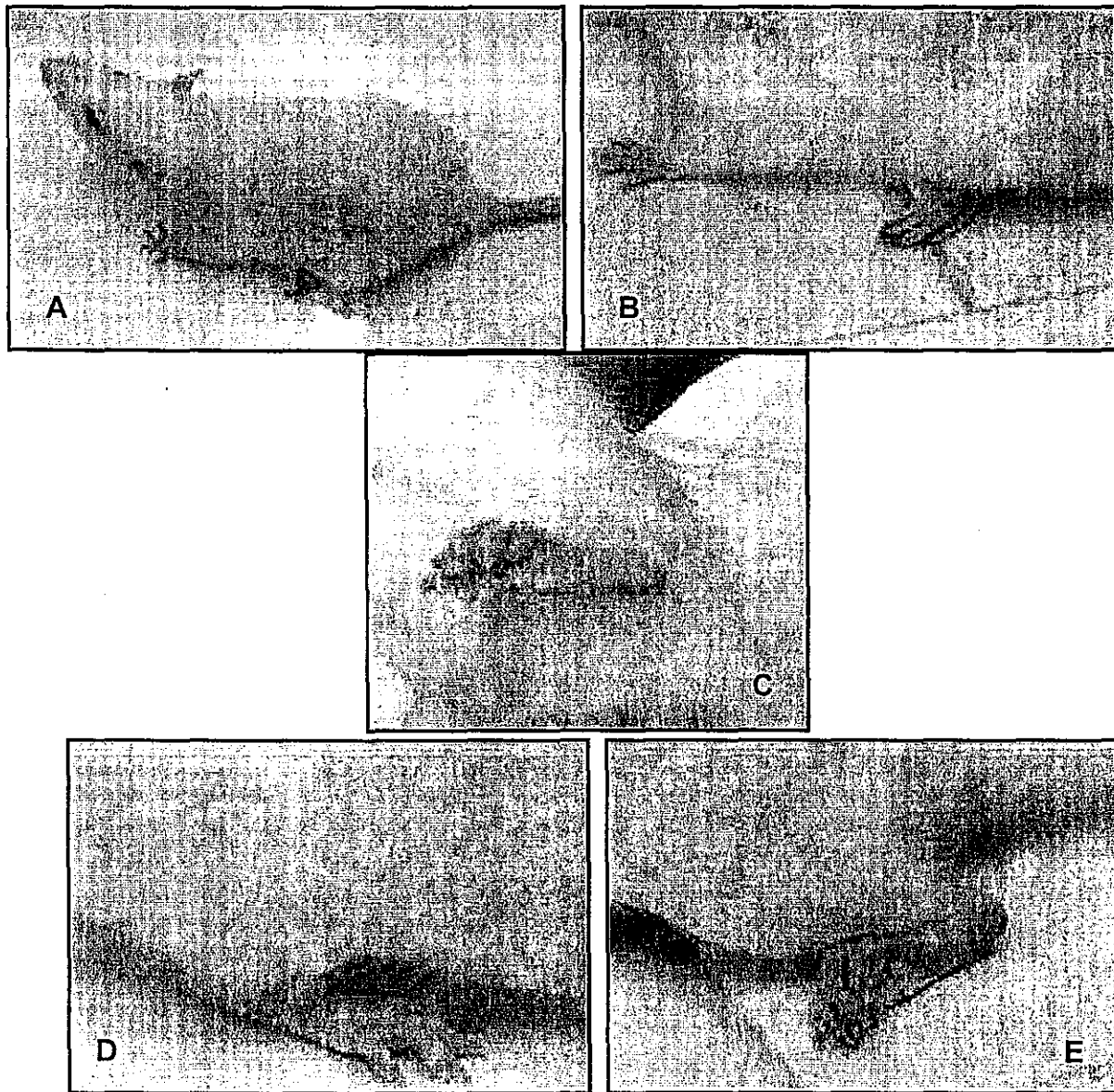


Figura 23. Observación clínica de la rata lesionada tras axotomía-tubulización. A. Rata lesionada tras axotomía tubulización, en B, observamos el engarramiento del miembro lesionado; en C, la presencia de contractura en las falanges; D, miembro contralateral normal, nótese la extensión de los dedos y el apoyo plantar del miembro y en E, nótese la presencia de inversión del miembro lesionado y el engarramiento de las falanges.

La sensibilidad del miembro lesionado fue la que presentó una mejor recuperación si la comparamos con la actividad motora, ya que los animales presentaban una evidente sensibilidad. Esto se demostró aplicando dos pruebas para evaluar la sensibilidad, la primera se realizó aplicando presión en el espacio interdigital con unas pinzas de kelly y observando la retracción del miembro al momento de ejercer dicha presión. Para corroborar la prueba anterior, se llevo a cabo la segunda evaluación, aplicando una descarga eléctrica de 6 volts (Figura 24 y 25) en el espacio interdigital. Los animales que presentaron retracción del miembro coincidieron con los animales de la prueba de presión en el espacio interdigital.

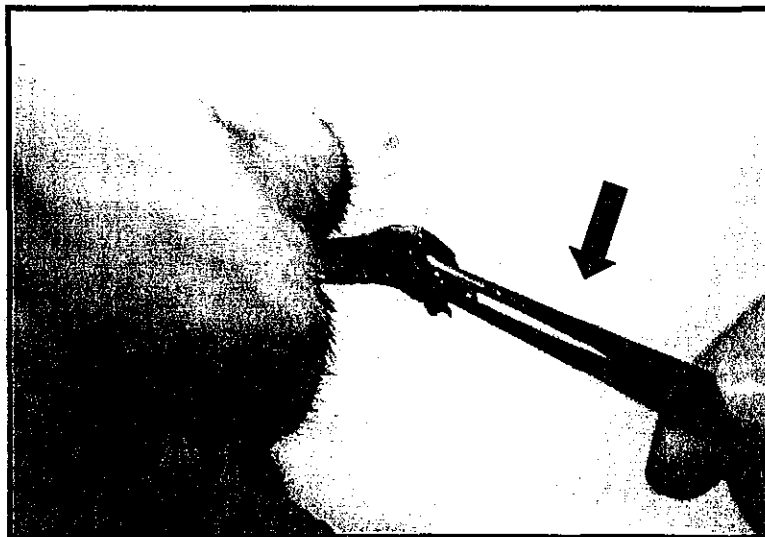


Figura 24. Evaluación de la sensibilidad del miembro lesionado. Fotografía que muestra pinzas de kelly (flecha) aplicando presión en el espacio interdigital de la rata.



Figura 25. Evaluación de la sensibilidad del miembro lesionado. Aplicación de una descarga eléctrica (flecha) en el miembro lesionado.

Análisis macroscópico de la regeneración del nervio ciático.

Al finalizar el tiempo programado para el estudio (10, 30 y 60 días), se procedió al sacrificio de los animales que fueron axotomizados y tubulizados para extraer las cámaras de crecimiento y observar el tejido reparado -verificando la presencia o ausencia de un cable de crecimiento entre ambos muñones dentro de la cámara. A los 10 días dentro de las cámaras de quitosana y silicona se encontró una acumulación de fluido oscuro, amarillento, sin la presencia de un cable de crecimiento nervioso. A los 30 y 60 días al separar los músculos que cubren el nervio ciático, se encontraron las prótesis de silicona y quitosana cubiertas por tejido conectivo en su superficie, al extraer

el tejido circundante se procedió a verificar el contenido de las cámaras de crecimiento, dentro de ellas se encontraron estructuras similares; los conos de crecimiento proximal y distal, la unión de los muñones proximal y distal por medio de un cable de crecimiento lineal, regular y organizado; pero de un calibre menor al nervio normal (Cuadro 7 y, Figuras 27 y 28).

Cuadro 7. Formación de un cable de crecimiento a los 10, 30 y 60 días post-axotomía. X= ausente, ✓= presente.

DÍAS TRATAMIENTO	TUBULIZACIÓN QUITOSANA	TUBULIZACIÓN SILICONA
10 (n=6)	X	X
30 (n=6)	✓	✓
60 (n=6)	✓	✓

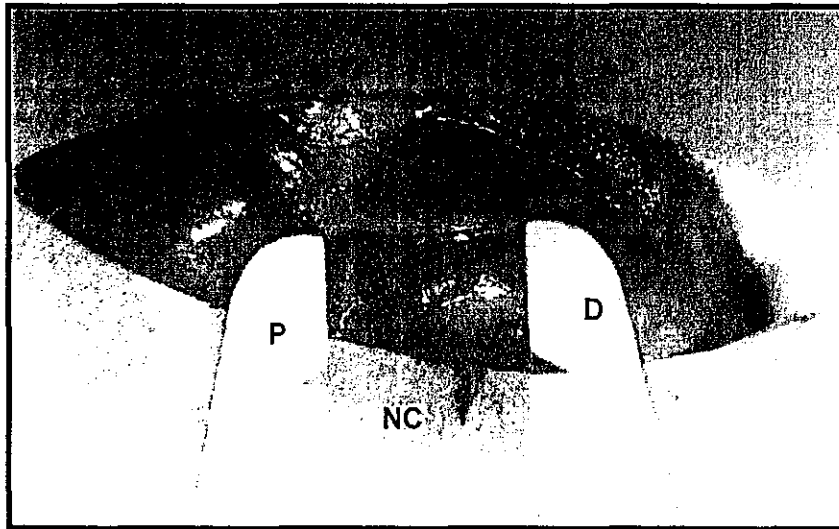


Figura 26. Nervio ciático de rata (NC) pre-axotomía. Obsérvese el extremo proximal (P), el distal (D) y la conformación lineal del nervio.

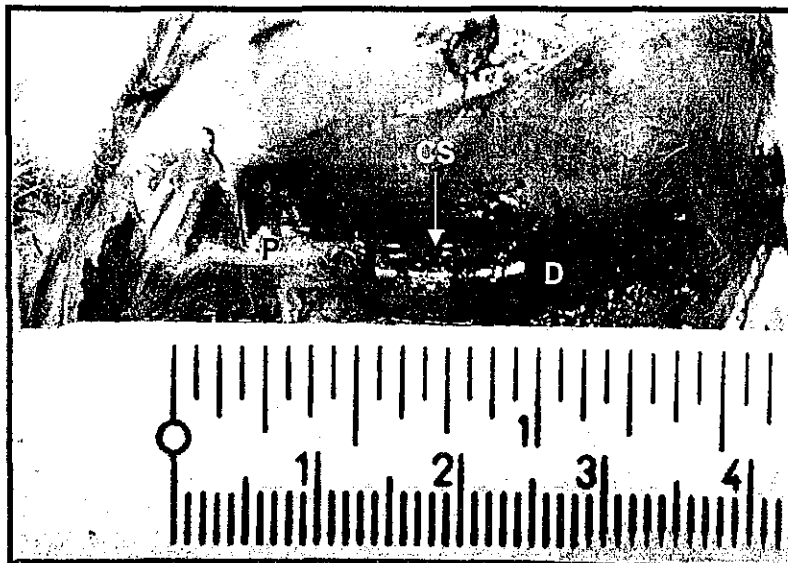


Figura 27. Nervio ciático de rata axotomizado y tubulizado. Cámara de silicona (CS) implantada en el nervio ciático de la rata. Muñón proximal (P) y muñón distal (D).

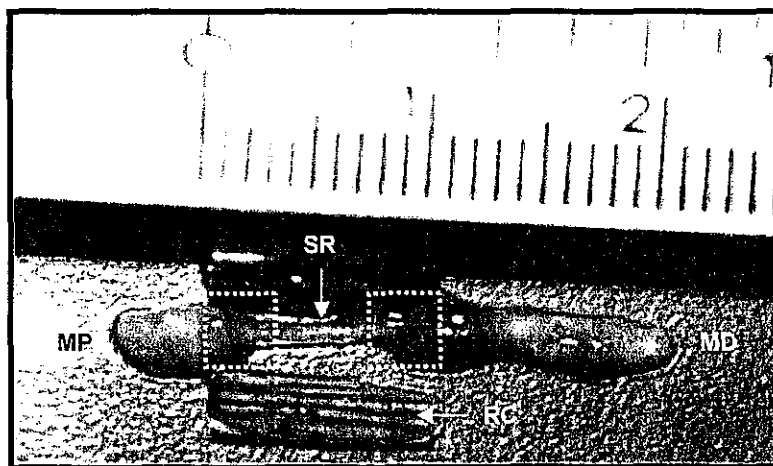


Figura 28. Cable de crecimiento. Se muestra la regeneración del nervio ciático tubulizado (SR) con quitosana a los 60 días postlesión y la conexión entre el muñón proximal (MP) y el muñón distal (MD), así como los conos de crecimiento proximal y distal (cuadros punteados).

Análisis cualitativo con microscopía de luz.

A los 30 y 60 días postaxotomía-tubulización se observó en todos los animales un crecimiento a través de la cámara de crecimiento axónico. Sin embargo, para cerciorarnos de si la estructura tisular observada dentro de la cámara de crecimiento era o no tejido nervioso, se realizó un estudio de la anatomía microscópica del segmento regenerado, con el propósito de corroborar si el crecimiento organizado era en realidad tejido nervioso o solo tejido conectivo vascularizado.

Análisis histológico del nervio control.

El tronco nervioso observado en el análisis con microscopía de luz en cortes transversales mostró la estructura típica de un nervio periférico: un cilindro de tejido de soporte en cuya estructura forman parte cientos de pequeños cilindros (fibras

nerviosas). Además se distinguieron las principales zonas de compartimentalización típicas de un nervio, distinguiéndose tres estructuras principales, el epineuro; que rodea a los fascículos, el perineuro; que cubre la totalidad de cada fascículo (o agrupamiento de axones) y el endoneuro; estructura que envuelve individualmente cada axón (Figura 29).

Análisis histológico del nervio tubulizado con quitosana y silicona.

El análisis del crecimiento nervioso, a los 30 días, demostró que el nervio aún se encontraba en proceso de formación y maduración, aún no se distinguían fibras nerviosas mielinizadas, se observó la presencia de un perineuro y endoneuro primitivo que iniciaba a madurar y envolver a los axones en proceso de mielinización y al minifascículo, respectivamente. También se observó el inicio de una organización minifascicular en cada tratamiento (Figuras 30 y 31). En general, en los crecimientos nerviosos de los animales axotomizados y tubulizados a los 60 días con los tratamientos con quitosana y silicona denotaron una estructura histológica similar a la de un nervio normal, pero con un diámetro de menor tamaño, ya que al compararlos se identificaron las principales zonas de compartimentalización de un nervio normal. Entre el epineuro y perineuro se observaron células del endotelio vascular, axones mielinizados y vasos sanguíneos, indicativos de estadios regenerativos de nervios que han sufrido lesión (Figuras 32, 33 y 34).

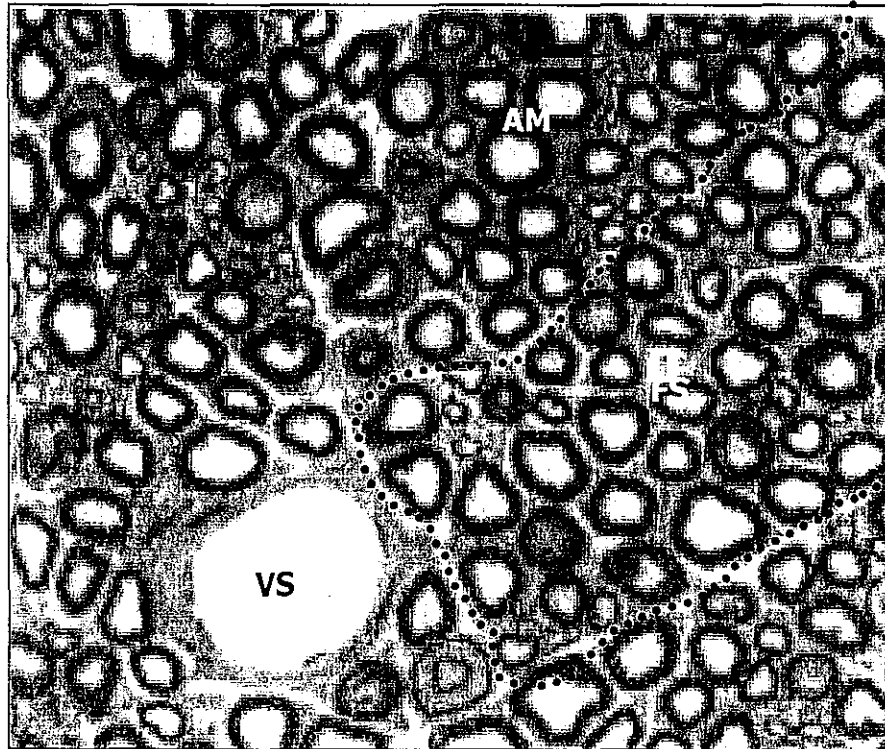


Figura 29. Control. Corte transversal del nervio ciático de rata, teñido con azul de toluidina. Se observa una fotografía de microscopía de luz, del nervio ciático. Se observan fascículos [(línea punteada (FS)], axones mielinizados (AM) y vaso sanguíneo (VS).

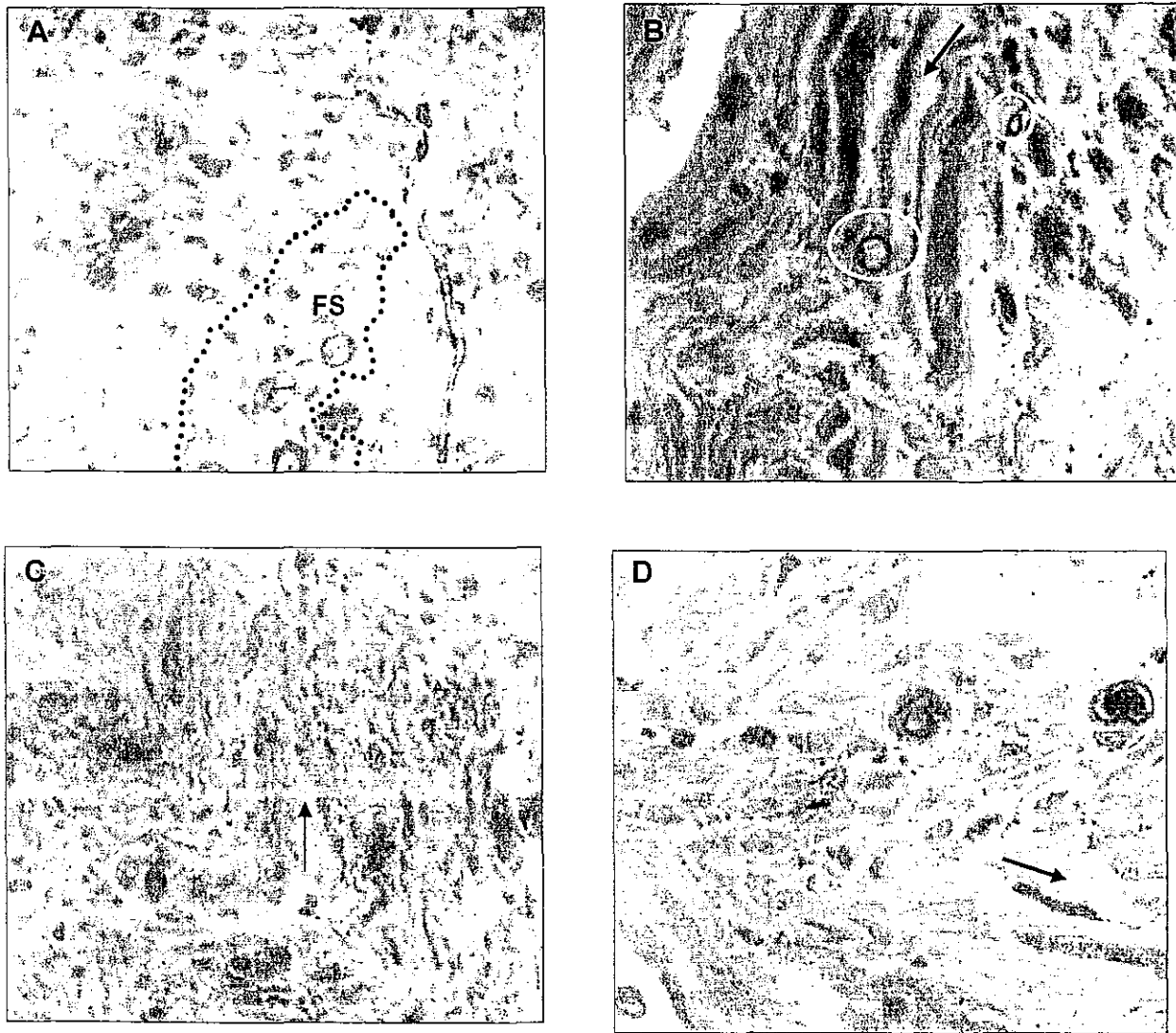


Figura 30. Tratamiento con Quitosana a los 30 días post-axotomía. Corte transversal del nervio ciático de rata, teñido con azul de toluidina. Se observan fotografías de microscopía de luz, del nervio ciático en regeneración. En la figura A (40 x) y B (100x) se observan fascículos en formación (línea punteada FS) y axones en vías de mielinización (circunferencia). En la figura C (40x) y D (100x) se denota un endoneuro primitivo en formación (flecha).

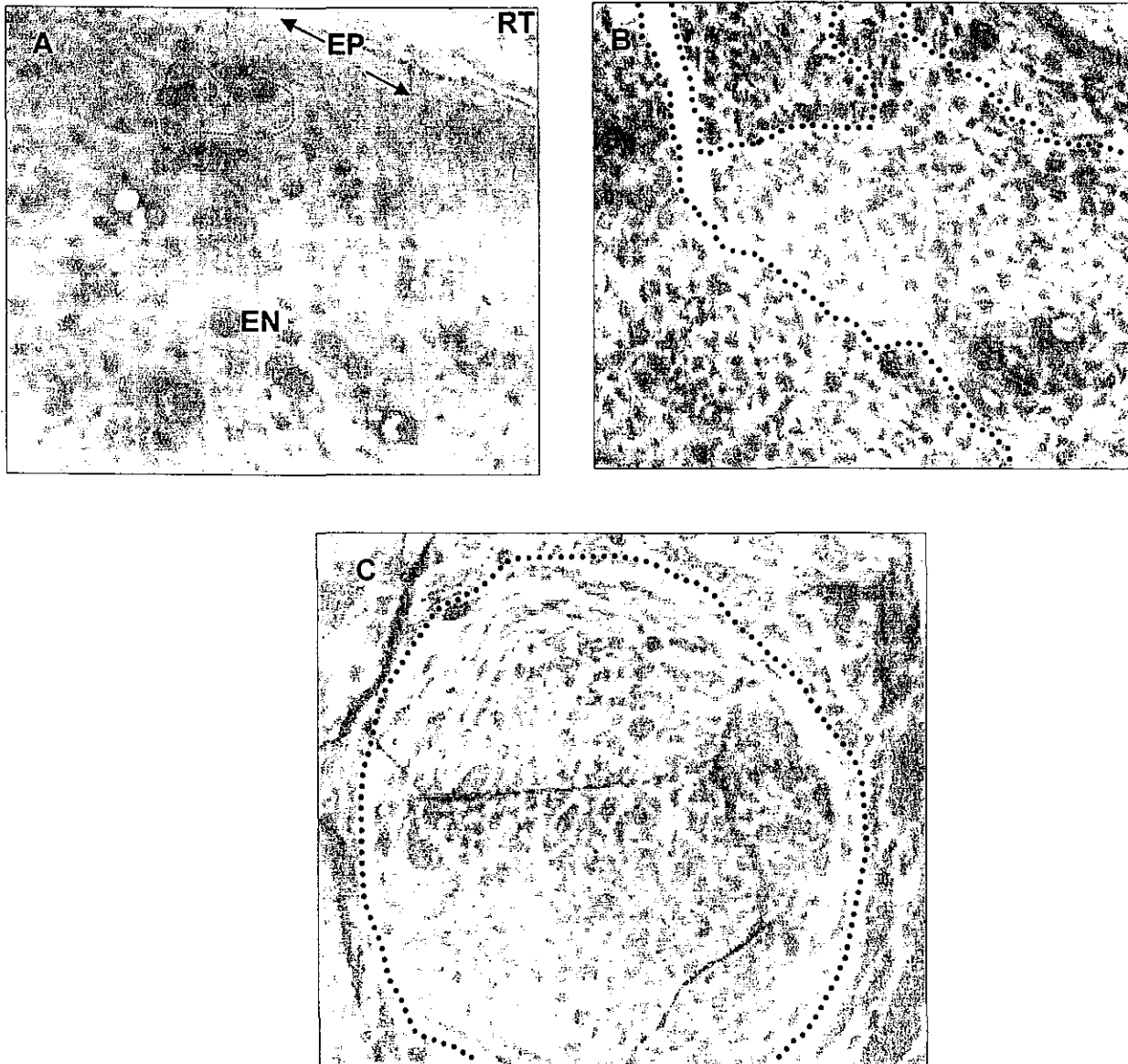


Figura 31. Tratamiento con silicona a los 30 días post-axotomía. Corte transversal del nervio ciático de rata, teñido con azul de toluidina. Las imágenes muestran el nervio ciático en regeneración. En la figura A (40 x) se observa el epineuro (EP) primitivo envolviendo fascículos en formación (flecha), algunas fibras reticulares (RT) y el desarrollo de un endoneuro primitivo (EN), además se observa un grupo de fibras axoplásmicas que comienzan a ser mielinizadas (línea punteada). En la figura B (40x) se observa el inicio de una organización minifascicular (línea punteada). Figura C (20 x), fascículo en regeneración (línea punteada).



Figura 32. Tratamiento con Quitosana a los 60 días post-axotomía. Corte transversal del nervio ciático de rata, teñido con azul de toluidina 20x. Se muestra la organización fascicular (línea punteada) del nervio, así como el epineuro (EP) y el perineuro (PE); fibras reticulares (FB); fibras nerviosas (FN), vasos sanguíneos (flechas).

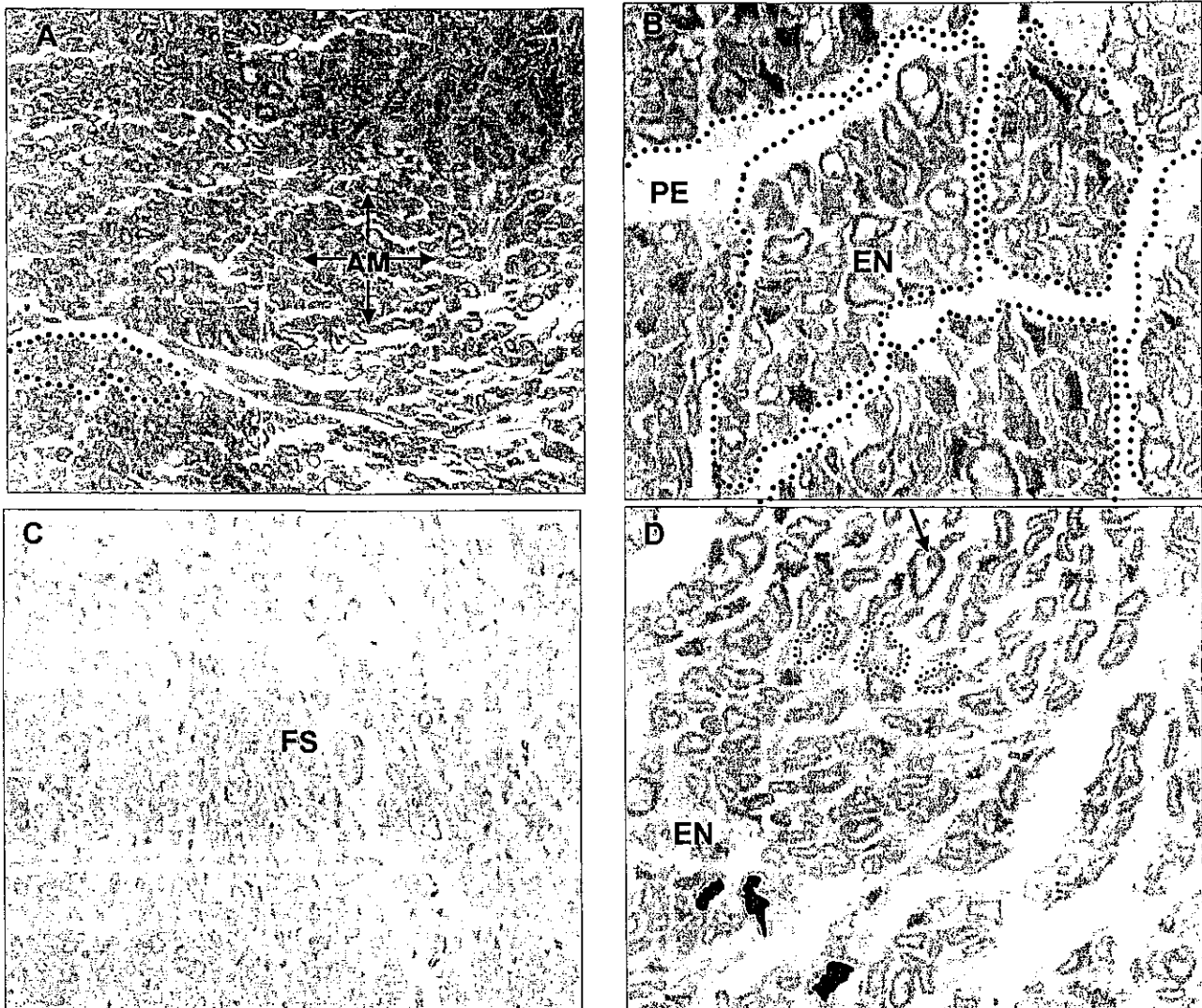


Figura 33. Tratamiento con Quitosana a los 60 días post-axotomía. Corte transversal del nervio ciático de rata teñido con azul de toluidina. Se observan imágenes microscópicas del nervio ciático regenerado. En la figura A (40 x) se observan fascículos con axones mielinizados (línea punteada), en la figura B (100x) se observa la organización minifascicular del nervio (línea punteada), el perineuro (PE) envolviendo a cada fascículo y al endoneuro (EN) envolviendo a cada axón, en la figura C (40X), se observa un fascículo con numerosos axones mielinizados, en la figura D (100x) se observa un núcleo de una célula de Schwann (flecha), fibras mielinizadas (línea punteada), el axoplasma de una fibra mielinizada (fondo oscuro) y el endoneuro (EN) envolviendo a cada axón.

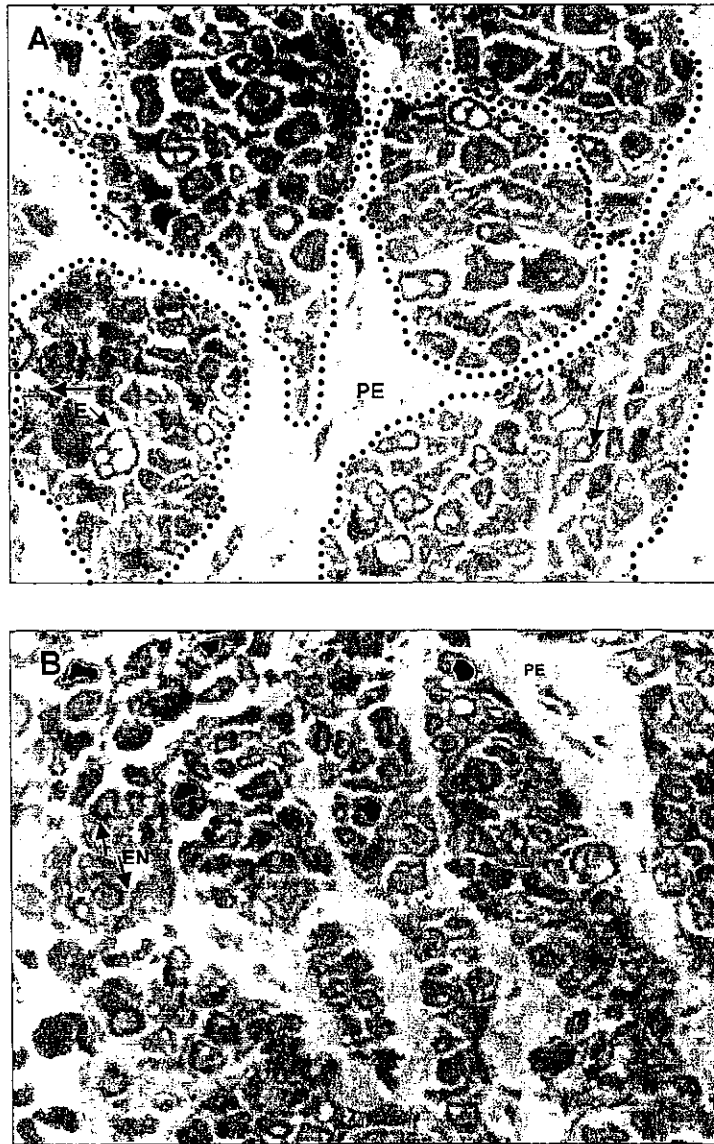


Figura 34. Tratamiento con silicona a los 60 días post-axotomía. Corte transversal del nervio ciático de rata, teñido con azul de toluidina. Las imágenes corresponden al nervio ciático regenerado. En la figura A (100x) se observan la organización minifascicular del nervio (línea punteada), el perineuro (PE) envolviendo a cada minifascículo, el núcleo de una célula de Schwann (flecha), y el endoneuro (EN y flecha), envolviendo a cada fibra axoplásmica, en la figura B (100x), se observa el axoplasma de fibras mielinizadas (fondo oscuro), se observa el perineuro (PE) envolviendo a los fascículos, y el endoneuro (EN y flecha) envolviendo a cada fibra axoplásmica.

Evaluación del índice funcional del nervio ciático (IFC).

Todos los animales de los grupos experimentales completaron las pruebas del análisis funcional del caminado. De estos animales 18 pertenecían al grupo quitosana, 18 al grupo silicona. La media de los valores del IFC se muestra en el cuadro 8. A los 10, 30 y 60 días después de la axotomía tubulización del nervio ciático se observó que todos los animales presentaban una incapacidad motora de la pierna lesionada, independientemente de si fueron tubulizados con quitosana o silicona. Sin embargo, al aplicar la fórmula que determina el Índice funcional del ciático (IFC) (Bain y col., 1989) y su posterior análisis estadístico, (U de Mann-Whitney para grupos independientes, $p < 0.05$), reveló que los animales que fueron tubulizados con quitosana tuvieron mejores resultados, sin embargo las diferencias no fueron significativas.

Cuadro 8. Resultados de la evaluación del Índice funcional del nervio ciático. Muestra la media de los tratamientos con quitosana y silicona a los 10, 30 y 60 días post axotomía-tubulización (0 es función normal y -100 representa incapacidad total).

TRATAMIENTO	TUBULIZACIÓN CON PRÓTESIS DE QUITOSANA	TUBULIZACIÓN CON PRÓTESIS DE SILICONA
	Media \pm Desviación Estándar	Media \pm Desviación Estándar
DÍAS	IFC	IFC
10	- 63.50 \pm 23.01	- 67.40 \pm 3.47
30	- 81.14 \pm 7.31	- 89.55 \pm 9.90
60	- 74.60 \pm 34.79	- 79.62 \pm 10.29

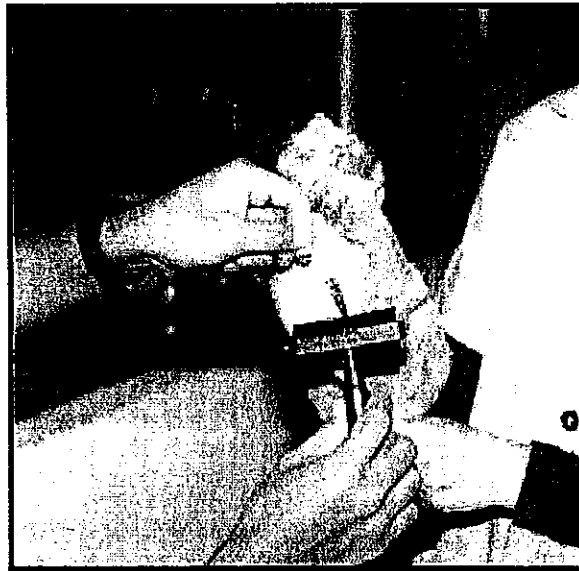


Figura 35. Aplicación de la tinta al miembro lesionado de la rata para evaluación del Índice funcional del nervio ciático.

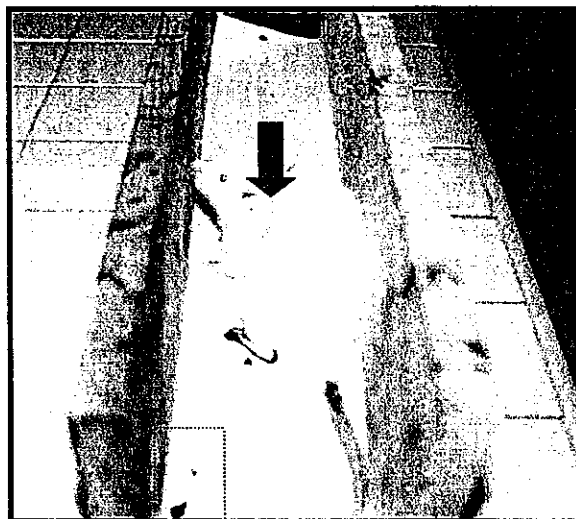


Figura 36. Túnel de deambulación para evaluación del índice funcional del ciático. Se observa papel bond (flecha) sobre el piso del túnel donde se deja impresa la huella (línea punteada).

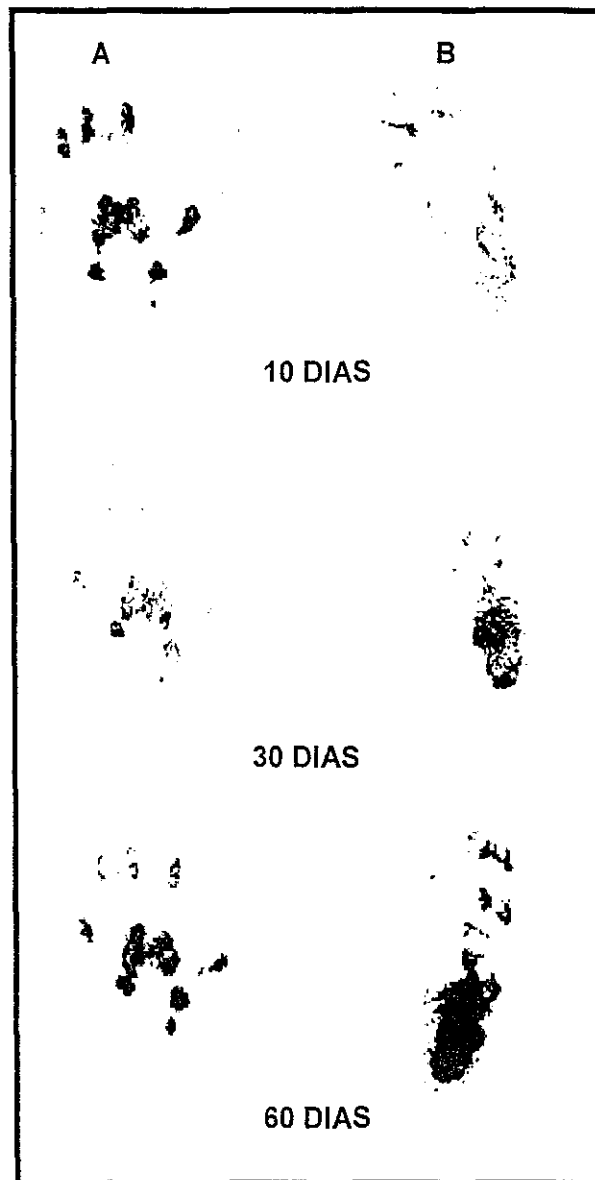


Figura 37. Evaluación del índice funcional del nervio ciático, tubulización con quitosana. A, muestra la huella impresa de una rata control, nótese la extensión normal de los dedos. B, Muestra la huella de ratas post-axotomía a los diferentes días de tratamiento.

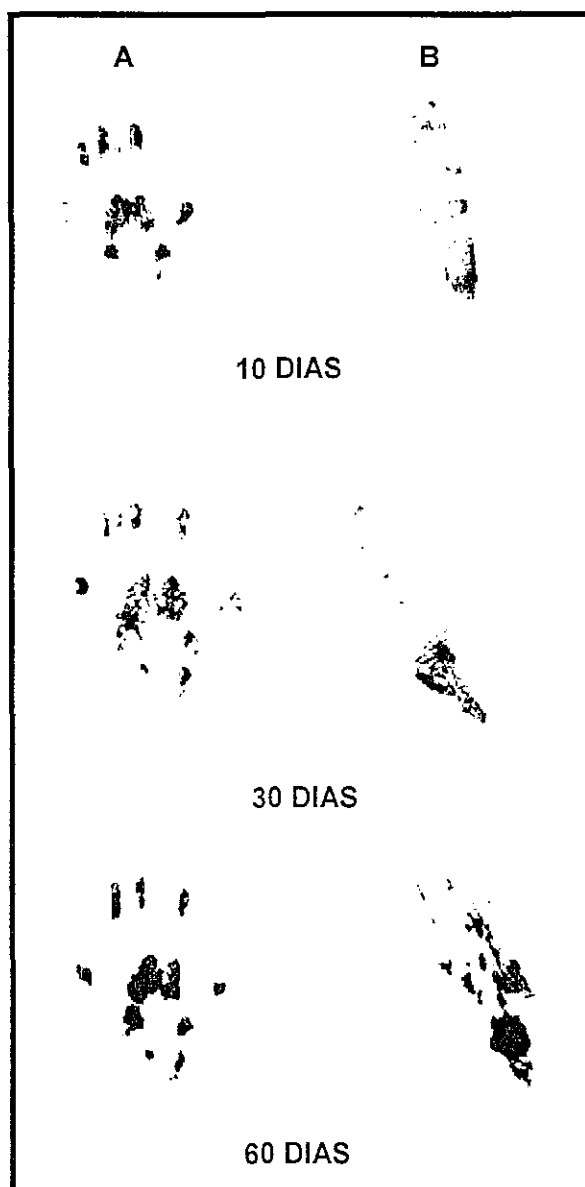


Figura 38. Evaluación del índice funcional del nervio ciático, tubulización con silicona. **A**, muestra la huella impresa de una rata control, nótese la extensión normal de los dedos. **B**, Muestra la huella de ratas post-axotomía a los diferentes días de tratamiento.

Características de los voltajes registrados después de la aplicación de un estímulo de 2.6 Volts en el nervio ciático de las ratas, postaxotomía-tubulización con prótesis de quitosana y silicona.

A continuación se presentan los valores obtenidos en las diferentes condiciones (media, desviación estandar) y los resultados del análisis estadístico (ANOVA seguido en su caso de pruebas de Tukey, siempre utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$).

Características del voltaje (mV).

A los 10 días postaxotomía-tubulización se demostró que la aplicación de un estímulo de 2.6 V fue capaz de conducirse a través de las prótesis de quitosana (1.00, 0.00) y silicona (0.83, 0.40), pero el voltaje fue menor en comparación con la conducción del impulso en el nervio control (7.83, 1.17). A los 30 días posteriores a la axotomía-tubulización el registro presentó un voltaje mayor en las prótesis de quitosana (3.50, 1.22) que en las de silicona (2.16, 0.40), sin embargo, las diferencias con el control todavía eran evidentes.

Posteriormente, a los 60 días postaxotomía-tubulización, los registros para las condiciones: quitosana (6.16, 1.33), silicona (4.33, 0.51) y control (7.83, 1.17), resultaron con diferencias significativas sólo para las condiciones control-silicona (cuadro 9).

Velocidad de Conducción Nerviosa (m/s).

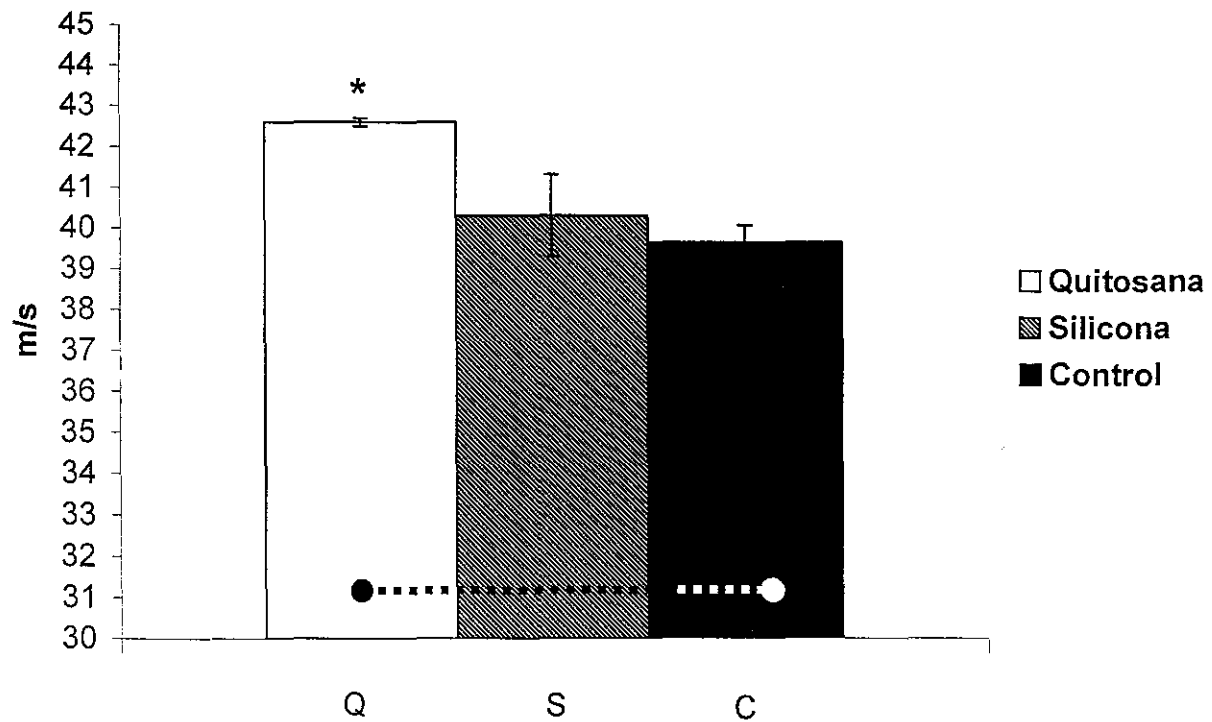
A los 10 días postlesión la velocidad de conducción nerviosa fue distinta entre las condiciones: quitosana (42.60, 0.24), silicona (40.30, 2.47) y control (39.65, 1.02). Estas

diferencias fueron significativas solamente entre las condiciones quitosana-control (Grafica 1).

A los 30 días postlesión la velocidad de conducción nerviosa fue distinta entre las condiciones: quitosana (40.55, 2.70), silicona (36.00, 1.50) y control (39.65, 1.02). Estas diferencias fueron significativas entre las condiciones quitosana-silicona y control-silicona (Grafica 2).

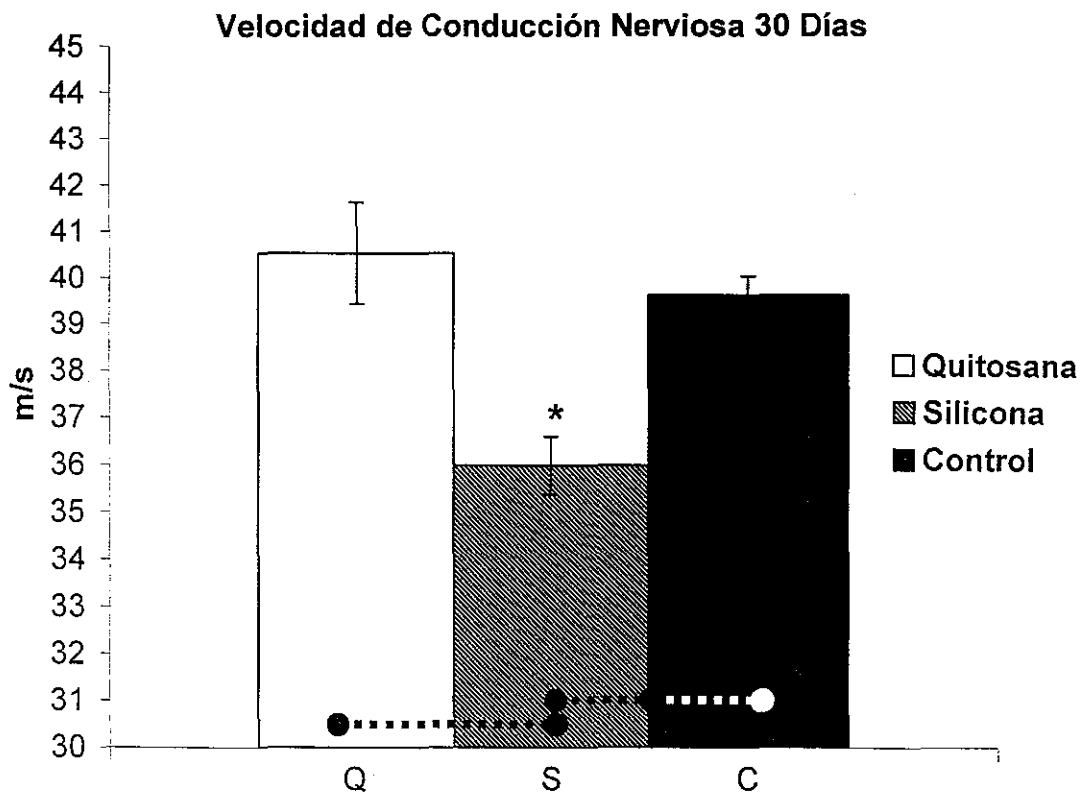
A los 60 días postlesión la velocidad de conducción nerviosa fue distinta entre las condiciones: quitosana (40.67, 1.68), silicona (38.35, 3.66) y control (39.65, 1.02). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas en ninguna de las condiciones (Grafica 3).

Velocidad de Conducción Nerviosa 10 Días



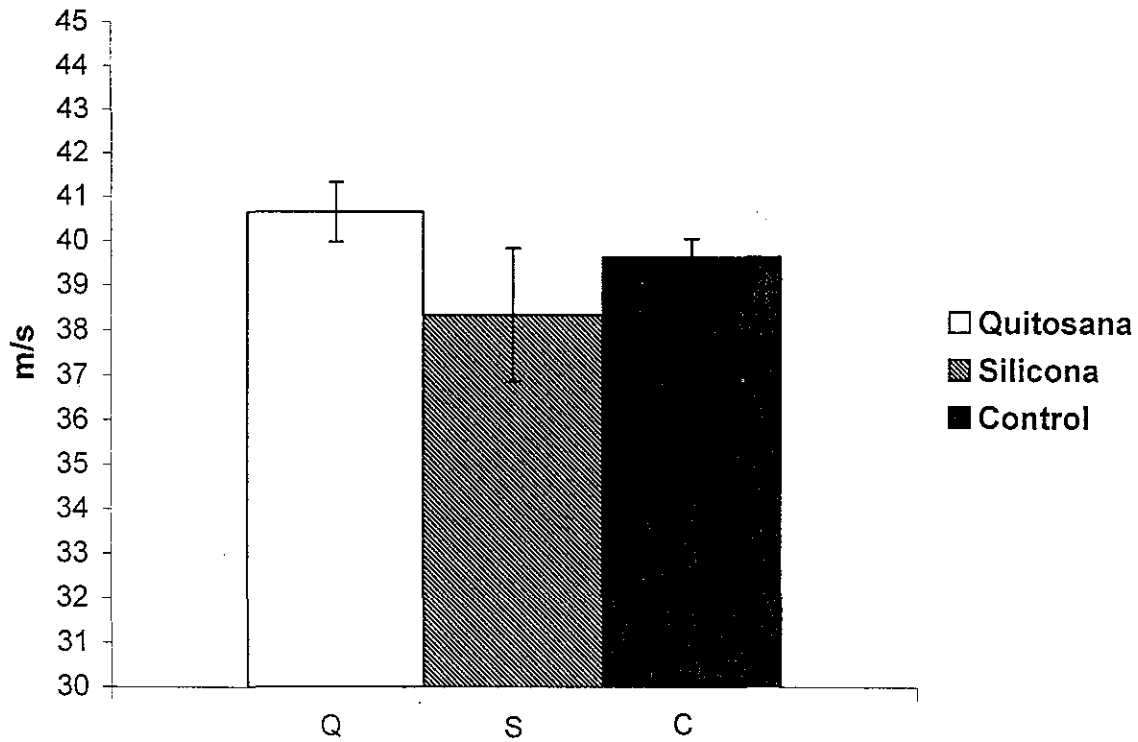
Grafica 1. Velocidad de conducción desde la aplicación del estímulo en el electrodo de registro de los grupos quitosana (Q), silicona (S) y control (C) a los 10 días postlesión (media \pm error estándar). (ANOVA-Tukey $p < 0.05$, $n=6$).

* $Q > C$, $p < 0.05$.



Grafica 2. Velocidad de conducción desde la aplicación del estímulo en el electrodo de registro de los grupos quitosana (Q), silicona (S) y control (C) a los 30 días postlesión (media \pm error estándar). (ANOVA-Tukey $p < 0.05$, $n=6$).

* $S < Q$ y C , $p < 0.05$.

Velocidad de Conducción Nerviosa 60 Días

Grafica 3. Velocidad de conducción desde la aplicación del estímulo en el electrodo de registro de los grupos quitosana (Q), silicona (S) y control (C) a los 60 días postlesión (media \pm error estándar). (ANOVA-Tukey $p < 0.05$, $n=6$).

No hubo indica diferencias significativas entre las condiciones.

Cuadro 9. Voltaje (en mV) registrado en el muñón distal después de la aplicación de un estímulo de 2.6 Volts (media \pm error estándar) en las condiciones control (C), silicona (S) y quitosana (Q). * indica diferencias significativas respecto al grupo control (C).

	10 DÍAS	30 DÍAS	60DÍAS
CONTROL ^C	7.83 \pm 0.48	7.83 \pm 0.48	7.83 \pm 0.48
SILICONA ^S	* 0.83 \pm 0.17	* 2.17 \pm 0.17	* 4.33 \pm 0.21
QUITOSANA ^Q	* 1.00 \pm 0.00	* 3.50 \pm 0.50	6.17 \pm 0.54

(ANOVA seguido por pruebas de Tukey, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Funcionalidad.

La restauración de la función nerviosa sensorial y motora después de reconstruir una lesión nerviosa siempre es deficiente. Diferentes grupos han evaluado y estudiado mediante electrofisiología el efecto de varios tipos de lesión y reparación, sus resultados hasta el momento han mostrado diferentes grados de recuperación y reinervación hacia sus órganos diana (Lai y col., 1997; Valero-Cabré y col., 2001). Para ello se aplican estímulos conocidos y estandarizados que provocan respuestas específicas, que son la expresión de la recuperación del nervio lesionado, pero estas pruebas electrofisiológicas no se correlacionan con las evaluaciones de funcionalidad y de histomorfología (Bain y col., 1989; Varejão y col., 2001). Las pruebas de electroestimulación también pueden ser usadas para evaluar la eficiencia de la función nerviosa sensorial (De Koning y col., 1986). Cuando un nervio sensorial es seccionado, el área correspondiente de la piel se vuelve insensible (Walshe, 1942). Los resultados del presente estudio corroboran lo anterior, ya que observamos que en el nervio ciático, el cual contiene tanto fibras sensoriales como motoras (nervio mixto), en los primeros 10 días poslesión no se registró sensibilidad en la zona denervada al aplicar pequeñas descargas eléctricas en el miembro lesionado, tanto de las ratas tratadas con silicona como con quitosana. Sin embargo, a los 30 y 60 días postlesión el retorno de la función sensorial se hizo evidente, para explicar el retorno de la función sensorial podemos optar por 2 caminos; en primer lugar suponemos que la reparación de las fibras sensoriales han alcanzado su órgano diana y por lo tanto se reestableció la función sensorial en el miembro lesionado. La sugerencia no es descabellada ya que podemos

relacionarla con los hallazgos histológicos en los cuales observamos fibras en vías de mielinización. En segundo lugar tenemos la posibilidad de que probablemente en presente estudio pudieran haber existido fibras colaterales del nervio safeno, las cuales suplieron la función sensorial del nervio ciático permitiendo una respuesta falsa a la recuperación sensorial del nervio ciático. Esta posibilidad se apoya con las investigaciones realizadas por Devor y colaboradores en 1979, los cuales demostraron que en la fase temprana del retorno de la sensación en el pie, después de lesión por aplastamiento del nervio ciático, se presenta por la expansión colateral de la distribución funcional de fibras vecinas intactas del nervio safeno. Lo que hace necesario realizar otros estudios de axotomía del nervio safeno, ya que así se produce denervación de las zonas inervadas por el nervio safeno y sus colaterales, podemos descartar que la actividad sensorial se debe a las colaterales de este nervio que estén inervando zonas de influencia del nervio ciático. Sin embargo, dichos investigadores también demostraron que esta reinervación es reemplazada posteriormente por la reparación del nervio original. Mientras que el nervio safeno, el cual emite sus colaterales se retrae de su máxima extensión y regresa a su fascículo original (Devor y col., 1979). De esto surge la incógnita de que tanto los resultados de la prueba sensorial son atribuibles a la reparación nerviosa del ciático y que tanto a las fibras colaterales del safeno, por lo tanto resulta necesario realizar estudios con modelos de axotomía del nervio safeno.

Así mismo se debe considerar que las lesiones a los nervios periféricos dan como resultado la pérdida del control neural motor, sensorial y de las funciones autonómicas en el territorio denervado. Esta perdida puede ser recuperada si la neurona sobrevive, si el axón crece y reestablece nuevas conexiones funcionales con el

apropiado órgano diana. Primeramente, la reinervación depende de la severidad de la lesión, la cual se relaciona con el grado de trastorno en el tejido neural, el alineamiento de los muñones nerviosos y del procedimiento de reparación aplicado (Navarro y col., 1994; Sunderland y col., 1990). Si nos orientamos específicamente al estudio de la capacidad motora del nervio ciático, fue posible observar en el presente estudio que durante los primeros 10 días las ratas perdieron el control motor del miembro lesionado, el caminado fue anormal y así permaneció durante toda la prueba. Sin embargo, al analizar los resultados, algunos datos fueron interesantes en particular el periodo de 10 días postlesión, donde el IFC arrojó valores superiores a los de 30 y 60 días postlesión para los cuales si tenemos referencias que apoyan dichos resultados (Bain y col., 1989; Varejão y col., 2001). Con el propósito de explicar este fenómeno, se han planteado 2 hipótesis: 1) al lesionar el nervio ciático la extremidad pierde toda su capacidad motora y por lo tanto todo el peso de la parte posterior del animal recae sobre una sola pierna (derecha en este caso), la cual no tiene la suficiente potencia para sostener el tren posterior y por lo tanto parte del peso es sostenido por la extremidad lesionada, aun estando flexionada. De lo cual se obtienen huellas falsas provenientes del miembro lesionado, y 2) el exceso de peso sobre la extremidad no lesionada (derecha) provoca un caminado lento, dando tiempo a marcar una huella falsa sobre el papel al recargar el cuerpo sobre la extremidad flexionada, además, que el animal todavía esta en adaptación a caminar con una sola pierna.

Existen cuatro fenómenos que pueden influenciar y determinar las oportunidades para la recuperación de las complejas actividades motoras y sensoriales después de lesión nerviosa: 1) la supervivencia de un número mínimo de neuronas capaces de

reinervar su órgano diana (Fu y col., 1997; Melville y col., 1989), 2) la emisión axonal de conos de crecimiento y el crecimiento a través de la cicatriz conectiva, la cual constituye una barrera mecánica para las fibras en regeneración, 3) una reinervación acertada del músculo original y de los territorios sensoriales y autonómicos (Gramsbergen y col., 2000; Valero-Cabré y col., 2001) y 4) la restitución de las conexiones adecuadas en los circuitos espinales involucrados en el control motor y sensorial (Brännström y col., 1992a; Valero-Cabré y col., 2001).

Van Meeteren y colaboradores (1997), evaluaron la recuperación nerviosa funcional después de lesión por aplastamiento al nervio ciático en la rata. Sus resultados muestran una diferencia en el retorno de la función motora y sensorial. Llegaron a esta conclusión mediante estudios de velocidad de conducción sensorial y motora, por medio de los cuales el nervio lesionado fue estimulado directamente. La velocidad de conducción nerviosa motora comenzó a recuperarse más rápido que la velocidad de conducción nerviosa sensorial. A las 21 semanas después del daño, la velocidad de conducción nerviosa motora regresó al 70% del valor control, mientras la velocidad de conducción nerviosa sensorial se restableció en un 50%. Los resultados de la velocidad de conducción, no proveen de información de si las fibras han alcanzado su blanco distal o no. La velocidad de conducción esta definida por el diámetro del axón (Lillie, 1925). En general, los axones sensoriales son mas gruesos, y entonces la regeneración toma más tiempo que para los axones motores.

Con relación a lo anteriormente descrito, en el presente estudio debimos observar una secuencia similar en cuanto a la funcionalidad motora y sensitiva. Sin embargo, parece ser que esta regla no se cumplió, ya que al realizar la prueba sensorial

observamos en esta una mayor recuperación, esto pudo deberse al crecimiento de neuritas proveniente de los axones en regeneración desde el muñón proximal del nervio ciático seccionado o a los brotes colaterales provenientes de otros nervios, como el nervio safeno que emite fibras intactas que se localizan en la piel que rodea la zona denervada tal como mencionó Weddell en 1941(Weddell y col., 1941) o una combinación de ambos.

Al analizar los datos generales del IFC es posible observar una secuencia ascendente en la recuperación funcional a los 30 y 60 días postlesión. Sin embargo, dicha recuperación no fue suficiente para expresarla en el tren de caminado dando resultados favorables pero no satisfactorios, de cualquier forma dichos resultados concuerdan con los resultados de Yao y col., (1998); Dijkstra y col. (2000), pero no con los resultados de Gómez Pinedo (2001).

Electrofisiología.

La evaluación de la recuperación nerviosa funcional en el modelo de la rata no es simple. En el presente estudio se evaluó el nervio ciático *in vivo*. Diferentes modelos de animales se han utilizado para determinar las características fisiológicas del nervio ciático y aunque el calibre del nervio en diferentes especies puede variar, el número de fibras mielinizadas y no mielinizadas es similar, con una variación intra y entre especies del 10 %. Si a este nervio le aplicamos una estimulación computarizada de 25 mV, la velocidad de conducción del impulso en promedio es de 41 a 60 m/s (Robertson y col., 1986). Los electrodos deben ser seguros y estables. Los materiales típicamente utilizados son; platino, iridium, plata y agujas de acero inoxidable como conductores y como agentes aislantes goma de silicona, politetrafluoroetileno y polimida. En este

estudio se utilizaron electrodos de acero inoxidable aislados con silicona, los cuales se mantuvieron estables durante las pruebas electrofisiológicas de registro.

Observamos que a los 10 días postlesión la velocidad de conducción fue mayor para el grupo de quitosana si la comparamos con el control. Sin embargo, no existen referencias que expliquen el motivo por el cual fue mayor la velocidad en este grupo, el motivo quizás para la mayor velocidad de conducción registrada, sea la acumulación de líquidos dentro y entre la prótesis, ya que si recordamos las características de la prótesis de quitosana tenemos que es una prótesis que se puede degradar y por lo tanto puede absorber líquido en sus paredes manteniéndola húmeda permanentemente, característica que la prótesis de silicona no comparte. Además de que a los 10 días no existe cable de crecimiento, por lo que no podemos atribuir la conducción a este factor.

A los 30 días postlesión encontramos datos muy interesantes, la velocidad de conducción disminuyó ligeramente en comparación a los datos obtenidos a los 10 días. Sin embargo, los datos no se alejan del rango normal para el nervio ciático (38 a 70 m/s). Esta pequeña variación de datos puede ser atribuible a que el nervio en reparación ha cubierto casi la totalidad de la luz de la cámara de crecimiento, por lo tanto la cantidad de líquido dentro de la cámara es menor y por ende la velocidad es menor. Además que las fibras del nervio en reparación no están mielinizadas y no ayudan a que la velocidad de conducción sea igual a la de un nervio intacto, a pesar de ello las diferencias no fueron significativas en las condiciones control y quitosana, probablemente por la humedad presente en las cámaras de crecimiento. A los 60 días postlesión, las diferencias de velocidad de conducción no fueron significativas en

ninguna de las condiciones, el dato podemos correlacionarlo con la reparación nerviosa ya que para esas fechas se encontró un cable de crecimiento con características histológicas a la de un nervio normal pero de menor diámetro en ambas prótesis.

Una de las ventajas al aplicar la tubulización como técnica de reparación es que los factores tróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), se acumulan dentro de las cámaras nerviosas e inducen el brote de axones, tanto de los axones lesionados como de los nervios no lesionados, como el nervio safeno (Isaacson y col., 1992), ya que el rebrote colateral puede ocurrir y subsecuentemente hacer conexiones periféricas normales (Lundborg y col., 1994). Como lo demostró Devor y col. en 1979, demostraron que la fase temprana del retorno de la sensación en el pie, después de lesión por aplastamiento del nervio ciático, se presenta por la expansión colateral de la distribución funcional de fibras vecinas intactas del nervio safeno, por lo que es necesario realizar axotomía del nervio safeno en estudios posteriores del nervio ciático.

Biomateriales.

Algunos autores dudan sobre la aplicación clínica de la tubulización debido a que no se conocen por completo los efectos secundarios por la presencia de prótesis naturales y sintéticas para formar cámaras de crecimiento (Brian y col., 1991; He y col., 1992; Spencer y col., 1979). Actualmente se considera a la técnica de tubulización como un recurso invaluable para obtener muestras del microambiente que rodea a los axones en reparación y así obtener información precisa de los mecanismos de la reparación de nervios periféricos.

Existen también estudios previos que mencionan que no se han alcanzado resultados favorables en la reparación nerviosa cuando la lesión es de una distancia de 15 mm o más, ya que se apoyan en que no existe la formación de una matriz extracelular organizada a causa del mayor volumen libre en el interior de la cámara (Ramón y Cajal, 1928; Rosales-Cortés y col., 2000; Várum y col., 1996). En el presente estudio se indujo un defecto de 5 mm en el nervio ciático. Al realizar el análisis microscópico a los 30 y 60 días se observó la presencia de una matriz extracelular organizada y de un cable de crecimiento con todas las características de un nervio normal. Uno de los resultados más sobresalientes en la reparación nerviosa con el uso de biomateriales ha sido la reparación exitosa de lesiones con solución de continuidad mayor a 1 cm en especies mayores que los roedores. Este efecto no se consigue cuando se utilizan polímeros sintéticos como la silicona (Lawrence, 1993). La quitosana ha sido utilizada exitosamente en la reparación de los nervios ciático y facial, como facilitador del crecimiento axonal (Chávez-Delgado y col., 1997; Gómez-Pinedo, 2001) es por ello que en el presente estudio las prótesis de quitosana no produjeron manifestaciones evidentes de rechazo, al parecer este biomaterial fue bien tolerado al utilizarse como prótesis para facilitar la reparación del nervio ciático axotomizado, por lo que puede considerarse como una alternativa terapéutica de gran valor en la medicina reconstructiva. La silicona, además de producir en el hospedero síntomas de rechazo, requiere de una segunda cirugía para retirarse, con lo cual se pudiera ocasionar lesión al segmento nervioso reparado (Coleman y col., 1993; Muzzarelli y col., 1994, 1977; Rao y col., 1995, 1997; Yoshimoto y col., 1995). Dichos resultados pudieron comprobarse con el presente estudio ya que uno de los animales al que se le implanto

la prótesis de silicona presento inflamación y autotomía de falanges en el miembro lesionado, sin embargo, los síntomas antes mencionados no se presentaron en ninguno de los grupos tratados con quitosana la cual no produjo efectos adversos en la reparación nerviosa.

Uno de los mecanismos que explican el éxito obtenido con biomateriales biodegradables y de la quitosana utilizada en este estudio, es la permeabilidad de sus paredes (Chavez-Delgado, 2002). Esto facilita la difusión de nutrientes y otras señales químicas desde los tejidos circundantes, favoreciendo el crecimiento nervioso y la integración gradual de las prótesis (den Dunnen y col., 2001; Hadlock y col., 1988; Lundborg y col., 2000).

Para la evaluación de estas estrategias terapéuticas, se utilizan comúnmente ratas y la recuperación es medida por métodos morfológicos, eléctricos y funcionales. Aunque los aspectos funcionales de la recuperación nerviosa son generalmente pobres en cuanto a su correlación entre métodos electrofisiológicos e histomorfométricos (De Medinaceli, 1982). En el presente estudio se observaron crecimientos nerviosos dentro de las cámaras de quitosana y silicona, a los 30 y 60 días posesión. Además se encontraron resultados similares en cuanto a la morfología microscópica. Dentro de los estudios complementarios para evaluar la reparación del nervio ciático y evaluar la recuperación de las funciones sensoriales y motoras se encuentra también la evaluación del índice funcional del nervio ciático.

El nervio ciático tiene capacidad regenerativa similar, tanto en ratas como en primates (Dellon, 1991; Mackinnon y col., 1985). El nervio ciático de la *rattus norvegicus* es ampliamente utilizado para evaluar al mismo tiempo la función motora y

sensorial (Dellon y col., 1989; Shen y col., 1995; Dijkstra y col., 2000). La selección de un método de evaluación apropiado es crucial cuando se mide la recuperación nerviosa después de una lesión experimental. En 1982, De Medinaceli reportó que el Índice funcional del ciático podría ser utilizado para evaluar la función total del miembro, incluyendo músculo, nervio y función articular en la rata lesionada. (Vãrejao y col., 2001). Una vía para evaluar la recuperación de la función sensorial del nervio ciático es la prueba de retirada (reflejo de retracción), originalmente descrita por Young y Medawar en 1940. La respuesta de retracción aplicando una pequeña corriente eléctrica en el miembro lesionado resultó un método fácil, simple de aplicar y, además, evalúa la respuesta inmediata del retorno de la función sensorial. En nuestro estudio para evaluar el IFC el papel utilizado (papel Bond Precisión) en el túnel de caminado nos evito los efectos adversos producidos en otros estudios por el papel fotográfico, además de ser económico, fácil de cortar y aplicar en el piso del túnel de caminado (Johnston y col., 1991; Walker y col., 1994; Shen y Zhu, 1995). La tinta que se utilizó (tinta protectora de cheque y foliadores Protectocheck®) para impregnar el miembro lesionado de la rata, aparentemente no produjo efectos tóxicos sobre la piel del animal; a diferencia del azul de bromofenol o de los reveladores utilizados para el papel fotográfico que se han utilizado en otros estudios y que se reporta que pueden ser tóxicos para el animal (De Medinaceli y col., 1982; Lowdon y col., 1988). Esta tinta no se corrió en el papel al momento de que la rata dejara impresa la huella en el papel, ni en el momento en que la cauda del animal pasara por la huella impresa.

En el análisis de las huellas con la fórmula aplicada (Bain y col., 1989) en el presente estudio en los diferentes tratamientos (quitosana y silicona 10, 30 y 60 días) no reveló diferencias significativas notable. Quizá esto se deba a que las fórmulas utilizadas actualmente (Bain y col., 1989; De Medinaceli y col., 1982) para evaluar la recuperación motora del nervio lesionado, se enfocan específicamente a evaluaciones a largo plazo en donde la recuperación a alcanzado un nivel cercano al normal, por lo que aun no se ha encontrado el método ni la formula ideal para evaluar lesiones motoras. Actualmente se desarrollan estudios para evaluar el caminado en lesiones nerviosas con pérdida de la solución de continuidad, medir el tiempo de permanencia del animal en el túnel de deambulación, la velocidad del caminado y el ángulo de la rodilla al tobillo en el miembro lesionado por medio de una cámara de video y así evaluar el índice funcional del nervio ciático a corto y largo plazo (Dijkstra y col., 2000; Varejão y col., 2001). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con estos autores, sin embargo, no coinciden con los resultados obtenidos por Gomez-Pinedo (2001), donde se obtuvieron resultados favorables en cuanto a recuperación del IFC se refiere.

En 1996 Scott, reportó posibles explicaciones para el hecho de que los valores del IFC no recuperen sus valores normales. De acuerdo a este autor, la pobre calidad de la recuperación nerviosa después de la sección del nervio se debe a: 1) *los axones en regeneración fallan y no cruzan la cámara de crecimiento para unir el muñón proximal y distal (ausencia de un cable de crecimiento)* y 2) *la pérdida de dirección de los axones entre sus órganos periféricos blanco (innervación cruzada)*. Los axones que lo hacen exitosamente regeneran a través de la distancia nerviosa faltante y no reinervan su órgano diana original, o incluso su región original. Es entonces cuando el

músculo y los receptores del tendón pueden ser reinervados inapropiadamente por axones aferentes. También han encontrado que la organización de la unidad motora se altera por la aglutinación de fibras musculares (Kugelberg y col., 1970). Lo cual permite que se produzcan cambios en la fuerza de distribución de la contracción muscular, la cual parece afectar significativamente el input mecánico del tendón (Scott, 1996). La pérdida de dirección de los axones aferentes, entre las regiones diana periféricas y los receptores no inervados, tienen una desventaja en la utilización de un feedback propioceptivo en el control del movimiento, lo cual se refleja en el patrón de caminado.

En la situación clínica, los pacientes tienen que funcionar con inputs alterados de información y tienen que "reprogramar" su cerebro a través de programas educacionales. Algunas investigaciones indican que esta reprogramación cerebral involucra fenómenos como: 1) *potenciación a largo plazo de las sinapsis existentes*, 2) *la formación de nuevas sinapsis* y 3) *probablemente se expresen nuevas proteínas en células corticales*. Todos estos procesos en conjunto son llamados "*plasticidad cortical*" (Kandel y col., 1992, Meek y col., 1999). La falta de recuperación funcional en el miembro lesionado posiblemente se deba a que el cerebro necesite una reorganización cortical ya que este pudo haberse alterado por varias razones: 1) por la pérdida o falta de estímulos provenientes del órgano diana lesionado (esto ocasiona disminución de las dendritas así como de las espinas dendríticas) y 2) por la reorganización del mapa cortical, ya que esta comprobado que al perderse la estimulación periférica la representación del miembro a nivel cortical (mapa cortical), es reemplazado por sus vecinos más cercanos creando un nuevo mapa cortical en donde la representación del

miembro lesionado disminuye o simplemente no existe por la falta de estimulación periférica.

CONCLUSIONES

1. El uso de las prótesis de quitosana y silicona permitió la conducción de estímulos evocados a los 10, 30 y 60 días poslesión.
2. La velocidad de conducción en la prótesis de quitosana fue más rápida que en las prótesis de silicona a los 10 días de registro; la prótesis de quitosana registró un promedio de 42.6 m/s vs 40.3 m/s de la prótesis de silicona; a los 30 días el grupo quitosana registró 40.55 m/s vs 36.00 m/s del grupo silicona, a los 60 días la quitosana registró 40.66 m/s vs 38.35 m/s de la silicona.
3. En el registro del voltaje del estímulo aplicado no se encontraron diferencias entre ambas prótesis (en las diferentes etapas de estudio), pero se encontraron diferencias en relación a la situación control.
4. A los 10 días poslesión no se observó conexión por cable de crecimiento entre el muñón proximal y distal en ambos tipos de prótesis (quitosana y silicona).
5. El segmento nervioso regenerado y analizado a los 30 y 60 días (quitosana y silicona) evidenció una estructura morfológica similar a la de un nervio normal, aunque de menor diámetro.
6. En la observación microscópica del segmento regenerado de ambos grupos a 30 y 60 días poslesión mostró estructuras histológicas típicas de un nervio.
7. El uso de las prótesis de quitosana y silicona permitió la recuperación sensorial a los 30 y 60 días poslesión, resultando igual de eficientes en la prueba de retracción del miembro al recibir una descarga eléctrica ya que para ambos grupos la respuesta fue evidente.

8. De acuerdo a la fórmula de Bain y colaboradores (1989) no hubo diferencias entre los tratamientos y la recuperación motora fue pobre (quitosana y silicona 10, 30 y 60 días poslesión).
9. En general, el uso de prótesis de quitosana resultó mejor para regenerar el nervio ciático seccionado con base a: que no se requiere de una segunda cirugía para extraerla y resultó ser mejor conductora de impulsos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aebischer P., Guenard V., Winn SR., Valentin RF., Galleti PM.** Blind ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of distal nerve stump. *Brain Res*, 454:179-187 (1988).
2. **Afifi AK.** Neuroanatomía funcional. Texto y Atlas. Mc Graw-Hill Interamericana. 1999 p.p. 16-22.
3. **Akbuga J., Bergisadi N.** 5-Fluorouracil-loaded chitosan microspheres: preparation and release characteristics. *J Microencapsul*, 13(2):161-8 (1996).
4. **Akwa Y., Schumacher M., Jung-Testas I., Baulieu E.** Neurosteroids in rat sciatic nerves and Schwann cells. *C.R. Acad Sci Paris (Sciences de la Vie)*, 316:410 (1993a).
5. **Akwa Y., Sananes N., Gouezou M., Robel P., Baulieu E., Goascogne L.** Astrocytes and neurosteroids: Metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J Cell Biol*, 121(1):135-43 (1993b).
6. **Allan G.** Biomedical applications of chitin and chitosan. Chitin, Chitosan and related enzymes. Ed. Academic Press, Inc. Montreal. 1984; 119.
7. **Allan G.** Biomedical applications of chitin and chitosan. In: Chitin, Chitosan, and related enzymes. Ed. Academic Press, Inc. Montreal, 119 (1989).
8. **Aoki N., Sakai AT., Oikawa A.** Postoperative inflammatory reaction developing focal but severe brain edema. A possible complication of topical application of biobond-soaked oxycellulose. *Acta Neurol Scand*, 98(4):288-91 (1998).

-
9. **Ayala H.** Estudio Experimental en la cirugía de los nervios periféricos. *Rev Ortop Traum*, 21(IB):3-14 (1997).
 10. **Bajrovic F., Bresjanac M., Sketelj J.** Long-term effects of deprivation of cell support in the distal stump o peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res*, 83(1):129-38 (1994).
 11. **Bain JR., Mackinnon SE., Hunter D.** Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83(1):129-38 (1989).
 12. **Bain JR., Veltri KL., Chamberlain D., Fahnestock M.** Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience*, 103(2):503-510 (2001).
 13. **Baley S., Eichler M., Villadiego A., Rich K.** The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol*, 22(3):176-84 (1993).
 14. **Banks W.J.** Histología Veterinaria Aplicada. Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V. México-Bogotá, (1986) p.p. 337, 361-362.
 15. **Barakat-Walter I.** Role of thyroid hormones and their receptors in peripheral nerve regeneration. *J Neurobiol*, 40(4): 541-59 (1999).
 16. **Bates D., Ranford J., Mangelsdorf D.** Blot and culture analysis of neuronotrophic factors in nerve regeneration chamber fluids. *Neurochem Res*, 16(6):621-8 (1991).
 17. **Baulieu E., Schumacher M.** Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone o myelination in peripheral nerves. *Mult Scler*, 3(2):105-12 (1997).

-
18. **Baulieu E.** Neurosteroids: a new function in the brain. *J Biol Cell*, 71:3 (1991).
 19. **Baulieu E., Robel P.** Neurosteroids: A new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37:395 (1990).
 20. **Baulieu E.** Steroid hormones in the brain: several mechanisms?. Steroid hormone regulation of the brain. Ed. Fuxé K., Gustafsson JA and Wettenberg L. Pergamon Press, Oxford (1981) p.p. 3.
 21. **Baulieu EE., Schumacher M.** Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Hum Reprod, Suppl*, 1:1-13 (2000).
 22. **Bhaskara S., Sharma CO.** Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34:21-28 (1997).
 23. **Bayomi M., al-Suwayeh S., el-Helw A., Mesnad A.** Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharm Acta Helv*, 73(4):187-92 (1998).
 24. **Berscht PC.** Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials*, 15(8):593-600 (1994).
 25. **Bijlsma WA., Jennekens FG., Schotman P., Gispen WH.** Effects of corticotropin/ACTH) on recovery of sensorimotor function in rats: structure-activity study. *Eur J Pharmacol*, 76(1):73-9 (1981).
 26. **Bonnekoh PG., Scheidt P., Friede R.** Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studying myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol*, 48(2):140-53 (1989).

-
27. **Brandt J., Dahlin L.B., Lundborg G.**, Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J Hand Surg*, 24(3):284-90 (1999).
 28. **Branner A., Normann RA.** A multielectrode array for intrafascicular recording and stimulation in sciatic nerve of cats. *Brain Res Bull*, 51(4):293-306 (2000).
 29. **Brännström T., Havton L., Kellerth JO.** Restorative effects of reinnervation on the size and dendritic arborization patterns of axomized cat spinal α -motoneurons. *J Comp Neurol*, 318(4):452-61 (1992)-a.
 30. **Brännström T., Havton L., Kellerth JO.** Changes in size and dendritic arborization patterns of adult cat spinal α -motoneurons following permanent axotomy. *J Comp Neurol*, 318(4):439-51 (1992)-b.
 31. **Braun RM.** Comparative studies of neuroorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. *Surg Gynecol Obstet*, 122(1):15-18 (1966).
 32. **Brian J., Mattox D.** Experimental nerve regeneration. A review. In: *Otolaryngol Clin North Am. Department of otolaryngology Head and Neck Surgery. University of California, Irvine*, 24:3,739 (1991).
 33. **Bridge PM., Ball DJ., Mackinnon SE., Nakao Y., Brandt K., Hunter DA., Hertl C.** Nerve crush injuries a model for axonotmesis. *Exp Neurol*, 127(2):284-90 (1994).
 34. **Broussignac P.** Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie Le Chitosane. *Chimie et Industrie –Genie Chimique*, 99:1241 (1968).

-
35. **Brown CJ., Mackinnon SE., Evans PJ., Bain JR., Makino AP., Hunter DA., Hare GM.** Self evaluation of walking track measurement using a sciatic function index. *Microsurgery*, 10(3):226-35 (1989).
 36. **Bunge M., Williams A., Wood P.** Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol*, 92(2):449-60 (1982).
 37. **Campbell J., Bassett C., Husby J., Thulin C., Feringa E.** Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma*, 1:139-157 (1961).
 38. **Carlton JM., Goldberg NH.** Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*, 37:611-612 (1986).
 39. **Carr MM., Best TJ., Mackinnon SE., Evans PJ.** Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair. *Ann Plast Surg*, 28(6):538-44 (1992).
 40. **Chamberlain LJ., Yannas IV., Hsu H.-P., Spector M.** Histological response to a fully degradable collagen device implanted in a gap in the rat sciatic nerve. *Tiss Engin*, 3(4):353-62 (1997).
 41. **Chamberlain LJ., Yannas IV., Hsu HP., Strichartz GR, Spector M.** Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-gag matrix in a ten-millimeter gap. *J Neurosci Res*, 60(5):666-77 (2000).
 42. **Chandy T., Sharma CP.** Chitosan: as a biomaterial. *Biomater Artif Cells, Artif Organs*, 18(3):403-21 (1990).

-
43. **Chandy T., Mooradian DL., Rao GH.** Evaluation of modified alginate chitosan-polyethylen glycol microcapsules for cell encapsulation. *Artif Organs*, 23(10):894-903 (1999).
 44. **Chaudhry V., Glass J., Friffin J.** Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. In *Neurologic Clinics. Peripheral Neuropathy: New concepts and treatments*. Baltimore, Maryland (1992); 10 (3):613.
 45. **Chavez-Delgado ME.** Regeneración del nervio facial en conejos por la influencia *in situ* de neuroesteroides liberados desde una prótesis de quitosana. Tesis de Doctorado, Universidad de Guadalajara, México. 2002.
 46. **Chávez-Delgado M., García-Estrada J., Huerta-Viera M., Gómez-Pinedo U. Luquín de Anda S.** La regeneración del nervio facial es mediada por esteroides gonadales. VII Reunión Nacional de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Oaxtepec, Morelos, México. 1997.
 47. **Chen YS., Wang-Bennett LT., Coker NJ.** Facial Nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor. *Exp Neurol*, 103(1):52-60 (1989).
 48. **Chen ZW., Wang MS.** Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery*, 16(8):547-51 (1995).
 49. **Coleman DJ., Sharpe DT., Naylor IL., Chander CL., Cross SE.** The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants. *Br J Plast Surg*, 46(7):547-56 (1993).
 50. **Dahlin LB., Lundborg G.** Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin Hand Surg*, 12(2)341-352.

-
51. **Danielsen N.** Nerve regeneration and repair. *Diabet Med*, 13(7):677-8 (1996).
 52. **Danielsen N., Pettman HL., Vahlsing M., Manthorpe M., Varon S.** Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res*, 20(3):320-30 (1988).
 53. **Davis G., Varon S., Engvall E., Manthorpe M.** Substratum-binding neurite-promoting factors:relationships to laminin. *Trends Neurosci*, 8:528 (1985).
 54. **De Castro RA., Pai Silva M.D.,** Incide-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*, 21:102-107 (2001).
 55. **De Medinaceli L., Freed WJ., Wyatt RJ.** An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77(3):634-43 (1982).
 56. **De Medinaceli L., Wyatt RJ., Freed W.** Peripheral nerve reconnection: mechanical, thermal and ionic conditions that promote the return of function. *Exp Neurol*, 81(2):469-87 (1983).
 57. **De Koning P., Brakkee JH., Gispen WH.** Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Benefical effects of melanocortins. *J Neurol Sci*, 74(2-3):237-46 (1986).
 58. **Dellon ES., Dellon AL.** Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compresion neuropathies. *Plast Reconstr Surg*, 88(4):686-94 (1991).

-
59. **Dellon AL., Mackinnon SE.** Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*, 10(3):251-5 (1989).
 60. **den Dunnen WF., Meek MF., Grijpma DW., Robinson PH., Schakenraad JM.** In vivo and in vitro degradation of poly [50/50 (85/15 L/D) LA/ε-CL], and the implications for the use in nerve reconstruction. *J Biomed Mater Res*, 51(4):575-85 (2000).
 61. **den Dunnen WF., Meek MF.** Sensory nerve function and auto-mutilation after reconstruction of various gap lengths with nerve guides and autologous nerve grafts. *Biomaterials*, 22(10):1171-6 (2001).
 62. **Denuziere A., Ferrieer D., Domard A.** Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*, 19(14):1275-85 (1998).
 63. **Desarnaud F., Do Thi., Brown AM., Lemke G., Suter U., Baulieu EE., Schumacher M.** Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem*, 71 (4):1765-8 (1998).
 64. **Devor M., Schonfeld D., Seltzer Z., Wall PD.** Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol*, 185(1):211-20 (1979).

-
65. **Dijkstra JR., Meek MF., Robinson PH., Gramsbergen A.** Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*, 96(2):89-96 (2000).
 66. **Drozd NN., Sheer AI., Makarov VA., Gal'braikh LS., Vikhoreva GA., Gorvacheva IN.** The relation between the physicochemical structure and the anticoagulant effect of polysulfated chitosan derivatives. *Eksp Klin Farmakol*, 57(4):42-5 (1994).
 67. **Dumitru D.** Reaction of the peripheral nervous system to injury. In *Electrodiagnostic Medicine*. Ed Hanley-Belfus, Inc., Philadelphia, 341 (1994).
 68. **Durfee W.K., Palmer KI.** Estimation of force-activation, force-length, and force-velocity properties in isolated electrically stimulated muscle. *IEEE Trans Biomed Eng*, 41(3):205-16 (1994).
 69. **Edshage S.** Peripheral nerve injuries-diagnosis and treatment. *N Engl J Med*, 278(26):1431-6 (1968).
 70. **Elder GA., Friedrich VL Jr., Pereira D., Tu PH., Zhang B., Lee V., Lazzarini RA.** Mice with disrupted mid-sized and heavy neurofilament genes lack axonal neurofilaments but have unaltered numbers of axonal microtubules. *J Neurosci Res*, 57(1):23-32 (1999).
 71. **Elcin E.** Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. *Neurol Res*, 20:7648-54 (1998).
 72. **Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill G., Denoroy L., Klepper R., Guillermin R., Gospodarowicz D., Bohlen P.** Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (bFGF) and comparison with the amino-

-
- terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(19):6507-11 (1985).
73. **Escott G., Adams D.** Chitinase activity in humans serum and leukocytes. *Infect Immun*, 63(12):4770-3 (1995).
74. **Evans GR.** Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol*, 19(3):312-318 (2000).
75. **Felt O., Buri P., Gurny R.** Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*, 24(11):979-73 (1998).
76. **Forssman J.** Über die Ursachen welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nervenfasern bei der regeneration bestimmen. *Beit Pathologisc Anat allgem Pathol*, 24:56 (1989).
77. **Forssman J.** Zur kenntnis des neurotropismus. *Pathologisc Anat allgem Pathol*, 27:407 (1990).
78. **Fu SY, Gordon T.** The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 14(1-2):67-116 (1997).
79. **Gabrielsson GJ., Stenstrom SJ.** A contribution to peripheral nerve suture technique. *Plast Reconstr Surg*, 38(1):68-71 (1996).
80. **Ganong W.** Tejido excitable: Nervio. Fisiología Médica. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, 16 edición (1997) p.p. 57.
81. **Garbay B., Heape AM., Sargueil F., Cassage C.** Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 61(3):267-304 (2000).

-
-
82. **Garben JY., Cambi F., Tang X-M., Sima A.A., Vallat JM., Bosch EP., Lewis R., Shy M., Sohi J., Kraft G., Chen KL., Joshi I., Leonard DG., Johnson W., Raskind W., Dloury SR., Pratt V., Hodes ME., Bird T., Kamholz J.** Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron*, 19(1):205-18 (1997).
 83. **Genta I., Peruginini P., Pavanetto F.** Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release. *Drug Dev Ind Pharm*, 24(8):779-84 (1998).
 84. **Getty R.** Anatomía de los animals domésticos. Editorial Salvat, (1989) p.p. 2219.
 85. **Gibson KL., Strain GM., Daniloff JK.** Comparision of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and nerve allografts. *Microsurgery*, 10(2):126-9 (1989).
 86. **Gómez U.** Regeneración del nervio ciático de ratas tras axotomía tubulización con quitosana III Reunion de investigación medica del Instituto mexicano del seguro social (1998).
 87. **Gómez-Pinedo U., Chávez-Delgado M., García-Estrada J., Huerta-Viera M., Luquín de Anda S.** El biomaterial quitosana y el neuroesteroide progesterona facilitan la regeneración del nervio ciático axotomizado-tubulizado. 4ta Reunión Regional de Investigación Medica de Occidente (1998).
 88. **Gómez-Pinedo U.** Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado en ratas. *Arch Neurocién (Mex)*, 6:184-193 (2001).
 89. **González Darder, JM.;** Microneurocirugía experimental. Editorial Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cadiz, Primera edición (1992) p.p. 55:61.

-
90. **Gramsbergen A., Ijkema-Paassen J., Meek MF.** Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hind leg muscles. *Exp Neurol*, 161(1):183-93 (2000).
 91. **Grill W.M.** Intelligent systems and technologies in rehabilitation engineering. CRC Press, New York (2001). p.p. 209-241.
 92. **Guénard V., Kleitman N., Morrissey TK., Bunge RP., Aebischer P.** Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*, 12(9):3310-20 (1992).
 93. **Habbell J.** Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotech*, 98:4288-91 (1998).
 94. **Hadlock T., Elisseeff J., Langer R., Vacanti J., Cheney MA.** Tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124(19):1081-6 (1998).
 95. **Haipeng G., Yinghui Z., Jianchun L., Yandao G., Nanming Z., Xiufang Z.** Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res*, 52(2):285-95 (2000).
 96. **Hall S.** Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 190(Pt 1):57-71 (1997).
 97. **Han S.M.** Applications of chitosan. Laboratory of biomaterial science, Bioscience, Graduate School of environmental Earth Science. Hokkaid University, (2001).

-
98. **Hare GM., Evans PJ., Mackinnon SE., Bain JR., Best TJ., Szalai JP., Hunter DA.** Walking track analysis: a long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*, 89(2):251-8 (1992).
 99. **He C., Chen Z.** Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery*, 13(3):151-4 (1992).
 100. **Heumann R., Lindholm D., Bandtlow C., Meyer M., Radeke MJ., Misko T., Shooter E., Thoenen H.** Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. *Proc Nat Acad Sci USA*, 84(23):8735-9 (1987).
 101. **Hildebrad M.** Anatomía y embriología de los vertebrados. Editorial Limusa (1982), p.p. 419.
 102. **Howard CS, Blakeney DC, Medige J, Moy OJ, Peimer CA.** Functional assessment in the rat by ground reaction forces. *J Biomech*, 33(6):751-7 (2000).
 103. **Hurtado H., Knoops B., Van den Bosch de Aguilar P.** Rat sciatic nerve regeneration in a semipermeable artificial tubes. *Exp Neurol*, 97(3):751-7 (1987).
 104. **Hruska RE., Kennedy S., Silbergeld EK.** Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci*, 25(2):171-9 (1979).
 105. **Ide C.** Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*, 25(2):101-21 (1996).
 106. **Illum L.** Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15(9):1326-31 (1998).
 107. **Isaacson LG., Saffran BN., Crutcher KA.** Nerve growth factor-induced sprouting of mature sympathetic axons. *J Comp Neurol*, 326(3):327-36 (1992).

-
108. **Jabaley ME., Wallace WH., Heckler FR.** Intra-neural topography of major nerves of the forearm and hand: a current view. *J Hand Surg.* 5(1):1-18 (1980).
 109. **Jameela S., Jayakrishnan A.** Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitomycin and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, 16(10): 769-75 (1995).
 110. **Jameela S., Kumary T., Lal A., Jayakrishnan A.** Progesterone-loaded chitosan microspheres. A long acting biodegradable controlled delivery system. *J Control Release*, 52(1-2):17-24 (1998).
 111. **Johnston R., Zachary L., Dellon A.** Improved imaging of the rat hindfoot prints for walking track analysis. *J Neurosci Methods*, 38(2-3):111 (1991).
 112. **Jones KJ., Kinderman NB; Oblinger MM.** Alterations in glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels in the hamster facial motor nucleus: effects of axotomy and testosterone. *Neurochem Res*, 22(11):1359-66 (1997).
 113. **Jones KJ.,** Gonadal steroids and neuronal regeneration. A therapeutic role. *Adv Neurol*, 59:227-40 (1993)a.
 114. **Jones KJ.,** Gonadal steroids as promoting factors in axonal regeneration. *Brain Res Bull*, 30(3-4):491-8 (1993)b.
 115. **Jung-Testas I., Hu ZY., Baulieu EE., Robel P.** Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*, 125(4):2083-91 (1989).

-
116. **Jung-Testas I., Schumacher M., Robel M., Baulieu EE.** Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 48(1):145-54 (1994).
 117. **Kabbadj K., el-Etr M., Baulieu EE., Robel P.** Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia*, 7(2):170-75 (1993).
 118. **Kable W., Leonhardt H., Platzer W.** Sistema nervioso y órganos de los sentidos. In Atlas de Anatomía. Ed Omega, S.A.-Plató- Barcelona (1988) p.p. 34.
 119. **Kandel ER., Hawkins RD.** The biological bases of learning and individuality. *Sci Am*, 267(3):78-86 (1992).
 120. **Kanje M., Lundborg G., Edström A.** A new method for studies of the effects of locally applied drugs on peripheral nerve regeneration in vivo. *Brain Res*, 439(1-2):116-21 (1988).
 121. **Kas HS.** Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul*, 14(6):689-711 (1997).
 122. **Kelly BM., Gillespie CS., Sherman DL., Brophy BJ.** Schwann cells of the myelin forming phenotype express neurofilament protein NF-M. *J Cell Biol*, 118(2):397-410 (1992).
 123. **Kobayashi J., Mackinnon SE., Watanabe O., Ball D.J., Gu XM., Hunter DA., Kuzon WM.** The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*, 20(7):858-66 (1997).

-
124. **Koenig H., Schumacher M., Ferzaz B., Thi AN. Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu EE.** Progesterone Synthesis and Myelin Formation by Schwann Cells. *Science*, 268(5216):1500-3 (1995).
 125. **Kosaka T., Kaneko Y., Nakada Y., Matsuura M., Tanaka S.** Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. *J Vet Med Sci*, 58(10):963-7 (1996).
 126. **Kotzé AF., Luessen H., de Boer AG., Verhoef JC., Junginger HE.** Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci*, 7(2):145-51 (1999).
 127. **Kratz G., Arnander C., Swedenberg J., Back M., Falk C., Gouda I, Larm O.** Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scand J Plast reconstr Surg Hand*, 31(2):119-23 (1997).
 128. **Krinke. GJ.;** The laboratory rat. Academic Press (2000) p.p. 253-271, 583.
 129. **Kuang Y., Hou C., Gou S.** Experimental study of the effect on growth of Schwann cell from chitin and chitosan in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 12(2):90-3 (1998).
 130. **Kugelberg E., Edstrom L., Abbruzzese M.** Mapping of motors units in experimentally reinnervated rat muscle. Interpretation of histochemical atrophic fibre patterns in neurogenic lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 33(3):319-29 (1970).
 131. **Kubota A., Suzuki K.** Effect of liposome-mediate macrophage depletion on Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration. *J Neurotrauma*,17(9): 789-98 (2000).

-
132. **Kujawa KA., Kinderman NB., Jones KJ.** Testosterone-Induced acceleration of recovery from facial paralysis following crush axotomy of the facial nerve in male hamsters. *Exp Neurol*, 105(1):80-5 (1989).
 133. **Kumar G., Smith P., Payne G.** Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 63(2):154-65 (1999).
 134. **Lai CL., Tsai CT., Liu CK., Lain RT., Howng SL.** A Longitudinal study of central and peripheral nerve conduction in hypothyroid rat. *J Neurol Sci*, 148(2):139-45 (1997).
 135. **Langone F., Lora S., Veronese FM., Caliceti P., Parnigotto PP., Valenti F., Palma G.** Peripheral nerve repair using a poly (organo) phosphazene tubular protesinand, *biomaterials*, 16(5):347-53 (1995).
 136. **Lawrence R.** Regeneration of the axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicon chamber. *Exp Neurol*, 120:49 (1993).
 137. **Lee KY., Ha WS., Park WH.** Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials*, 15:1211-1216 (1995).
 138. **Lesson C., Lesson T.** Histology. Ed. Interamericana, 5^o Edition, (1987) pp 235-238.
 139. **Levi-Montalcini R.** Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*, 5:341-62 (1982).
 140. **Lillie RS.** Factors affecting transmission and recovery in the passive iron nerve model. *J Gen Physiol*, 7:473-477 (1925).

-
141. **Lindholm D., Heumann R., Meyer M.** Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*, 330(6149):658-9 (1987).
 142. **Lipton SA.** Growth factors for neuronal survival and process regeneration. Implications in the mammalian central. *Arch Neurol*, 46(11):1241-8 (1989).
 143. **Lorenzo-Lamosa ML., Remunan-López C., Vila-Jato JL., Alonso MJ.** Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Controlled Release*, 52(1-2):109-18 (1998).
 144. **Lowdon IM., Seeber AV., Urbaniak JR.** An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of the Medinaceli. *J Neurosci Methods*, 24(3):279-81 (1988).
 145. **Lundborg G., Longo FM., Varon S.** Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Exp Neurol*, 76(2):361-75 (1982).
 146. **Lundborg G., Dahlin LB., Danielsen N.** Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 26(3):275-9 (1991).
 147. **Lundborg G., Rosen B., Abrahamson SO., Dahlin L., Danielsen N.** Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J Hand Surg [Br]* 19(3):452-8 (1994).
 148. **Lundborg G., Dahlin LB.** Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. *Hand Clin*, 12(2):185-193.

-
149. **Lundborg G.**, 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]* 25(3):391-414 (2000).
 150. **Mackinnon SE., Dellon A., Hudson AR., Hunter DA.** Chronic nerve compression-an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg*, 13(2):112-20 (1984).
 151. **Mackinnon SE., Hudson AR., Hunter DA.** Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 75(3):384-8 (1985).
 152. **Macleoid GS., Collett JH., Fell JT.** The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *J Control Release*, 58(3):303-10 (1999).
 153. **Madison RP., Archibald SJ.** Point sources of Schwann Cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons: effects of freeze-thawing. *Exp Neurol*, 128(2):266-75 (1994).
 154. **Maquet V., Martin D., Malgrange B., Franzen R., Schoenen J., Moonen G., Jerome R.** Peripheral nerve regeneration using bioresorbable macroporus polylactide scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 52(4):639-651 (2000).
 155. **Martin LJ., Kaiser A., Price AC.** Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and apoptosis. *J Neurobiol*, 40(2):185-201 (1999).
 156. **Matsumaru Y., Hyodo A., Nose T., Hirano T., Ohashi S.** Embolic materials for endovascular treatment of cerebral lesion. *J Biomater Sci Polym*, 8(7):555-69 (1997).

-
157. **Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Nakamura T, Endo K, Shimizu Y.** 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*, 868(2):315-28 (2000).
 158. **Meek MF., den Dunnen WF., Sehakenraad JM. Robinson PH.** Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide- ϵ -caprolactone) nerve guide, using walking track analysis and electrostimulation tests. *Microsurgery*, 19(5)247-53 (1999).
 159. **Meek MF., den Dunen WF., Robinson PH., Sehakenraad JM.** Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with poly (DL-lactide- ϵ -caprolactone) nerve guide, filled with modified denatured muscle tissue. *Microsurgery* 17:555-61 (1996).
 160. **Meek MF., den Dunnen WF., Robinson PH., Pennings AJ., Sehakenraad JM.** Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a new biodegradable poly (DL- lactide- ϵ -caprolactone) nerve guide. *Int J Art Organs*, 20(8):463-8 (1997).
 161. **Melcangi R., Magnaghi V., Martini L.** Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol*, 60(3):291-308 (2000).

-
162. **Melville S., Sherburn TE., Coggeshall RE.** Preservation of sensory cells by placing stumps of transected nerve in an impermeable tube. *Exp Neurol*, 105(3):311-5 (1989).
 163. **Mi FL., Shyu SS., Chen ZT., Schoung JY.** Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microspheres and in vitro release. *Biomaterials*, 20(17):1603-12 (1990).
 164. **Miledi R, Salter CR.** On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol*, 207(2):507-28 (1970).
 165. **Millaruelo Al., Nieto-Sampedro M., Cotman CW.** Cooperation between nerve growth factor and laminin or fibronectin in promoting sensory neuron survival and neurite outgrowth. *Brain Res*, 446(2):219-28 (1988).
 166. **Millesi H., Meissl G., Berger A.** Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar, and radial nerves. *J Bone Joint Surg Am.* 58(2):209-18 (1976)
 167. **Monteiro O., Airoidi C.** Some Thermodynamic data on copper-chitin and copper-chitosan biopolymer interactions. *J Colloid Interface Sci*, 212(2):212-19 (1999).
 168. **Müller H., Williams LR., Varon S.** Nerve regeneration chamber: evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Res*, 413(2):320-6 (1987).
 169. **Müeller HW., Stoll G.** Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. *Curr Opin Neurobiol*, 11(5):557-62 (1998).

-
170. **Muzzarelli R.** Medical applications : Chitin. Pergamon Press Ltd, (1977), pp 655-667.
 171. **Muzzarelli RA., Mattioli-Belmonte M., Tietz C., Biagini R., Ferioli G., Brunelli MA., Fini M., Giardino R., Ilari P., Biagini G.** Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15(13):1075-81 (1994).
 172. **Muzzarelli RA.** Human enzymatic activities related to therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 53(2): 131-141 (1996).
 173. **Nakayama H., Noda K., Hotta H., Ohsawa H., Hosoya Y.** Effects of aging on numbers, sizes and conduction velocities on myelinated and unmyelinated fibers of the pelvic nerve in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 69(2-3):148-55 (1998).
 174. **Navarro X., Verdú E., Butí M.** Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol*, 129(2):217-24 (1994).
 175. **Ochoa J., Mair WGP.** The normal sural nerve in man I. Ultrastructure and numbers of fibers and cells. *Acta Neuropath [Berl]*, 13(3):197-216 (1969).
 176. **Onishi H., Machida Y.** Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20(2):175-82 (1999).
 177. **Park YJ., Lee YM., Park SN., Sheen SY., Chung CP., Lee SJ.** Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21(2):153-9 (2000).
 178. **Pham HN., Padilla J., Nguyen K., Rosen JM.** Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*, 7(1):31-6 (1991).

-
179. **Peluso G., Petillo O., Ranieri M., Santin M., Ambrosio L., Calabro D., Avallone B., Balsamo G.** Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, 15(15):1215-20 (1994).
 180. **Pellegrino RG., Politis MJ., Ritchie JM., Spencer PS.** Events in degenerating cat peripheral nerve: Induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol*, 15(1):17-28 (1986).
 181. **Perry VH., Lunn ER., Brown MC., Cahusac S., Gordon S** Evidence that the rate of wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur J Neurosci*, 2(5):408-13 (1990).
 182. **Plant GW., Woerly S., Harvey AR.** Hydrogels containing peptide or aminosugar sequences implanted into the rat brain: influence on cellular migration and axonal growth. *Exp Neurol*, 143(2):2287-99 (1997).
 183. **Ramon y Cajal S.** Experiments dealing with the transplantation of nerves or their products, designed to prove especially an attractive or neurotropic action on nerve sprouts. In *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Edited and translated by May, R. New York: Hafner Press, (1928); p.p. 329.
 184. **Rao SB., Sharma CP.** Sterilization of chitosan: implications. *J Biomater Appl*, 10(2):136-43 (1995).
 185. **Rao SB, Sharma CP.** Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and haemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34(11):21-8 (1997).
 186. **Rende M., Granato A., Lo Monaco M., Zelano G., Toesca A.** Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10 mm gap within an impermeable chamber. *Exp Neurol*, 111(3):332-9 (1991).

-
187. Rich KM., Luszczynski JR., Osborne PA., Johnson EM Jr. Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J Neurocytol*, 16(2):261-8 (1987).
 188. Robertson DG., Anderson RJ. Electrophysiological characteristics of tibial and sciatic nerves in the hen. *Am J Vet Res*, 47(6):1378-81 (1986).
 189. Rodriguez FJ., Ceballos D., Schüttler M., Valero A., Valderrama E., Stieglitz T., Navarro X. Polyimide cuff electrodes for peripheral nerve stimulation. *J Neurosci Methods* 98(2):105-18, (2000).
 190. Rosales Cortés M., Chavez-Delgado M., García-Estrada J., Huerta-Viera M., Gómez-Pinedo U., Luquín de Anda S. La tubulización del nervio ciático axotomizado del perro con prótesis bioactivas permite recuperar la función motora. VII Reunión nacional de Investigación médica-IMSS, (1998).
 191. Rozman J., Trlep M. Multielectrode spiral cuff for selective stimulation of nerve fibers. *J Med Eng Technol*, 16(5):194-203 (1992).
 192. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2):139-68 (2003).
 193. Saintigny G., Bonnard M., Damour O., Collombel C., Reconstruction epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice effect of fibroblast. *Acta Derm Venereol*, 73(3):175-80 (1993).
 194. Salonen V., Peltonen J., Roytta M. Virtanen I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J Neurocytol*, 16(5):713-20 (1987).

-
195. **Sanes JR.** Laminin for axonal guidance? *Nature*, 315(6022):714-5 (1985).
 196. **Scott JJ.** The functional recovery of muscle proprioceptors after peripheral nerve lesions. *J Peripher Nerve Syst*, 1(1):19-27 (1996).
 197. **Seddon H.** The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg*, (7)35:151 (1994).
 198. **Sharma CP.** Biomedical applications of chitosan. Nutrients and bioactive substances in aquatic organisms. Papers presented in the symposium held in Cochin, India (1993).
 199. **Shen F., Cui YI., Yang LF., Yao KD., Dong XH., Jia WY., Shi HD.** A study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engineering. *Polym Int* 49:1596-1599 (2000).
 200. **Shen N., Zhu J.** Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery*, 16(8):552-5 (1995).
 201. **Shenaq JM., Shenaq SM., Spira M.** Reliability of sciatic function index in assessing nerve regeneration across a 1 cm gap. *Microsurgery*, 10(3):214-9 (1998).
 202. **Shepherd R., Reader S., Falshaw A.** Chitosan functional properties. *J Glycoconj*, 14(4):535-42 (1997).
 203. **Sjöberg J., Kanje M.** The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect. *Brain Res*, 529(1-2):79-84 (1990).
 204. **Smith J.** Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*, 33:317 (1964).

-
205. **Snider WD.** Nerve growth factor enhances dendritic arborization of sympathetic ganglion cell in developing mammals. *J Neurosci*, 8 (7):2628-34 (1998).
 206. **Spector JG., Lee P., Peterein J., Roufa DG.** Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: A clinical and experimental study. *Laryngoscope*, 101(5):537-54 (1991a).
 207. **Spector JG., Lee P., Derby A., Roufa DG.** Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope*, 101(10):1109-23 (1991b).
 208. **Spector JG., Lee P., Derby A., Friedrich G., Burke JJ., Vogler GP., Roufa DG.** Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope*, 102(7):784-96 (1992).
 209. **Spector JG., Lee P., Derby A., Friedrich G., Neises G., Roufa DG.** Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope*, 103(5):548-58 (1993).
 210. **Spencer PS., Weinberg HJ., Krygier-Brevart V., Zabrebetzky V.** Anin vivo method to prepare normal Schwann cells free of axons and myelin. *Brain Res*, 165(1):119-26 (1979).
 211. **Sporel-Ozakat RE., Edwards PM., Hepgul KT., Savas A., Gispén WH.** A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci Methods* 36(2-3):263-5 (1996).
 212. **Soto E, Vega R.** Teaching field potentials: a microcomputer simulation of the nerve action potential in a bidimensional conductor. *Int J Biomed Comput*, 26(3):211-20 (1990).

-
213. **Stichel CC., Müller HW.** Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic-central nervous system injury. *Prog Neurobiol*, 56(2):19-48 (1998).
 214. **Stoll G., Griffin JW., Li CY., Trapp BD.** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. Participacion of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*, 18(5):671-83 (1989).
 215. **Suh J-K, Matthew HW.** Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*, 21(24):2589-98 (2000).
 216. **Sulaiman OA, Gordon T.** Effects of short- and long-term schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia*, 32(3):234-46 (2000).
 217. **Sunderland S.** Nerves and nerve injuries, 2 ed., (1990), Churchill-Livingdton, NY.
 218. **Sunderland S.** The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*, 13(9):771-84 (1990).
 219. **Thacharodi D, Rao K.** Development and in vivo evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propanolol hydrocholride. *Biomaterials*, 16(2):145-48 (1995).
 220. **Terris D., Fee WE Jr.** Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119(7):725-31 (1993).
 221. **Tomihata K., Ikada Y.** In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 18(7):567-75 (1997).

-
222. **Trapp BJ, Hauer P, Lemke G.** Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J Neurosci*, 8(9):3515-21 (1988).
223. **Tsai GJ., Su WH.** Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 62(3):239-43 (1999).
224. **Utey DS., Lewin SL., Cheng ET., Verity AN., Sierra D., Terris DJ.** Brain derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122(4):407-13 (1996).
225. **Ueno H., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsuura M., Okumura M., Kadosawa T., Fuginaga T.** Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20(15):1407-14 (1999).
226. **Valero-Cabr e A., Navarro X.** H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res* 919(2):302-12 (2001).
227. **van Meeteren NL., Brakkee JH., Hamers FP., Helders PJ., Gispen WH.** Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*, 78(1):70-7 (1997).
228. **van Meeteren NL., Brakkee JH., Helders PJ., Gispen WH.** The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst*, 3(4):277-82 (1998).

-
229. **Varejão AS., Meek MF., Ferreira AJ., Patrício JA., Cabrita AMS.** Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods* 108(1):1-9 (2001).
 230. **Varon S., Hagg Theo.** Models to evaluate effects of neurotrophic factors on axonal regeneration: Neurotrophic factors In: *Neuromethods*. Vol: Eds: A. Boulton, G. Bakeer, and F. Hefti. The humana Press Inc. (1993); 25:p.p. 371.
 231. **Várum KM., Holme HK., Izume M., Stokke BT., Smidsrd O.** Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochim Biophys Acta*, 1291(1):5-15 (1996).
 232. **Walker JL., Evans JM., Meade P., Resig P., Siskin BF.** Gait-stance duration as measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Methods* 52(1):47-52 (1994).
 233. **Walshe FMR.** The anatomy and physiology of cutaneous sensibility: a clinical review. *Brain*, 65:48-56 (1942).
 234. **Wang-Bennett LT., Coker NJ.** Analysis of axonal regeneration through the silicone regeneration chamber: A retrograde tracing study in the rabbit facial nerve. *Exp Neurol*, 107(3):222-9 (1990).
 235. **Wang W., Xu D.** Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol*, 16(3):149-52 (1994).
 236. **Weddell G, Glees P.** The early stages in the degeneration of cutaneous nerve fibers. *J Anat* 76:65-93 (1941).

-
237. **Werner K.** Sistema Nervioso y Órganos de los Sentidos, Ediciones Omega, (1988); tomo 2:32.
238. **Weiss P.** The technology of nerve regeneration: sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *Neurosurgery*, 1:400 (1944).
239. **Whalen LR., Spurgeon TL., Carsten RE., Gould DH.** Conduction velocities reflexes of the proximal and distal parts of the saphenus nerve of the dog. *Am J Vet Res*, 47(5):1063-70 (1986).
240. **White FV, Toews AD, Goodrum JF., Novick DL., Bouldin TW., Morell P.** Lipid metabolism during early stages of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurochem*, 52(4):1085-92 (1989).
241. **Williams LR.** Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochem Res*, 12(10):851-60 (1987).
242. **Woerly S., Petrov P., Sykova E., Roitbak T., Simonova Z., Harvey AR.** Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical and diffusion studies. *Tissue Eng*, 5(5):5467-88 (1999).
243. **Wynn C.** Physiology Book, Harper Collins Publisher, (1987);1:14.
244. **Yao M., Inserra MM., Duh MJ., Terris DJ.** A longitudinal, functional study of peripheral nerve recovery in the mouse. *Laryngoscope*, 108 (8Pt1):1141-45 (1998).
245. **Yoshimoto H., Nagano N., Nishitoba T., Sato H., Miyata S., Kusaka M.** Pharmacological properties of coated dialdehyde cellulose (Chitosan DAC) a

- newly developed oral adsorbent (I). Effect of chitosan DAC in normal rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 106(2):113-22 (1995).
246. **Young JZ, Medawar PB.** Fibrin suture of peripheral nerves. Measurements of the rate of regeneration. *Lancet* II:126 (1940).
247. **Zeltser R., Beilin B., Zaslansky R., Seltzer Z.** Comparison of autotomy behavior induced in rats by various clinically-used neurectomy methods. *Pain*, 89(1):19-24 (2000).
248. **Zhu Q., Lindenbaum M., Lavavasseur F., Jacomy H., Julien JD.** Desruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin β,β' -iminodipropionitrile. *J Cell Biol*, 143(1):183-93 (1998).

ANEXO

Estadística Descriptiva y Análisis

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: INDICE FUNCIONAL DEL NERVI0 CIÁTICO

ARCHIVO: IFC10días.dat

DISEÑO: Grupos independientes

Prueba U de Mann-Whitney (bilateral)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	-63.507	23.015	9.396	6	-67.457	67.870
a2	-67.400	3.478	1.420	6	-68.008	8.395

ANÁLISIS:

Comparación	Empates		U	p(U)
	#	%		
a1,a2	0	0.0	17.00	0.9372

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: INDICE FUNCIONAL DEL NERVI0 CIÁTICO

ARCHIVO: IFC30días.dat
DISEÑO: Grupos independientes
Prueba U de Mann-Whitney (bilateral)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	-81.141	7.314	2.986	6	-81.315	20.004
a2	-89.557	9.898	4.041	6	-88.696	26.210

ANÁLISIS:

Comparación	Empates		U	p(U)
	#	%		
a1,a2	2	16.7	9.00	0.1797

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: INDICE FUNCIONAL DEL NERVI0 CIÁTICO

ARCHIVO: IFC60días.dat
DISEÑO: Grupos independientes
Prueba U de Mann-Whitney (bilateral)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	-74.601	34.797	14.206	6	-93.490	77.615
a2	-79.624	10.294	4.203	6	-80.640	28.038

ANÁLISIS:

Comparación	Empates		U	p(U)
	#	%		
a1,a2	2	16.7	12.00	0.3939

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN NERVIOSA

ARCHIVO: VCNmxs10.dat

DISEÑO: Grupos independientes

Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	42.600	0.245	0.100	6	42.700	0.600
a2	40.300	2.475	1.011	6	41.300	6.400
a3	39.648	1.022	0.417	6	39.680	2.820

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	28.85	2	14.43	5.98	0.0123
Intra grupos (error)	36.17	15	2.41		
Total	65.02	17			

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN NERVIOSA

ARCHIVO: VCNmxs30.dat
DISEÑO: Grupos independientes
Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	40.550	2.699	1.102	6	41.300	7.900
a2	36.000	1.498	0.612	6	36.000	4.000
a3	39.648	1.022	0.417	6	39.680	2.820

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	69.65	2	34.83	9.88	0.0018
Intra grupos (error)	52.86	15	3.52		
Total	122.51	17			

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN NERVIOSA

ARCHIVO: VCNmxs60.dat
DISEÑO: Grupos independientes
Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	40.667	1.680	0.686	6	41.300	4.400
a2	38.350	3.657	1.493	6	40.400	8.400
a3	39.648	1.022	0.417	6	39.680	2.820

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	16.18	2	8.09	1.41	0.2752
Intra grupos (error)	86.20	15	5.75		
Total	102.37	17			

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VOLTAJE

ARCHIVO: VOLTAJE10.dat
DISEÑO: Grupos independientes
Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	0.833	0.408	0.167	6	1.000	1.000
a2	1.000	0.000	0.000	6	1.000	0.000
a3	7.833	1.169	0.477	6	8.000	3.000

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	191.44	2	95.72	187.28	0.0000
Intra grupos (error)	7.67	15	0.51		
Total	199.11	17			

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VOLTAJE

ARCHIVO: VOLTAJE30.dat

DISEÑO: Grupos independientes

Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	2.167	0.408	0.167	6	2.000	1.000
a2	3.500	1.225	0.500	6	3.000	3.000
a3	7.833	1.169	0.477	6	8.000	3.000

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	105.33	2	52.67	52.09	0.0000
Intra grupos (error)	15.17	15	1.01		
Total	120.50	17			

ESTADIS (versión 1.1)

TITULO: VOLTAJE

ARCHIVO: VOLTAJE60.dat

DISEÑO: Grupos independientes

Análisis de Varianza (un factor)

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS:

Grupo	Media	Desv St	Err St	n	Mediana	Rango
a1	4.333	0.516	0.211	6	4.000	1.000
a2	6.167	1.329	0.543	6	6.000	3.000
a3	7.833	1.169	0.477	6	8.000	3.000

ANÁLISIS:

Fuentes de Varianza	SC	GL	MC	F	p(F)
Entre grupos (tratamientos)	36.78	2	18.39	16.23	0.0002
Intra grupos (error)	17.00	15	1.13		
Total	53.78	17			