



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS

REORGANIZACION DEL NERVI0 CIATICO DE RATAS
TUBULIZADO CON PROTESIS BIOACTIVAS DE QUITOSANA
Y ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

Q.F.B. ULISES ALFONSO GOMEZ PINEDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. en C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

ASESORES DE TESIS:

M. en C. MARIA ESTELA CHAVEZ DELGADO

Dr. en C. JUAN MORA GALINDO

Dra. en C. MA. SONIA LUQUIN DE ANDA

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO. SEPTIEMBRE, 2000



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS

REORGANIZACION DEL NERVI0 CIATICO DE RATAS
TUBULIZADO CON PROTESIS BIOACTIVAS DE QUITOSANA
Y ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN A NEUROCIENCIAS
PRESENTA

Q.F.B. ULISES ALFONSO GOMEZ PINEDO

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO. SEPTIEMBRE, 2000

El trabajo se realizó con financiamiento del Programa de Investigación Regional **SIMORELOS** con acuerdo número 972490002 y fue desarrollado en los laboratorios de:

- ❖ *Laboratorio de Polímeros*, a cargo del Dr. en C. Fernando Lopez-Dellamary. IMCyP / UdeG. Guadalajara, México.
- ❖ *Laboratorio de Biología Celular*, a cargo del Dr. en C. Juan Mora Galindo. CIBO / IMSS. Guadalajara, México.
- ❖ *Laboratorio de Neuropatología*, a cargo del Dr. en C. Javier de Felipe Orquieta. Instituto Santiago Ramón y Cajal / CSIC. Madrid, España.
- ❖ *Laboratorio de Neuroendocrinología Celular*, a cargo del Dr. en C. Luis Miguel García Segura. Instituto Santiago Ramón y Cajal / CSIC. Madrid, España.
- ❖ *Laboratorio de Neuroendocrinología Celular*, a cargo del Dr. en C. Joaquín García Estrada. CIBO/IMSS. Guadalajara, México.

Investigador Responsable de la Dirección de Tesis de Maestría.

Dr. en C. Joaquín García Estrada. División de Neurociencias. CIBO/IMSS

Dirección:

Monte Blanco 300 -44340. Guadalajara Jal., MEXICO.

Tel. 638 92 49 Telefax: 638 92 49

E-mail : jgarciae@udgserv.cencar.udg.mx

Dedicada a mis abuelos: **Zerapio, María, Guadalupe y Rafaela**, que forjaron el espíritu, carácter y principios de mis padres **Jesús y Zenaida** a quienes debo la vida, brindándome el deseo de superarme y seguir adelante, dándome todo sin pedir nada a cambio.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos que siempre están a mi lado en todos los momentos difíciles de mi vida, apoyándome en todas mis decisiones.

A los doctores Joaquín, Sonia, Estela y Juan Mora que me dieron la confianza y paciencia para transmitirme sus conocimientos y experiencias, así como su valiosa amistad.

A la *Universidad de Guadalajara* y al *Instituto Mexicano del Seguro Social* por darme un espacio en donde formarme.

A tí que aunque no estés a mi lado y que siempre estás conmigo.

Y por último agradezco profundamente a mis compañeros y amigos que estuvieron aguantando mi mal genio y mis buenos momentos: al máster Oscar González, a las biólogas Rocío González y Martha Morales, a los MVZ Azucena Cárdenas y Víctor Gómez, así como a los doctores Jacinto Bañuelos, Alicia Martínez, Rodrigo Ramos, Jorge Peregrina, Jorge Chuck, Pedro Garzón, Fernando Lopez-Dellamary, Alicia Navarro, Luis Miguel García, Javier de Felipe, Miguel Macías, Elena Sánchez, Laura Pacheco, Carmen Gómez, Angélica González, Delia Flores y a todos mis maestros del posgrado.

INDICE

RESUMEN.....	VIII
ABREVIATURAS	IX
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 DESCRIPCION ANATOMICA E HISTOLOGICA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO.....	1
1.1.1 MEDULA ESPINAL.....	1
1.1.2 FIBRAS NERVIOSAS.....	3
1.1.3 NERVIOS PERIFERICOS.....	5
1.2 ANTECEDENTES DE RECURSOS TENICOS-QUIRURGICOS EN LA REGENERACION NERVIOSA.....	6
1.2.1 REPARACION NERVIOSA MEDIANTE TUBULIZACION.....	9
2 ANTECEDENTES.....	12
2.1 ANATOMIA DEL NERVIJO CIATICO DE LA RATA.....	12
2.2 DEGENERACION Y REGENERACION NERVIOSA.....	13
2.2.1 DEGENERACION DEL TEJIDO NERVIOSO EN RESPUESTA A LESION...	13
2.2.2 EVENTOS CELULARES EN LA DEGENERACION WALLERIANA	13
2.2.3 DEGENERACION NEURONAL RETROGRADA.....	15
2.3 REGENERACION NERVIOSA.....	17
2.3.1 EVENTOS CELULARES EN LA REGENERACION NERVIOSA.....	18
2.3.2 ESTADIOS REGENERATIVOS EN NERVIOS TUBULIZADOS.....	22
2.4 UTILIZACION DE BIOMATERIALES EN EL AREA BIOMEDICA.....	24
2.4.1 PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA QUITOSANA.....	25
2.4.2 APLICACIONES DE LA QUITOSANA EN EL AREA BIOMEDICA.....	26
2.5 NEUROESTEROIDES.....	27
2.5.1 ESTEROIDES NEUROACTIVOS EN LA REGENERACION NERVIOSA.....	27

3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
4	HIPOTESIS.....	33
5	OBJETIVO GENERAL.....	33
	5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
6	METODOLOGIA.....	34
	6.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	34
	6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
	6.3 MANUFACTURA DE TUBOS PARA PROTESIS DE QUITOSANA.....	38
	6.4 LOCALIZACION DEL DOMINIO MEDULAR DEL NERVI0 CIATICO MEDIANTE MARCAJE RETROGRADO CON PEROXIDASA DE RAIZ FUERTE (HRP).....	40
	6.5 TECNICAS QUIRURGICAS.....	42
	6.5.1 OVARIECTOMIA.....	42
	6.5.2 IMPLANTACION DE CAPSULAS DE SILICONA PARA LIBERACION PROLONGADA DE PROGESTERONA.....	42
	6.5.3 AXOTOMIA-TUBULIZACION.....	43
	6.6 INDICE FUNCIONAL DEL NERVI0 CIATICO.....	45
	6.7 PREPARACION DE TEJIDOS PARA ANALISIS MEDIANTE MICROSCOPIA DE LUZ Y MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.....	47
	6.7.1 DISECCION DE TEJIDOS.....	47
	6.7.2 INCLUSION EN RESINAS EPOXICAS.....	48
	6.8 ESTUDIO HISTOQUIMICO CON LA TECNICA DE NISSL.....	50
7	RESULTADOS.....	51
	7.1 INDICE FUNCIONAL DEL NERVI0 CIATICO.....	51
	7.2 SUPERVIVENCIA NEURONAL.....	53
	7.3 ANALISIS CON MICROSCOPIA DE LUZ DEL NERVI0 EN REGENERACION.....	54
	7.4 ESTUDIO A LOS 90 DIAS POSLESION DEL SEGMENTO MEDIO DEL NERVI0 EN REGENERACION MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.....	60

8	DISCUSION.....	69
9	CONCLUSIONES.....	77
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78

RESUMEN.

Antecedentes: Mediante tubulización con silicona es posible reparar lesiones de nervios periféricos menores de 3 cm, para mayores distancias, o lesiones de nervios craneales se han empleado compuestos bioactivos como la "quitosana". En este trabajo fue usada para tubulizar el nervio ciático de ratas, es un homopolímero lineal resultante de la desacetilación de la quitina, es absorbible, hipoalergénica e inmunoestimulante y pueden modificarse sus propiedades físicas. Asociamos sus cualidades con el neuroesteroide progenitor progesterona, debido a sus propiedades neurotróficas y su capacidad para estimular la síntesis de mielina en nervios lesionados. **Objetivo:** Restaurar la citoarquitectura completa del nervio ciático axotomizado de ratas adultas mediante tubulización con prótesis bioactivas de quitosana y tratamiento con progesterona. **Métodos:** Grupos de siete ratas *Swiss-Wistar* hembras fueron castradas, 30 días después recibieron implantes subcutáneos con aceite de sésamo (vehículo), ó 15 mg de progesterona, 15 días después fueron seccionados 9 mm del nervio ciático. El nervio fue tubulizado con prótesis de silicona o "quitosana" para formar una cámara de crecimiento axónico, en cuyo interior se depositó el vehículo (aceite de sésamo), ó 500 µg de progesterona disuelta en aceite, 10 días después de la axotomía-tubulización se evaluó el *Índice funcional del nervio ciático* (IFC) y, posteriormente, cada 10 días durante un periodo de 90 días. Una parte de los animales controles y experimentales fueron sacrificados por perfusión intracardiaca a los 60 y 90 días para fijarlos con 4% de paraformaldehído, se diseccionaron los segmentos lumbares L4-L6 y se hizo tinción de Nissl para analizar la población neuronal. Los crecimientos nerviosos fueron incluidos en resinas epóxicas, se obtuvieron cortes de 1µm de espesor para análisis histopatológico y cuantificación del porcentaje de área ocupada por mielina, diámetro fascicular y porcentaje de axones mielinizados. En estos mismos tejidos, en cortes de 70 nm se realizó un análisis ultraestructural para la identificación de componentes celulares en el nervio regenerado, así como un estudio cuantitativo del calibre axónico y número de axones por campo visual cuantificado (368 µm²). **Resultados:** La lesión no afectó las neuronas axotomizadas en el dominio medular del nervio ciático en ninguno de los grupos, la prótesis de "quitosana" fue bien tolerada y resultó sensible a la acción de lisozimas tisulares, los crecimientos nerviosos mostraron una estructura semejante a la de un nervio intacto en los animales tubulizados con quitosana y tratados con progesterona. El IFC mejoró desde los 20 días poslesión en todos los grupos de animales controles y experimentales, los mejores resultados se observaron en las ratas tratadas con progesterona y tubulizadas con quitosana. El estudio a nivel ultraestructural, en los grupos de animales tubulizados con silicona ó quitosana reveló axones de diferentes tamaños, así como vainas de mielina de tamaño y definición variable, en cambio el grupo de animales bajo el efecto del neuroesteroide progesterona y tubulizados con quitosana mostraron axones de mayor tamaño y vainas de mielina homogéneas en su espesor, siendo estas similares a las observadas en el grupo control intacto. Además se observaron efectos favorables en el grupo de animales tubulizados con prótesis de quitosana y bajo el efecto del neuroesteroide progesterona al cuantificar el calibre axónico, los valores se mantuvieron cercanos a la normalidad. Lo que no sucedió con los grupos control silicona y control quitosana ($p < 0.05$); a su vez, al realizar el análisis del número de axones por campo visual cuantificado (368 µm²), el grupo control quitosana fue el único que mostró un incremento significativamente estadístico en comparación al grupo control intacto ($p < 0.05$). **Conclusiones** 1- La progesterona facilitó la regeneración del nervio ciático de ratas axotomizado y tubulizado con prótesis de silicona o "quitosana". 2- El uso de "quitosana" produjo mejores resultados que la silicona, sobre la regeneración del nervio lesionado. Sin embargo estos fueron mejores bajo la influencia del neuroesteroide progesterona. 3- La utilización de quitosana y progesterona favorecieron la recuperación funcional del nervio ciático lesionado. 4- La ausencia de efectos secundarios atribuibles a la presencia de la prótesis de quitosana, que podrían haberse evidenciado mediante las técnicas de análisis utilizadas y los hallazgos morfológicos indicativos de regeneración nerviosa permiten proponer la utilización del biomaterial "quitosana" en la reparación de nervios de otras especies animales.

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ANOVA	Análisis de Varianza
BDNF	Factores de Crecimiento Derivados del Cerebro
bFGF	Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos
CAM	Moléculas de Adhesión Celular
CNPasa	Nucleotido 2'3-ciclico 3-fosfodiesterasa
DAB	3'3' Diaminobencidina
DHA	Dehidroepiandrosterona
FB	Fibroblasto
FNT	Factores Neurotróficos
FPN	Factor Promotor de Neuritas
GABA_A	Acido Gama Amino-butírico
GAP-43	Proteína de Crecimiento Axónico 43
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
HRP	Peroxidasa de Raíz Fuerte
IFC	Indice Funcional del Nervio Ciático
IGF-1	Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina Tipo 1
IL-1	Interleucina 1
ip	Intraperitoneal
LMN	Laminina
LTB₄	Leucocotrienio 5, 12-Dihidroxi
MAG	Glicoproteína Asociada a la Mielina
MBP	Proteína Básica de Mielina
mRNA	Mensajero de Acido Ribonucléico
N-CAM	Moléculas de Adhesión Celular - Neural
N-Caderina	Caderina Neural
NGF	Factor de Crecimiento Neural
P0	Proteína Zero

PGE₂	Prostaglandinas E2
PMN	Polimorfonucleares
PMP22	Proteína Periférica de Mielina 22
PREG	Pregnenolona
PROG	Progesterona
RIA	Radioinmunoanálisis
Sc	Subcutáneo
S.E.	Error Estándar
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina

"REORGANIZACION DEL NERVI0 CIATICO DE RATAS
TUBULIZADO CON PROTESIS BIOACTIVAS DE QUITOSANA
Y ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL".

CUCRA



BIBLIOTECA CENTRAL

1 INTRODUCCION

1.1 DESCRIPCION ANATOMICA E HISTOLOGICA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO.

El sistema nervioso periférico está formado por los nervios, algunos de ellos transmiten de la periferia al centro las impresiones sensoriales y sensitivas, otros llevan el influjo nervioso motriz del centro a la periferia.

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 son pares, se desprenden del neuroeje (medula espinal) a distintos niveles, y se distribuyen simétricamente, en su trayecto emiten arborizaciones colaterales y terminales al final (Getty, 1986; Hildebrad, 1982).

1.1.1 MEDULA ESPINAL.

La medula espinal es una masa cilíndrica, alargada de tejido nervioso que ocupa dos tercios superiores del conducto raquídeo, está protegida por las vértebras y ligamentos y por las meninges que contienen líquido cerebro-espinal. En un corte transversal se distingue una masa interna de sustancia gris en forma de H (Fig. 1) rodeada por sustancia blanca (Werner, 1988; Lesson, 1987). Los brazos superiores de la H son las astas dorsales de materia gris y los inferiores más cortos y anchos, las astas ventrales. Los cuerpos neuronales de asociación que establecen sinapsis con las fibras somáticas sensoriales se localizan en el lado medio de una asta dorsal, los cuerpos neuronales que establecen sinapsis con las fibras viscerales están localizados en una zona más pequeña, lateral y ligeramente más ventral de la columna dorsal, los somas de las neuronas motoras somáticas se encuentran en las columnas ventrales. Finalmente, los somas neuronales motores viscerales se encuentran en una zona pequeña, intermedia y lateral. La comisura de sustancia gris, justamente arriba y debajo del canal central, hace el brazo intermedio de la H y proyecta fibras de un lado de la médula hacia el otro (Getty, 1986; Hildebrad, 1982; Ganong, 1997).

La sustancia blanca externa está 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; 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 (Getty, 1986; Hildebrand, 1982; Ganong, 1997). Además de somas de neuronas motoras y sensitivas, en la medula espinal están presentes astrocitos, células de microglia y fibras mielinizadas y no mielinizadas (Lesson, 1987).

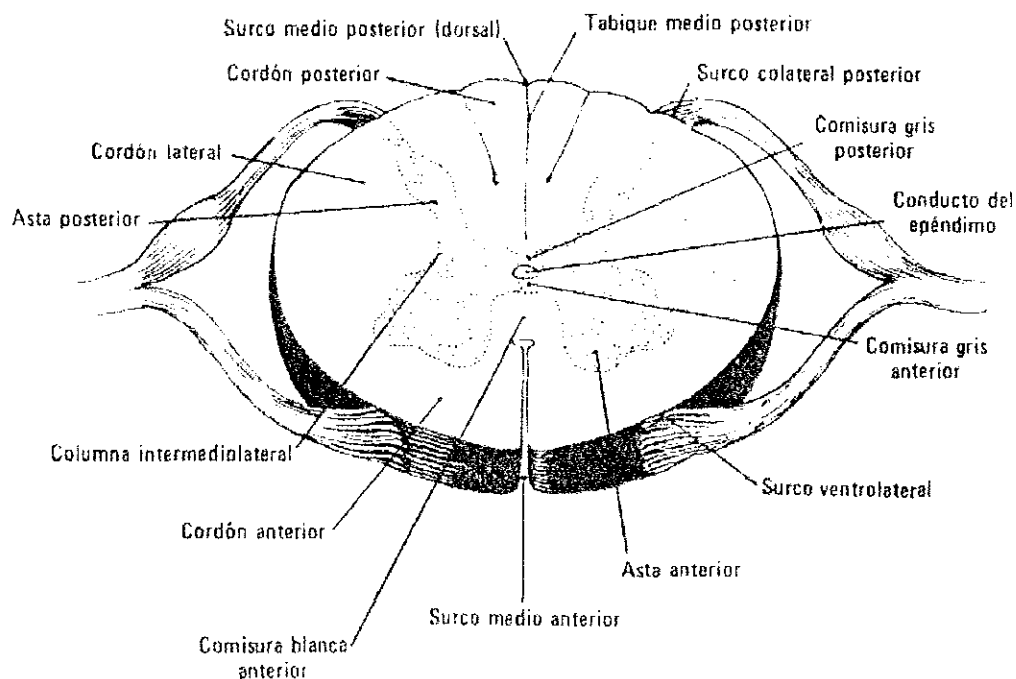


Fig.1 Corte transversal de la medula espinal, pueden identificarse las principales partes anatómicas que la componen.

1.1.2 FIBRAS NERVIOSAS.

Un nervio periférico está formado por la agrupación de fibras nerviosas, resultando un diferente número de fascículos con distintos tamaños, los fascículos están rodeados por tejido conectivo, en un corte transversal del nervio se distinguen tres estructuras; el epineuro, - rodea a los fascículos, perineuro, - cubre la totalidad del fascículo (agrupamiento de axones) y el endoneuro, - envuelve individualmente cada axón (Kable, 1986, Dumitru, 1994) (Fig. 2).

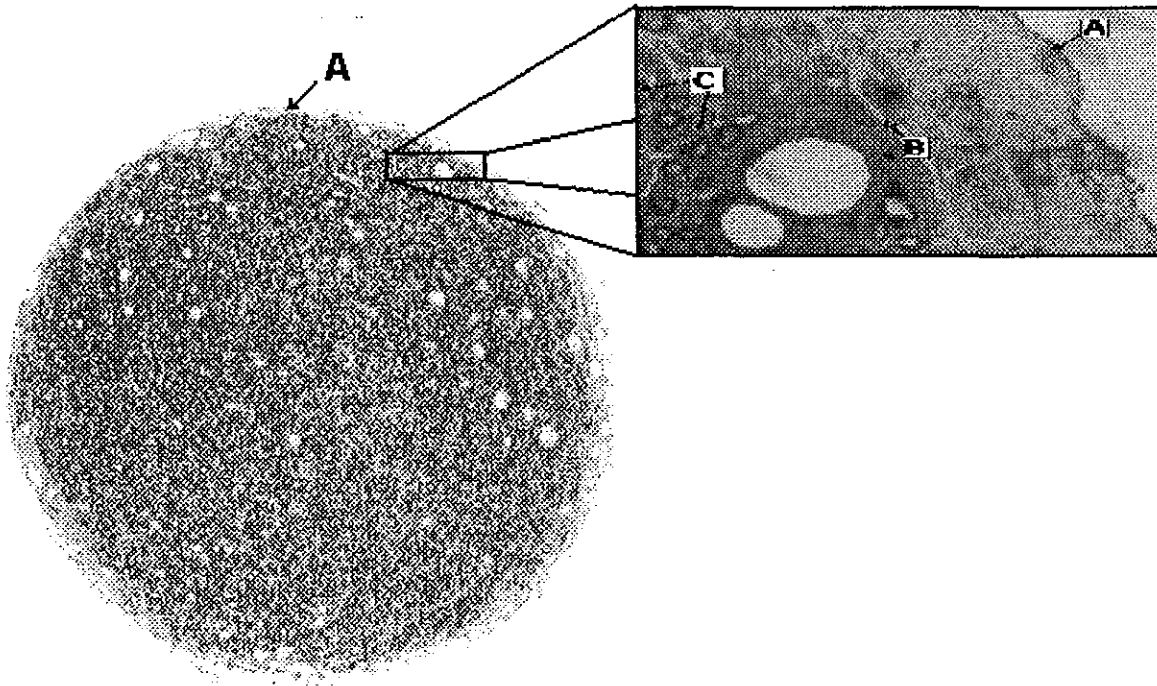


Fig. 2 Corte transversal del nervio ciático de ratas a baja amplificación, se muestran los elementos del tejido conectivo que forman tres compartimentos principales. A) Epineuro, B) Perineuro y C) Endoneuro.

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 (Ochoa, 1969; Dumitru, 1994). 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 (Bernadette, 1992; Pinzhang y col., 1998; Elder y col., 1999; 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 (Ochoa, 1969; Spector y col., 1993; Dumitru, 1994); entre las envolturas de tejido conectivo del nervio periférico se distinguen fibroblastos, fibras de colágena, macrófagos y mastocitos (Kable y col., 1988; Varon y Theo, 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 (Ochoa, 1969). Estudios en el nervio sural humano revelaron un 91.8% de células de Schwann y 8.2% de fibroblastos (Ochoa, 1969).

En general, a mayor diámetro del axón, mayor velocidad de conducción; los axones más gruesos participan sobre todo en la transmisión de sensaciones propioceptivas, en las funciones motoras somáticas y en la sensibilidad consciente al tacto y presión. Los axones más delgados se ocupan de las sensaciones dolorosas y de la temperatura, así como de las funciones autónomas (Ganong, 1997). Por otra parte, cuando se produce una lesión en los axones de diámetro pequeño resulta el

mayor porcentaje de regeneración, en fibras nociceptivas y pseudomotoras la reinervación es más temprana; esto quizá depende de la capacidad que tienen estos axones de atravesar el sitio de lesión (Navarro y col., 1994).

1.1.3 NERVIOS PERIFERICOS

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 a nivel de los nodos de Ranvier, formando una cubierta entre ellos, en contraste con lo que sucede en las fibras centrales (Wynn-Kapit, 1987), (Fig. 3).

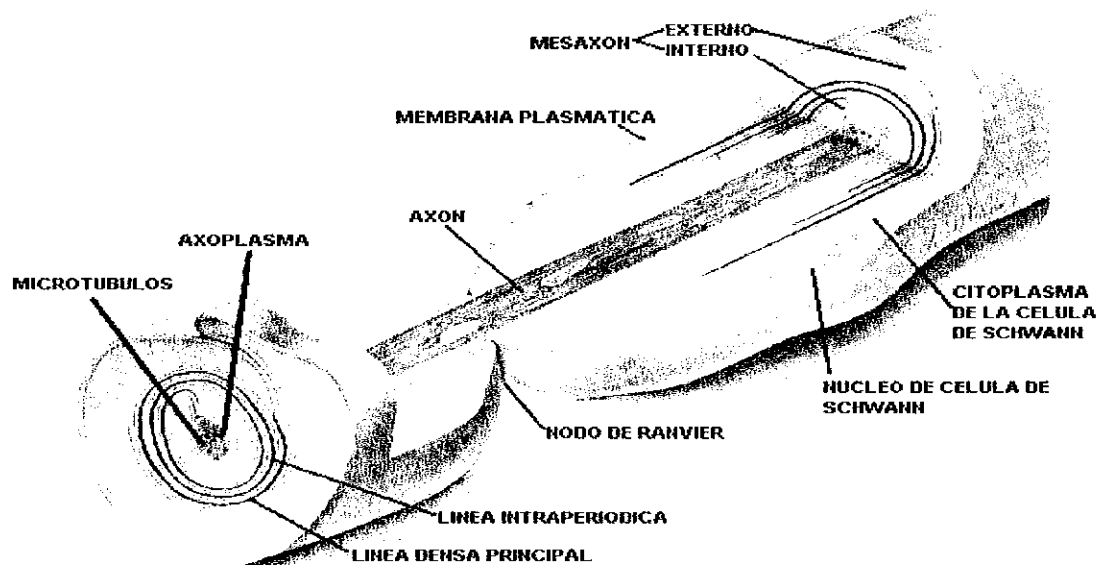


Fig.3 Esquema de un nervio periférico.



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, 1993).

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 (Warner-Kahle, 1988).

1.2 ANTECEDENTES DE RECURSOS TECNICOS-QUIRURGICOS EN LA REGENERACION NERVIOSA.

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; 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 600 DC., Paul de Argina, realizó la primera reparación nerviosa mediante suturas; técnica quirúrgica conocida hoy como neurorrafía, - aproximación de los segmentos del nervio lesionado mediante sutura (Paparella, 1982). Enseguida

Waller, en 1850, introdujo estudios sobre regeneración y degeneración de nervios periféricos. Posteriormente Seddon, en 1947, introdujo los injertos nerviosos –técnica quirúrgica mediante la implantación de aloinjertos y autoinjertos nerviosos debido a pérdida de segmento nervioso, cuya reparación no es posible mediante neurorráfia (Seddon, 1947). Highet y Sanders en 1952 propusieron técnicas de elongación para eliminar la tensión en la reparación de nervios y posteriormente se iniciaron los injertos nerviosos vascularizados (Paparella, 1982). Con la introducción de la microcirugía se mejoraron las técnicas quirúrgicas (Smith, 1964) así; Langley y Hashimoto en 1968, 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 (Millesi y col., 1972).

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

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., 1964; Bratton y col., 1989; Giddens y col., 1989); 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 (Nishihira y col., 1989) y el uso de láser (Maragh y col., 1988), 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 (Lawrence, 1987; Müller y col., 1987; Seville y col., 1988; Sjöberg y col., 1989, 1990; Chen y col., 1989; Bates y col., 1991;

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) (Lipton y col., 1989; Brian, 1991); que influye favorablemente sobre la regeneración neural (Snider y col., 1988), 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), (Sjöberg y col., 1989).

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 (Terris y col., 1993; Jones, 1993, 1997; Barakat-Walter, 1999) 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 y Robel, 1990, 1994, 1995; Baulieu, 1997; Desarnaud, 1998; Rainer, 1999), debido a que se sintetizan "de novo" en el tejido nervioso, independientemente de la actividad esteroidogénica glandular periférica, entre los principales se encuentran las moléculas progenitoras; - pregnenolona (Kabbadj y col., 1993), progesterona, (Jung-Testas, 1995; Koenig, 1995) y dehidroepiandrosterona (Akwa y col., 1993), todos ellos producen efectos benéficos en la regeneración del nervio facial y ciático de roedores (Chávez-Delgado y col., 1997; 1998ab; Gómez-Pinedo y col., 1997, 1998ab; Baulieu, 1997; Desarnaud, 1998; Rainer, 1999).

1.2.1 REPARACION NERVIOSA MEDIANTE TUBULIZACION.

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). 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 neurorráfia (Brian, 1991).

La cámara de tubulización (Fig. 4) 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 celulares y moleculares de regeneración (Salonen y col., 1987; Williams, 1987; Bates y col., 1991; Kanje y col., 1988, Danielsen y col., 1991; Lundborg y col., 1982, 1994; Baley y col., 1993; Zhong y col., 1995). 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 (Chen y col., 1989; Chongliang y col., 1992; Spector y col., 1991, 1993; Varon, 1993; Lundborg y col., 1994).

Los compuestos utilizados en la tubulización varían desde materiales sintéticos como la silicona (Spector y col., 1991, 1992, 1993), Gortex (Terris y col., 1993), millipore (Campbell y col., 1961), surgicel (Gabrielson y col., 1966), colágena (Braun y col., 1966), ácido poliglicólico (Pham y col., 1991), hasta materiales endógenos como duramadre, vena y componentes de membrana basal (Terris y col., 1993; Brian y col., 1991).

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; 1998ab; Gómez-Pinedo y col., 1997; 1998 ab; Rosales-Cortes y col., 1997;1998).

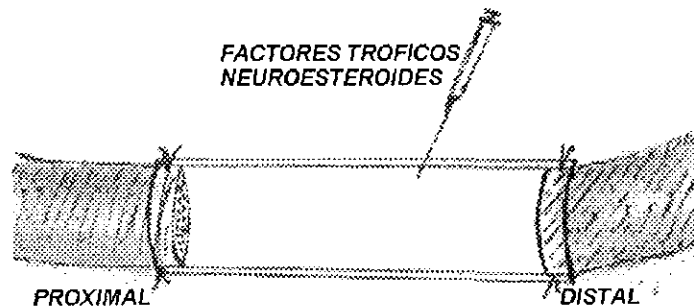


Fig 4. Modelo de tubulización para nervios axotomizados

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., 1991).

b. Permite que se concentren los factores tróficos y compuestos mitógenos naturalmente producidos por los tejidos lesionados (Varon, 1993; Spector y col., 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 (Salonen y col., 1987; Baley y col., 1993), fibronectina (Williams y col., 1987; Baley y col., 1993), solución salina y plasma (Spector y col., 1991, 1993), factores neurotróficos (FNT), factor promotor de neuritas (FPN)(Chen y col., 1989, 1995; Chongliang, 1992; Spector y col., 1993; Varon, 1993), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF)(Danielsen y col., 1988; Bates y col., 1991), IGF-I (Sjöberg y col., 1989) y hormona tiroidea (T3) (Barakat-Walter, 1999), entre los principales.

A partir 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., 1991; 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. (Williams y col., 1987; Spector y col., 1991, 1993; Lundborg y col., 1994).
- 3- el uso de diferentes sustancias tróficas como el NGF (Kanje y col., 1988; Chongliang, 1992).
- 4- implante de prótesis elaboradas con materiales sintéticos o biomateriales (Brain, 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; Dahilin y col., 1988; Douglas y col., 1989; Spector y col., 1992; Rende y col., 1991).

En cámaras axónicas de 10 mm de longitud se han obtenido resultados favorables en la regeneración nerviosa; debido a una organización adecuada de la matriz de fibrina (William 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 (William, 1987 ab; Rende y col., 1991; Hentz y col., 1993).

2 ANTECEDENTES

2.1 ANATOMIA DEL NERVIJO CIÁTICO DE LA RATA.

El nervio ciático de la rata está formado por dos componentes, el nervio peroneo fibular común y el tibial. Al principio de su recorrido, constituyen un solo tronco, atraviesan la pelvis por el orificio infrapiriforme envueltos por una vaina de tejido conectivo y el nervio ciático pasa profundamente al músculo glúteo mayor se dirige hacia la rodilla, y se coloca en posición dorsal al músculo obturador interno, cuadrado femoral y aductor mayor.

DESCRIPCION HISTOLÓGICA.

El nervio ciático de la rata a nivel del muslo medio es monofascicular, las fibras nerviosas periféricas están rodeadas por fibrillas de colágena de trayecto longitudinal, junto con la membrana basal forman la vaina endoneural. Las fibras nerviosas están inmersas en una masa de tejido conectivo laxo, -el endoneuro. Un número variable de las fibras se agrupan constituyendo fascículos que están envueltos por el perineuro, compuesto principalmente por fibras conjuntivas circulares.

La capa más interna del perineuro está formada por células endoteliales dispuestas en varios estratos muy finos, ellas poseen una membrana basal sobre sus caras perineural y endoneural y se mantienen juntas mediante uniones herméticas; de este modo constituyen una barrera entre el nervio y los tejidos adyacentes, de modo semejante al endotelio de los capilares cerebrales, -elemento estructural de la barrera hemato-cerebral (Werner-Kahle, 1988; Wynn-Kapit, 1987).

2.2 DEGENERACION Y REGENERACION NERVIOSA.

2.2.1 DEGENERACION DEL TEJIDO NERVIOSO EN RESPUESTA A LESION.

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).

2.2.2 EVENTOS CELULARES EN LA DEGENERACION WALLERIANA.

En 1850 Waller describió la reacción neural en respuesta a lesión, fenómeno conocido como *degeneración Walleriana* (citado en Chaudhry y col., 1992; Dumitru, 1994) (Fig. 5). Los cambios inician con la desintegración de los componentes estructurales del citoesqueleto axonal (Chaudhry y col., 1992; Dumitru, 1994; Bajrovic y col., 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 (Chaudhry y col., 1992).



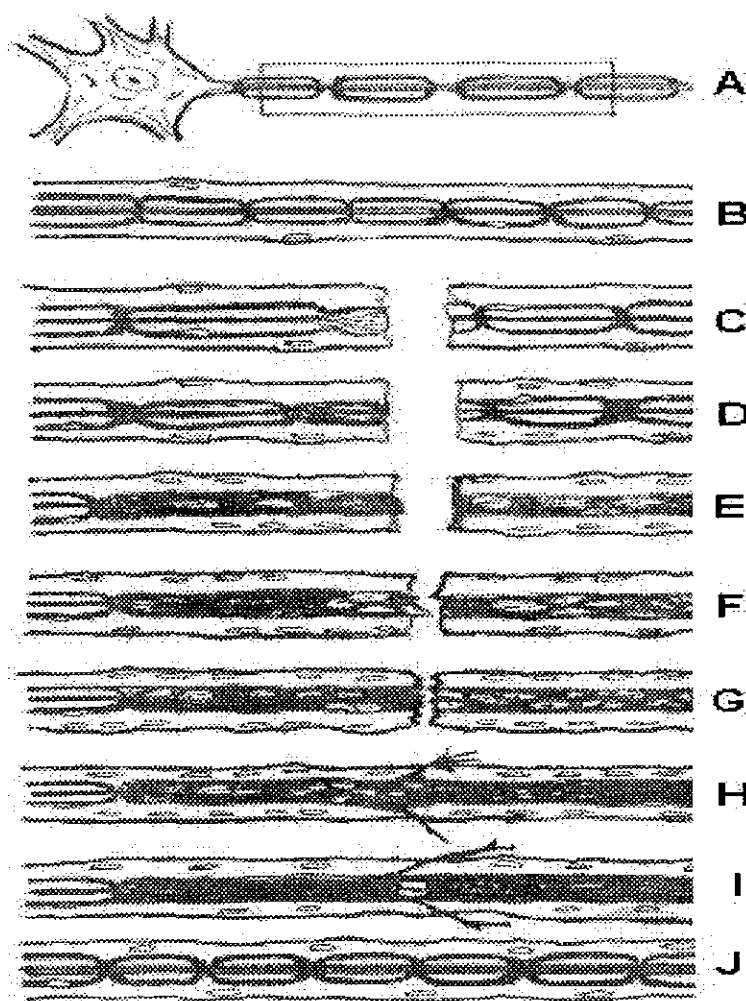


Fig. 5 Eventos celulares en la degeneración Walleriana. A. Nervio normal; B. Porción amplificada del nervio en recuadro; C. Apariencia del nervio dentro de los primeros días después de la sección; D. Cambios de componentes estructurales del citoesqueleto axonal; pérdida de axoplasma y desintegración de organelos con fragmentación de membranas; E. Fragmentación del axón y mielina, mitosis de células de Schwann; F, G. Células de Schwann forman un puente entre los extremos proximal y distal, se inicia la regeneración nerviosa con avance de conos de crecimiento nervioso; H. Crecimiento del axón distalmente a través de células de Schwann y fibroblastos proliferantes; I, J. Se establece la continuidad neuronal, el diámetro axónico es menor que el original. (Clinical Neurology, Amsterdam, North Holland, Vol, 7, 1970, pp 197).

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 hr. (Miledi y col 1970), mientras que en humanos y gatos el axoplasma permanece intacto por varios días (Stoll y col., 1989; Pellerino y col., 1986). 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; Dimitru, 1994); continúa la degeneración de la vaina de mielina, se reduce la síntesis de lípidos (White y col., 1989; Dimitru, 1994) 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 (Hann y col., 1989). 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), pueden encontrarse macrófagos desde las primeras 24 hr posteriores a la lesión nerviosa y su número aumenta progresivamente durante los primeros días poslesión (Stoll y col., 1989; Dimitru, 1994).

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).

2.2.3 DEGENERACION NEURONAL RETROGRADA.

También se conoce como reacción axonal, degeneración axonal, degeneración retrógrada o cromatolisis central (Fig. 6). El tipo de respuesta depende

de la severidad de la lesión (Wang-Bennett y col., 1990; Martin y col., 1999), 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 organelos membranosos, excentricidad nucleolar y marginación de la heterocromatina. En este estadio, la célula puede recuperarse (cromatosíntesis) (Kujawa y col., 1989; Jones, 1993), ó continuar con la cromatolisis, hasta completar los cambios degenerativos: estallamiento de membrana plasmática, expulsión de organelos, retracción y condensación de fragmentos de membranas (Dimitru, 1994).

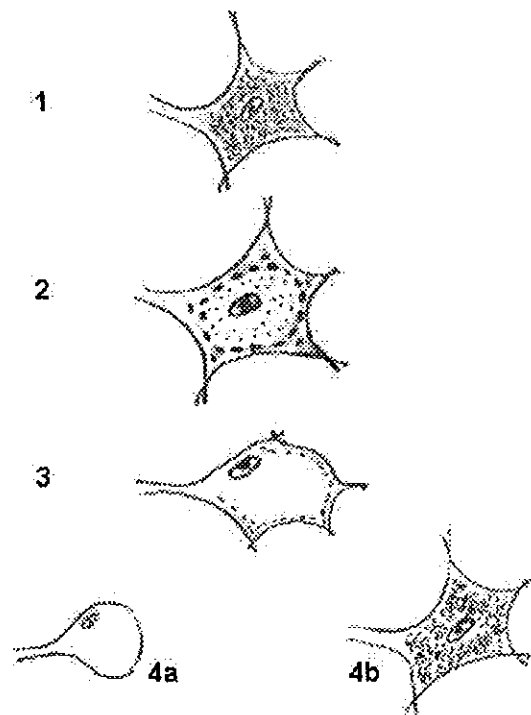


Fig. 6 Degeneración neuronal retrograda. 1. Célula nerviosa normal antes de la lesión, distribución normal de la sustancia de Nissl; 2. 48 hr después de la lesión se inicia la desaparición de la sustancia de Nissl y aparecen diminutas partículas; 3. de dos a tres semanas la célula nerviosa se encuentra edematizada, el núcleo es excéntrico y la sustancia de Nissl tiene apariencia marginal; 4a. La célula puede morir (célula fantasma) y desaparecer completamente; 4b. Es posible que la célula pueda recuperarse y formar discretos cuerpos de Nissl y el núcleo localizarse en el centro. (Clinical Neurology, Amsterdam, North Holland, Vol, 7, 1970, pp 197).

2.3 REGENERACION NERVIOSA.

A inicios del siglo XX se propuso que; "sustancias humorales" originadas de la lesión tenían efectos sobre la regeneración axonal del SNP (Ramón y Cajal, 1928; Forssman, 1989, 1990), 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 (Weiss, 1944; William y col., 1987; Varon, 1993; Lundborg y col., 1994; Hall, 1996).

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 (Salonen y col., 1987; Hall, 1996; Ide C, 1998; Barakat-Walter, 1999; 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 axón-axón y axón-célula de Schwann (Spector y col., 1993; Ide C, 1996; Smith, 1996; Barakat-Walter, 1999; Weinstein, 1999).

También sucede incremento de componentes celulares que promueven la elongación de neuritas y remielinización por células de Schwann y fibroblastos perineurales (Lawrence, 1987; Spector y col., 1991,1992,1993; Danielsen, 1996; Barakat-Walter, 1999; Weinstein, 1999; Melcangi y col., 2000). Las integrinas $\alpha 1-\beta$ y $\alpha 6-\beta 1$, la proteína cinasa C y la proteína de crecimiento axónico (GAP-43) intervienen en la adhesión al sustrato y crecimiento axónico, respectivamente (Salonen, 1987; Ide C, 1996); a su vez, la tirosina cinasa, 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 (Ide C, 1996; Barakat-Walter, 1999).

Por otra parte, la regeneración nerviosa depende del tipo de lesión; en lesiones por aplastamiento (axónotmesis) resulta una mayor proporción de regeneración exitosa, debido a 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 (Mackinnon y col., 1984; Brigde y col., 1994;). 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., 1991; Varon, 1993), acompañada de atrofia y desaparición de las columnas de células de Schwann. Condiciones que impiden la regeneración nerviosa (Salonen y col., 1987).

Distintos factores influyen sobre los resultados de la regeneración nerviosa; especie animal, sexo, edad, localización del daño y el tipo de lesión, (aplastamiento, sección), tiempo de reparación y la técnica quirúrgica utilizada (Medinacelli y col., 1983), entre los principales.

2.3.1 EVENTOS CELULARES EN LA REGENERACION NERVIOSA.

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 (Spector y col., 1992; Ide C, 1996; Hall, 1996 Ganong, 1997). Se desconocen los factores que controlan la regeneración de nervios periféricos (Aguayo y col., 1992; Barakat-Walter, 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., 1985, 1987; Sanes y col., 1985). La matriz extracelular (compuesta por laminina, colágena tipo IV, fibronectina y moléculas adhesivas neurales) (Spector y col., 1993; Bajrovic y col., 1994; Barakat-Walter, 1999) actúa como guía de axones y células de Schwann durante la

regeneración y participa en la diferenciación y morfogénesis de células y tejidos (Ide C, 1987; Chen-Salonen y col., 1989).

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 y permite la migración de células no neuronales y el crecimiento axonal (Salonen y col., 1987; Baley col., 1993; Varon, 1993); más tarde aparece la fibronectina (FB) y laminina (LMN); que 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., 1987). El componente más importante es la laminina, presente en todas las membranas basales, —estructura esencial para que suceda regeneración axonal (Salonen y col., 1987; Hall, 1996), por esta razón se produce una regeneración más rápida en lesiones por aplastamiento, en comparación con la sección nerviosa completa (Ide C, 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 (Millaruello y col., 1988; Weinstein, 1999) y 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 (Heumann y col., 1987; Baley col., 1993); 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 (Johnson y col., 1988; Zhong y col., 1995; Weinstein, 1999). El NGF mantiene su actividad durante 6 hr y posiblemente actúa directamente sobre las células de Schwann facilitando la regeneración y mielinización (Rich y col., 1987), el NGF también es necesario para el desarrollo y supervivencia de neuronas colinérgicas, sensitivas y simpáticas (Chongliang y col., 1992; Spector y col., 1993). Asimismo 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 (Chongliang y col., 1992; Spector y col., 1993; Barakat-Walter, 1999).

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 (Salonen y col., 1987; Williams y col., 1993; Guénard y col., 1994; Madison y col., 1994; Weinstein, 1999) y se forman rebrotes axónicos conocidos como pinceles neurofibrilares (Dimitru, 1994; Smith, 1997), 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 (Fig. 7) (Dimitru, 1994). En mamíferos, las neuritas crecen a una velocidad que va desde 0.15 hasta 4.0 mm/día (Varon, 1993; Dimitru, 1994; Ganong, 1997).

Cuando el axón finalmente alcanza el extremo distal del tubo endoneural, las células de Schwann se alinean, empiezan a enrollarse y forman una estructura membranosa multilaminar precursora de la vaina de mielina (Dimitru, 1994; Smith, 1996), 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 (Kable y col., 1988; Dimitru, 1994). Posteriormente, se separan las células de Schwann y forman los nodos de Ranvier y la región internodal, donde se localizan sus núcleos (Dimitru, 1994; Ganong, 1997).

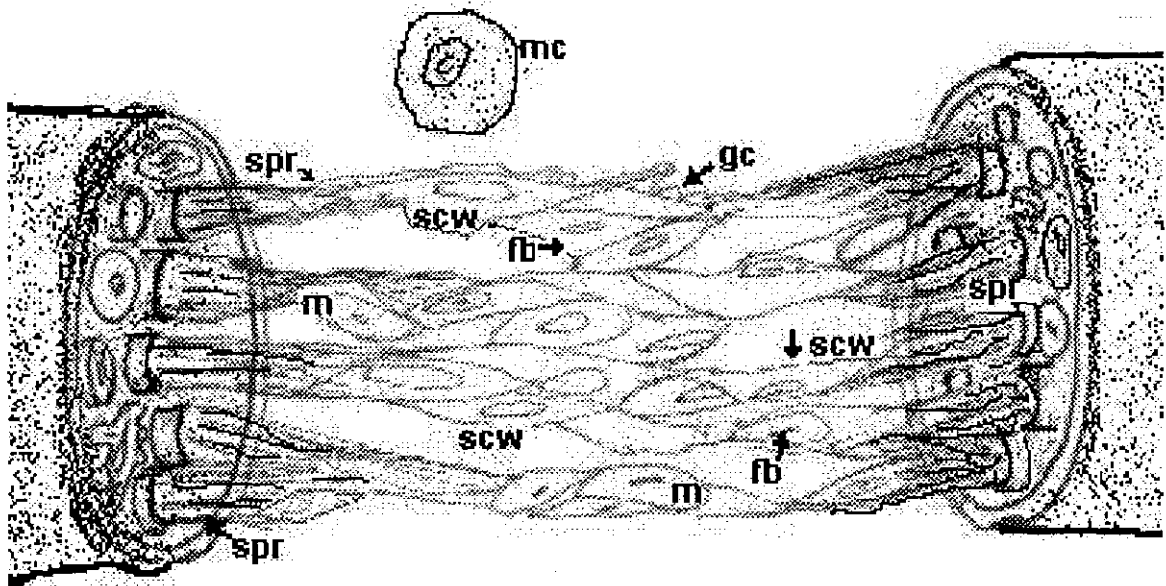


Fig. 7. Esquematación de eventos que suceden durante la regeneración axonal. Múltiples rebrotes de neuritas (**spr**) de un solo axón rodeadas por lámina basal, al final de cada **spr** se encuentra un cono de crecimiento (**gc**). Los rebrotes cruzan el área lesionada junto con células de Schwann (**scw**) hacia el extremo distal. Dentro del área se encuentran macrófagos (**m**), fibroblastos (**fb**), mastocitos (**mc**) y elementos celulares (Lundborg G, Nerve injury and repair. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1988).

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 (Lundborg y col., 1982; Navarro y col., 1994; Ganong, 1997), alrededor de 1 a 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 (Navarro y col., 1994; Ganong, 1997).

2.3.2 ESTADIOS REGENERATIVOS 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 *debris* citoplasmáticos intracelulares, incluyendo organelos intracitoplasmáticos como membranas del retículo endoplásmico provenientes de los extremos nerviosos proximal y distal (Spector y col., 1991).

En esta matriz líquida están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas que favorecen el crecimiento celular, migración, mitogénesis y elongación (Lundborg y col., 1982; Williams, 1987ab; Baley y col 1993; Spector y col., 1993; Varon, 1993; Chen y col., 1995, Ide C, 1997). Después sucede crecimiento de células de origen mesodérmico, particularmente fibroblastos perineurales procedentes de ambos extremos seccionados (Williams, 1983). Estas células se extienden a través de la matriz y actúan como soporte estructural para orientar la migración de axones y células de Schwann (Salonen y col., 1987; Williams y col., 1987; Baley y col., 1993), las bandas de fibrina y colágena forman vías para el rebrote de neuritas y contribuyen a formar el epineuro primitivo (Spector y col., 1991). Al mismo tiempo migran macrófagos, ellos fagocitan eritrocitos, cristales originados de la compactación de los restos celulares y otros remanentes tisulares que aparecen delimitados por vacuolas fagocíticas en su interior, estas células aparecen dispersas entre los componentes de la matriz en formación (Spector y col., 1991; 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 (Lundbor y col., 1994; 1996). 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; Terris y col., 1993; Danielsen y col., 1996). 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; Terris y col., 1993; Danielsen y col., 1996). No obstante 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).

2.4 UTILIZACION DE BIOMATERIALES EN EL AREA BIOMEDICA.

En la naturaleza existe una gran cantidad de polímeros que poseen características favorables para su aprovechamiento industrial, destacan la celulosa, el caucho, almidón, gomas y pectinas. Entre los materiales derivados de la transformación química de compuestos orgánicos sobresale la "quitosana" propuesta como biomaterial por su biocompatibilidad (Peluso y col., 1994; Lee y col., 1995), ella deriva de la quitina, segundo biopolímero natural más abundante, después de la celulosa; la quitina químicamente es un polímero primario formado por unidades repetidas de beta (1-4) acetoamino-2-deoxy-D-glucosa (o N-acetilglucosamina), su estructura es similar a la celulosa, excepto por el reemplazo del grupo 2 hidroxilo con un grupo acetilamida (Allan, 1984; Shepherd y col., 1997; Hirano y Midorikawa, 1998); por su parte, la quitosana, es un homopolímero compuesto de unidades repetidas (GlcNAc) beta (1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucosa (o glucosamina) (Varum y col., 1996; Kas, 1997; Hirano y Midorikawa, 1998) (Fig. 8) es abundante en el caparazón de invertebrados marinos (Shepherd y col., 1997) y se encuentra en menor cantidad en el tallo de plantas, hongos, insectos y moluscos (Shepherd y col., 1997; Kas, 1997). Sin embargo, por la abundancia de exoesqueletos disponibles como producto de desechos de alimentos, la quitosana es primariamente manufacturada a partir del caparazón de crustáceos y puede fabricarse para obtener diversas clases de presentación física, -en solución, hojuelas, polvo, gotas, fibras, etc. (Shapherd y col., 1997; Hirano y Midorikawa, 1998).

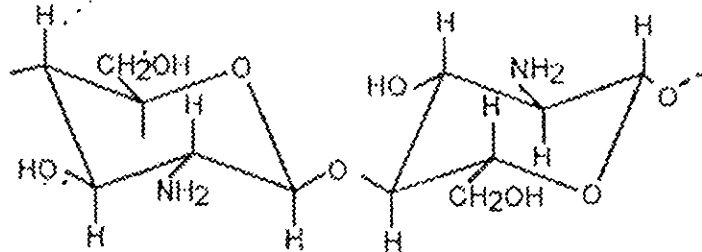


Fig. 8 Estructura química de la quitosana

2.4.1 PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA QUITOSANA.

La quitina y sus derivados poseen características favorables para su aprovechamiento industrial, 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 (Broussignal, 1968; Shapherd y col., 1997; Kas, 1997; Lorenzo-Lamosa y col., 1998; Kotze y col., 1999). Es bioabsorbible y biodegradable -propiedad de mayor interés en aplicaciones biofarmacéuticas, en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que es lentamente degradada por las enzimas quitosinasas y lisozimas; con las primeras, la biodegradación sucede hasta en un 75% (Lee y col., 1995; Mitsutomi y col 1998; Onishi y col., 1999; Quong y col., 1999; Kumar y col., 1999) y hasta en un 35% con lisozimas (Varum y col., 1996; Rao y col., 1995, 1997; Tomihata y col., 1997; Muzzarelli, 1997; Kristiansen y col., 1998; Quong y col., 1999).

Otra propiedad de este biomaterial es la capacidad para 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 Bergisadi, 1996; Jameela y col., 1995; Bayomi y col., 1998). El porcentaje de desacetilación (>74%) (Jameela y col., 1995), peso molecular (alto y bajo peso molecular) (Genta, 1998) y solubilidad, son factores que influyen para regular la tasa de liberación de sustancias (Kotze y col., 1999; Onishi y col., 1999; Kumar y col., 1999; Wang y Xu, 1999), otras propiedades descritas han sido; baja toxicidad (Kas, 1997; Rao y col., 1995, 1997; Bayomi y col., 1998; Illum, 1998), afinidad hidrofílica (Allan, 1984; Rao y col., 1998; Illum, 1998), estabilidad frente a la putrefacción, moldeable y modelable (Broussignal, 1968).

La quitosana se ha considerado catiónica por ser un ion positivo con una base amino (NH_2), por esta razón atrae moléculas cargadas negativamente (Montero y col., 1999); su actividad antibacteriana ha sido explicada por el entrecruzamiento entre una quitosana policatiónica y los aniones presentes en la superficie bacteriana, resultando alteraciones de la permeabilidad en la membrana bacteriana (Tsai y Su, 1999).

2.4.2 APLICACIONES DE LA QUITOSANA EN EL AREA BIOMÉDICA.

Este biomaterial ha sido ensayado para múltiples aplicaciones biomédicas (Allan, 1994) -facilita el proceso de cicatrización en heridas, lesiones por quemaduras y la recuperación de lesiones cutáneas crónicas (Saintigny y col., 1993). Sus efectos han sido asociados con la activación de macrófagos, estimulación de fibroblastos (Muzzarelli, 1997) activación mitogénica y facilitación de adhesión intercelular (Denuziere y col., 1998). Por su biodegradabilidad específica dependiente del pH (Wang y Xu, 1994; Kotze y col., 1999), la quitosana se ha utilizado como vehículo para la liberación prolongada de compuestos (Lorenza-Lamosa y col., 1998; Felt y col., 1998; Ugimoto y col., 1998; Ucheghu y col., 1998; Sezer-Akbuga, 1999; Macledid y col., 1999), su tasa de degradación, directamente relacionada con la cantidad liberada desde los compuestos que la contienen, ha sido modificada mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído ó formaldehído (Akbuga y Bergisadi, 1996; Bayomi y col., 1998; Jameela y col., 1998).

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la quitosana tiene efectos estimulantes sobre la producción y síntesis de oxido nítrico, incrementando así la quimiotaxis de macrófagos y células leucocitarias; la primera propiedad es atribuida a la unidad N-acetilglucosamina, el efecto inmune estimulante es específico de otros glucosaminoglucanos (N-acetil-manosamina y N-acetil-D-galactosamina), que no tienen efectos sobre la producción de oxido nítrico (Peluso y col., 1994; Kosaka y col., 1996). Mediante implantes subcutáneos de quitosana (Peluso y col., 1994) se demostró la quimiotaxis de neutrófilos dentro de las primeras 24 a 96 hr (Kosaka y col., 1996; Usami y col., 1994a, 1994b). Asimismo se cuantificaron concentraciones elevadas de productos del ácido araquidónico (LTB₄, y PGE₂) implicados en la migración y concentración de polimorfonucleares (PMN) (Usami y col., 1998) en las regiones donde fue implantado este biomaterial.

2.5 NEUROESTEROIDES

2.5.1 ESTEROIDES NEUROACTIVOS EN LA REGENERACION NERVIOSA.

A partir del colesterol, se sintetiza una variedad de esteroides en el sistema nervioso central (Clemens y Weaver, 1985) independientemente de la actividad glandular endocrina periférica (Akwa y col., 1993 ab; Kabbadj y col., 1993). Estos esteroides intracerebrales fueron denominados *neuroesteroides* (Baulieu, 1981; Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1994, 1995a), son sintetizados en neuronas y células gliales del tejido nervioso, principalmente astrocitos y oligodendrocitos (Jung-Testas y col., 1994, 1998ab) a partir de precursores de hormonas sexuales esteroides, o sintetizados *de novo* por segmentación de las cadenas laterales del colesterol mediante actividad de la enzima P-450_{scc} en la membrana interna mitocondrial (Fig. 9) (Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995; Robel y col., 1994, 1995ab). Los neuroesteroides ejercen modulación específica sobre receptores ionotrópicos para diferentes neurotransmisores como el GABA_A (Fig. 10), glicina y glutamato, por lo que influyen sobre la excitabilidad neuronal, por esta razón; en la actualidad, son considerados como una nueva clase de neuromoduladores (Puia y col., 1990; Baulieu, 1991; Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995b; Del Cerro y col., 1995; Rainer, 1999). También regulan el crecimiento y diferenciación de la astrogliia *in vitro* (Jung-Testas y col., 1994; Del Cerro y col., 1995).

Desde el descubrimiento de los primeros compuestos progenitores de neuroesteroides; pregnenolona, progesterona (PROG), dehidroepiandrosterona y sus derivados sulfatados, se han descrito otros diversos esteroides neuroactivos (Baulieu y Robel, 1990; Baulieu, 1991; Robel y Baulieu, 1995a; Robel y col., 1995b); ellos se encuentran en sus formas de sulfato o de ésteres de ácidos grasos en el cerebro de mamíferos, incluyendo roedores (Robel y col., 1995a), en los machos sus niveles son independientes de la castración, sin embargo, en las hembras dependen de las secreciones ováricas (Jo y col., 1989).

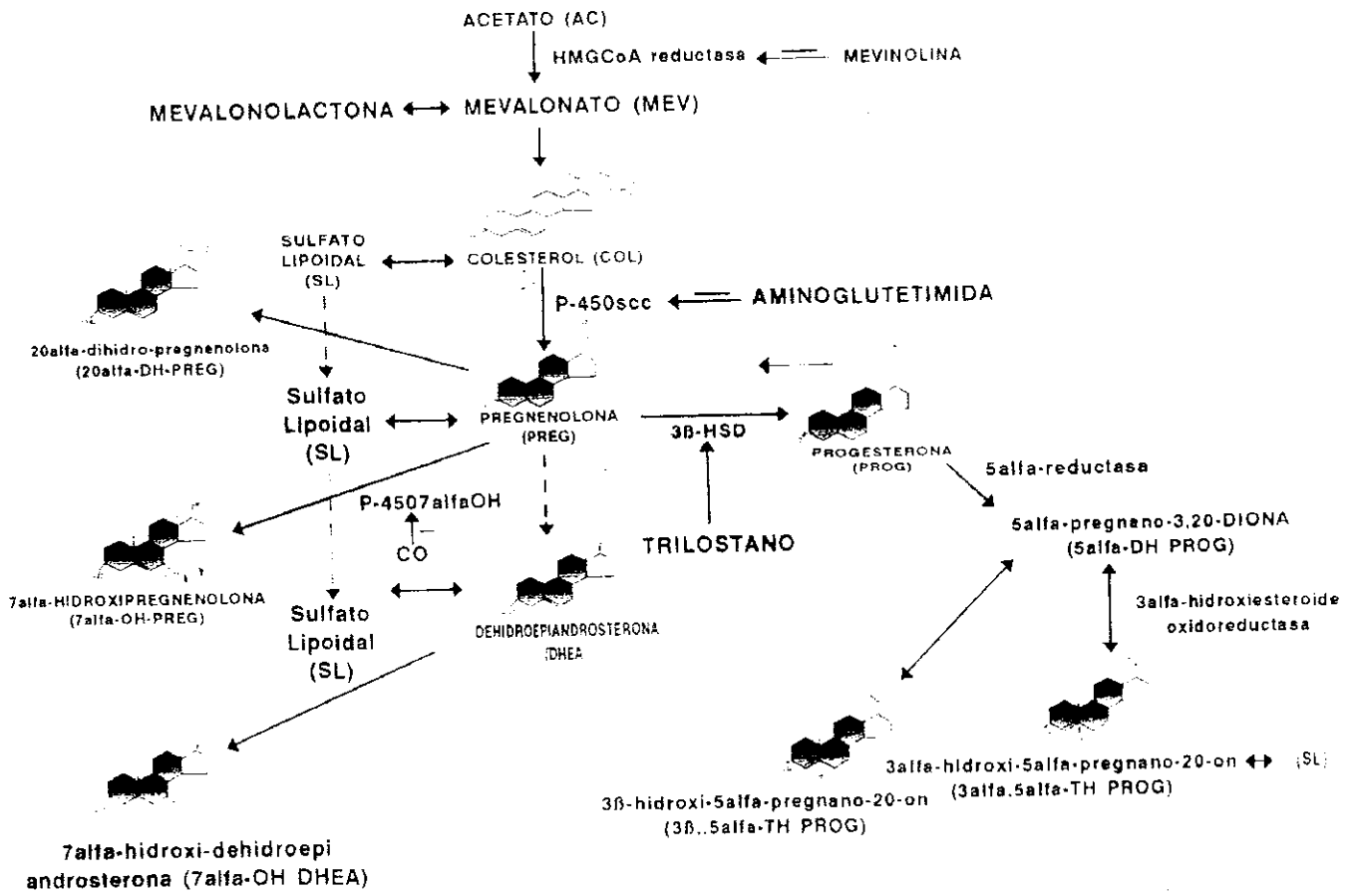


Fig. 9 Biosíntesis de neuroesteroides y su metabolismo en el cerebro de ratas.

La pregnenolona es el principal precursor de la síntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol en células glandulares esteroideogénicas y *de novo* en el tejido nervioso (Brown y col., 1979; Robel y col., 1995a; Rainer, 1999), a partir de ella se origina la progesterona y dehidroepiandrosterona (DHA); luego la serie completa de esteroideas (Robel y Baulieu, 1995a; Robel y col., 1995b). En el cerebro de la rata los astrocitos y oligodendrocitos sintetizan y metabolizan neuroesteroideas (Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995b), esto mismo sucede en las células de Schwann del SNP, - ellas sintetizan progesterona a partir de pregnenolona, independientemente de la edad y el sexo (Jung-Testas y col., 1995; Koenig y col., 1995; Desarnaud, 1998).

Los efectos celulares de los neuroesteroideas son rápidos y específicos (Baulieu y Robel; 1990; Robel y Baulieu, 1995b; Rainer, 1999), pero se desconocen sus mecanismos neuro-reparativos de acción, y poco se conoce del metabolismo de regulación (Baulieu, 1994; Rainer, 1999), es probable que actúen a través de segundos mensajeros (Baulieu, 1994; Rainer, 1999). Por otra parte, pueden actuar a través de los receptores nucleares clásicos para hormonas o mediante unión al complejo receptor oligomérico para GABA_A, modulando canales ionotrópicos presentes en la membrana celular (Baulieu, 1994; Robel y Baulieu, 1995b; Rainer, 1999). En términos generales, puede decirse que los neuroesteroideas actúan mediante mecanismos de acción genómicos y no-genómicos y a través de la regulación autocrina - paracrina entre neuronas y células no nerviosas, implicadas en la cascada de eventos que siguen a una lesión del tejido nervioso (Fig. 10) (Baulieu y Robel, 1990; Baulieu, 1994; Robel y Baulieu, 1995b; Rainer, 1999).

La hormona esteroidea progesterona influye sobre el crecimiento, desarrollo y función de órganos reproductivos femeninos (Jung-Testas, 1996), en el cerebro e hipófisis regula el comportamiento reproductivo femenino y la secreción de gonadotropinas (Jung-Testas, 1996). Sin embargo, se han descubierto diversas propiedades benéficas de esta hormona -neuroesteroide- progesterona sobre el tejido nervioso. Actúa sobre astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann; modula el crecimiento celular y la síntesis de proteínas de mielina, en oligodendrocitos (SNC) y células de Schwann se han identificado proteína básica de mielina (MBP) y nucleótido fosfodiesterasa cíclico (CNPasa) - proteínas específicas

de mielina necesarias para la síntesis de mielina (Jung-Testas y col., 1992; 1996; Baulieu, 1997; Desarnaud, 1998; Rainer, 1999), de esta manera modula la mielinización.

Los efectos biológicos de la progesterona y otras hormonas esteroideas son mediados por receptores proteínicos específicos; recientemente demostrados en cultivos de células de Schwann obtenidas del nervio ciático de rata (Koenig y col., 1995; Jung-Testas y col., 1996; Baulieu, 1997; Desarnaud, 1998).

En el nervio ciático de ratones machos se demostró la síntesis endógena de progesterona por las células de Schwann, independientemente de la actividad testicular y adrenal (Akwa y col., 1992). En nervio ciático de roedores se han detectado altas concentraciones de pregnenolona, precursor directo de la progesterona, así como en nervios adultos intactos, esto último permite suponer que ordinariamente se produce renovación de la mielina periférica (Akwa y col., 1992; Koenig y col., 1995; Desarnaud, 1998). La administración *in situ* de progesterona facilitó la recuperación del nervio ciático del ratón lesionado por congelación; al actuar acelerando la mielinización (Koenig y col., 1995; Baulieu, 1997).

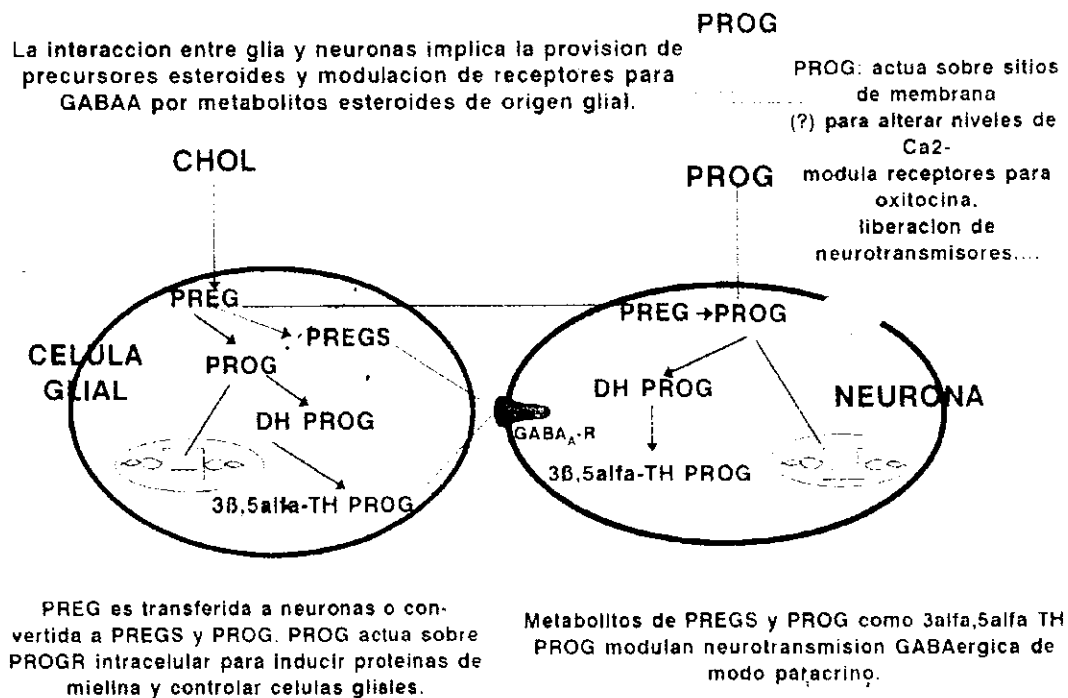


Fig. 10 Mecanismos no genomicos y genomicos de acción de neuroesteroides en el tejido nervioso.

Por otra parte, a partir de diversos estudios sobre las respuestas reparativas de machos y hembras lesionados en nervios periféricos se han evidenciado diferencias relacionadas con el sexo de los animales; las motoneuronas faciales de hámster hembras se regeneran más rápidamente que las de los machos (Jones, 1993). La pérdida de motoneuronas después de la sección del nervio hipogloso o facial de la rata se reduce por el tratamiento con testosterona o progesterona (Yu, 1989); asimismo existen reportes de que la aplicación de testosterona en los machos acelera la recuperación funcional de la parálisis del nervio facial posterior a aplastamiento, e incrementa la respuesta nucleolar de las motoneuronas periféricas que aún conservan capacidad para regenerarse (Kujawa y col., 1991).

La testosterona y el 17- β estradiol favorecen la recuperación de nervios periféricos lesionados por aplastamiento, lo anterior demuestra que los esteroides gonadales son capaces de inducir la recuperación del tejido cerebral lesionado, ya sea activando o acelerando las respuestas reparativas neuronales (Kujawa y col., 1991; Jones, 1993, 1997).



3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La "quitosana" es un nuevo biomaterial de origen orgánico (caparazón del camarón) que posee diversas propiedades que permiten su utilización en la reparación de tejidos; es biodegradable, poco alergénica y pueden modificarse su permeabilidad y elasticidad, aparte de que puede actuar como un vehículo para la liberación prolongada de sustancias. Por lo anterior, en el presente estudio se utilizaron tubos de *quitosana* para formar una cámara de crecimiento axónico (tubulización) en el nervio ciático seccionado de la rata, con la intención de superar las ventajas que se logran por el uso de tubos de silicona en la formación de una cámara de crecimiento nervioso. En este estudio, para inducir la regeneración nerviosa tras axotomía, se combinó la "tubulización nerviosa" con la aplicación local y sistémica del neuroesteroide progesterona (*4-Pregno-3,20-diona*). La recuperación del control motor de la pierna lesionada fue estudiada utilizando los indicadores del índice de funcionalidad del nervio ciático de la rata (Shen, 1995), adicionalmente se realizó un análisis estructural con microscopía de luz y ultraestructura, siendo fundamental analizar la morfología celular del crecimiento nervioso para garantizar la ausencia de efectos secundarios a humanos y aumentar la comprensión del fenómeno. Con todo lo anteriormente expuesto, se tuvo el propósito de desarrollar una prótesis orgánica que permita la recuperación completa del nervio lesionado como una alternativa terapéutica en la reparación quirúrgica de nervios de pacientes humanos o animales de pequeñas y grandes especies afectados por la pérdida de un segmento nervioso craneal o periférico.

4 HIPOTESIS

El uso de prótesis bioactivas de quitosana y neuroesteroides acelera la regeneración nerviosa sin efectos adversos.

5 OBJETIVO GENERAL

Restaurar la citoarquitectura completa del nervio ciático axotomizado de ratas adultas mediante prótesis bioactivas de quitosana y progesterona.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Identificar el linaje de la población celular presente en la cámara de crecimiento axónico.
- II. Determinar los efectos de la prótesis bioactivas sobre la capacidad motora de la pierna lesionada.
- III. Identificar neuronas motoras con signo de degeneración en el dominio medular del nervio ciático axotomizado-tubulizado.

6 METODOLOGIA.

6.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron 21 ratas hembras adultas de la cepa *Wistar*, entre 180 y 200 gr de peso corporal y de 3 meses de edad, a través del experimento los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de bioferio, con ciclos de 12 hr luz y 12 hr oscuridad, humedad relativa del ambiente del 70%, con agua y alimentación balanceada "*ad libitum*". Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas y siguiendo las recomendaciones de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica para el manejo y utilización de animales de laboratorio para experimentación.

Brevemente; las ratas fueron castradas, después de 30 días se colocaron implantes subcutáneos (sc) para liberación prolongada de progesterona y una vez que se alcanzaron niveles séricos estables (15 días), bajo anestesia profunda se seccionaron 9 mm del nervio ciático derecho y el defecto fue reparado mediante tubos de silicona, o tubos manufacturados con *quitosana*.

Debido a que cuando se lesiona el nervio ciático de ratas éste se repara espontáneamente, ha sido ampliamente utilizado en diferentes estudios que han demostrado su gran capacidad regenerativa, por esta razón; la principal variable analizada en el presente estudio fue el tiempo necesario para que se produjera recuperación motora completa de la pierna lesionada, por la influencia de tubulización con prótesis de silicona o *quitosana*, así como por los efectos adicionales del tratamiento con el neuroesteroide progesterona, en una parte de los animales tubulizados con *quitosana*.

Criterios de inclusión:

Todos aquellos animales en los que se logró completar la tubulización del nervio ciático dentro de los primeros 12 min después de la axotomía y en los que se produjo evolución postoperatoria favorable.

Criterios de exclusión:

Complicación postoperatoria después del implante subcutáneo (sc) de cápsulas de silicona para liberación continua y prolongada de progesterona o por la oforectomía bilateral, infección y/o necrosis después de axotomía-tubulización del nervio ciático (no se repondrán) ó recuperación incompleta de la herida.

Criterios de eliminación:

Salida de la cámara de crecimiento axónico (tubo de silicona o *quitosana*) de uno o ambos extremos del nervio, ruptura de la cápsula sc de silicona para liberación prolongada de esteroides o su pérdida, detectada por su ausencia en el espacio sc al momento de sacrificar los animales.

Métodos de estudio para cumplir los objetivos particulares de análisis estructural en el nervio ciático y su región de dominio medular.

Nervio Ciático.-

1. Análisis con microscopia de luz del nervio lesionado, fueron registrados:
 - Número de fascículos de axones presentes en el nervio, así como la superficie ocupada por el fascículo.
 - % de axones mielinizados y no mielinizados.
 - % de superficie ocupada por mielina.

2. Análisis al nivel ultraestructural de:
 - Diámetro axónico
 - Identificación de componentes celulares nerviosos y no nerviosos

Dominio medular del nervio ciático

Estudio histoquímico con la técnica de Nissl para cuantificar la población neuronal sobreviviente en el dominio medular del nervio ciático control y axotomizado.

6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Tubulización con silicona :

- ❖ Ratas controles, implantadas con una cápsula sc de silicona rellena con aceite de sésamo (vehículo), al momento de fijar la prótesis nerviosa se depositaron 10 μ l del mismo aceite en el interior de la cámara de crecimiento axónico, n=7.

Tubulización con "quitosana":

- ❖ Ratas controles, recibieron una cápsula sc de silicona rellena con aceite de sésamo 30 días antes de la lesión nerviosa y 10 μ l de aceite en el interior de la cámara, n=7.
- ❖ Ratas implantadas con una cápsula sc de silicona rellena con progesterona (15 mg/rata). En el interior de la cámara fueron depositados 10 μ l de una solución que contenía 50 μ g/ml de progesterona disuelta en aceite de sésamo, n=7.

6.3 MANUFACTURA DE TUBOS PARA PROTESIS DE QUITOSANA.

Objetivo:

Elaboración de tubos de *quitosana* para formar una cámara de crecimiento nervioso.

La obtención de *quitosana* se describe a continuación; se utilizaron caparazones de camarones cocidos, deshidratados a 60° C durante 48 hr en una estufa, el material desecado se pulverizó hasta alcanzar un tamaño homogéneo de partícula de 2 mm, se utilizaron 200 g del pulverizado para agregarlos a 400 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M, la mezcla se mantuvo en agitación continua durante 3 hr, con una temperatura de 50 a 70 °C, para producir la desnaturalización y precipitación de proteínas.

A continuación, la mezcla anterior se lavó cinco veces durante 20 minutos (5 x 20 min) con tampón tris 0.1 M, pH 8, una vez completados los lavados se realizó digestión con 200 ml de ácido clorhídrico 1 N durante 2 hr para desmineralizar la quitina, y obtener un concentrado libre de proteínas. La mezcla desproteïnizada fue desmineralizada adicionalmente, se lavó con el mismo tampón y se hicieron cambios (5 x 20 min) a temperatura ambiente y con agitación constante. La mezcla se secó durante 48 hr a 60 °C, el material desecado resultante se desacetiló durante 5 hr a 100 ± 20 °C mediante adición de 400 ml de una solución acuosa 2 M de NaOH (Tomihata e Ikada, 1996), el material desecado se lavó con el mismo tampón (5 x 20 min), y nuevamente fue secado en una estufa durante 48 hr a 60 °C, el producto final de todo el proceso anterior fueron hojuelas de *quitosana*, delgadas y blancas.

Para asegurarnos de que éstas poseían todas las propiedades deseables, fueron solubilizadas en acetato de sodio 0.1 N, pH 4.6, bajo estas condiciones, el índice mínimo resultante de desacetilación fue de 85%, -aceptable para los propósitos del estudio (Graham y col., 1995; Tomihata e Ikada, 1996). A fin de preparar una forma modelable de *quitosana* que pudiera utilizarse como cámara de

crecimiento axónico, se preparó una solución al 1% de *quitosana* disuelta en una solución acuosa con 2% de ácido acético, pH 4.

La *quitosana* disuelta fue vaciada sobre tubos capilares de teflón, se precipitó utilizando una solución acuosa con 25% de hidróxido de amonio y se hicieron lavados con agua bidestilada (5 x 20 min) para eliminar los restos de amoniaco, se secaron los tubos en una estufa a 45 °C durante 24 hr para obtener un tubo de iguales dimensiones a las del tubo de silicona (0.72 mm calibre interno y 1.42 mm calibre externo), -utilizado como prótesis para reparación del nervio ciático axotomizado, mediante tubulización. Los tubos de *quitosana* se mantuvieron almacenados en alcohol isopropílico al 90% hasta su utilización.

6.4 LOCALIZACION DEL DOMINIO MEDULAR DEL NERVI0 CIÁTICO MEDIANTE MARCAJE RETROGRADO CON PEROXIDASA DE RAIZ FUERTE (HRP).

Objetivo:

Identificar la zona de dominio del nervio ciático en la médula espinal de la rata, utilizando un grupo de animales controles intactos (n=6), que solamente fueron destinados a este propósito.

La peroxidasa de raíz fuerte es una glucoproteína con peso molecular de 44,000 Daltons, contiene un grupo prostético hemina unido a un Ca^{++} (Peyronnard y col., 1988; Kanda y col., 1989; Heathcock, 1993), esta molécula es incorporada al citoplasma celular mediante fagocitosis y no se degrada por la actividad de lisosomas. Al inyectarse HRP en el interior de nervios periféricos es delimitada por membranas y transportada por flujo axoplásmico retrogrado hasta el soma neuronal, donde permanece sin degradarse. Al entrar en contacto con donadores químicos de hidrógeno como; fenoles, diaminas, leucocolorantes, ascorbato, etc. se produce una reacción de oxidación [$\text{Donante} + \text{H}_2\text{O}_2$ (HRP)= donante oxidado + $2\text{H}_2\text{O}$], de lo que resulta un precipitado cromógeno visible que permite su localización a nivel de microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (Peyronnard y col., 1988; Kanda y col., 1989; Kliment y col., 1997).

Procedimiento quirúrgico.

Los seis animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (ip) de droperidol (2 mg/Kg) y ketamina (50 mg/Kg), se inmovilizaron en posición decúbito ventral para mostrar la cara dorsal externa del muslo derecho, se afeitó la zona quirúrgica y se hizo asepsia con solución de iodo, se practicó una incisión longitudinal en la piel a lo largo del muslo para localizar el músculo glúteo externo y se separaron sus haces para descubrir el nervio ciático; el nervio se liberó de sus tejidos circundantes y bajo técnica microquirúrgica, utilizando pinzas de mosquito curvas, se pinzó el extremo proximal durante 2 min y simultáneamente el distal, a

una distancia de 9 mm. Posterior a esto, con una microjeringa *Hamilton* se inyectaron 8 μ l de una solución al 20% de HRP (Sigma P-8250), disuelta en solución salina fisiológica, en el interior del segmento nervioso lesionado (1 μ l/5 min).

La herida quirúrgica fue reconstruida por planos con catgut crómico 4-0 y puntos simples separados en piel con nylon 6-0. Los animales se recuperaron sobre una manta tibia y húmeda antes de regresarse a sus condiciones habituales de bioterio.

Preparación de los tejidos para análisis histoquímico.

Quince días después de la inyección de HRP las ratas recibieron una dosis ip subletal de pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso) y se sacrificaron mediante perfusión intravascular, de los animales fijados se diseccionó el nervio ciático lesionado y el contralateral (control), así como la porción medular comprendida entre la cuarta vértebra lumbar y la primera sacra 1 (L4 -S1), (Fig. 11). El segmento medular fue sumergido en una solución crioprotectora compuesta por 30% sacarosa y 0.5% de goma arábiga durante 3 días a 4 °C y se realizaron cortes de 30 μ m de espesor en criostato. Para identificar la peroxidasa exógena, se incubaron los tejidos en una solución al 0.07% de 3'3'-diaminobencidina (DAB) con 0.01% de H₂O₂ durante 10-15 min hasta que se desarrolló una coloración marrón. Los cortes montados en portaobjetos fueron deshidratados en series crecientes de alcohol, mezclas de alcohol-xileno y cubiertos con resina Entellan (Merck 107961 0100) para su análisis cuantitativo con microscopía de luz.

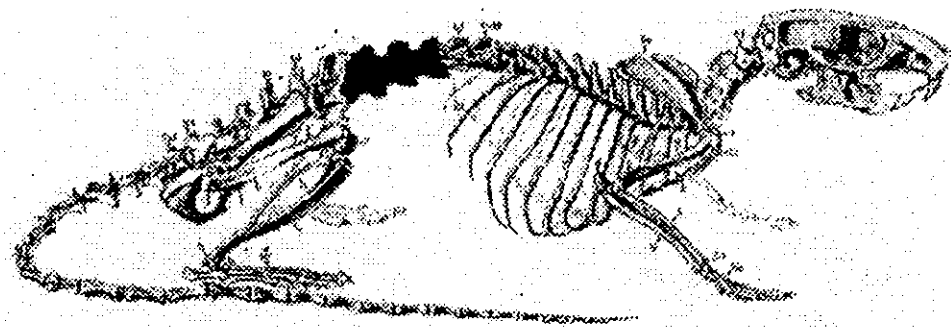


Fig. 11. Dominio medular del nervio ciático de la rata (zona sombreada).

6.5 TECNICAS QUIRURGICAS.

6.5.1 OVARIECTOMIA.

Objetivo:

Extirpación de las gonadas femeninas para suprimir la influencia de esteroides periféricos.

Las 21 ratas fueron anestesiadas mediante inyección ip de droperidol (2 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg), se afeitó el dorso del animal y por detrás de la arcada costal, en la línea media, se hizo una incisión cutánea de 2 cm de longitud. En ambos flancos, mediante disección roma, fue separado el tejido celular subcutáneo hasta visualizar el músculo oblicuo externo abdominal, se hizo un ojal con tijeras de punta aguda y se penetró la cavidad abdominal. Haciendo presión ascendente sobre el piso del abdomen con la mano izquierda se localizó el ovario, para extirparlo se extrajo del fondo de la cavidad abdominal; después se practicó hemostasia mediante trombosis por torsión, el cuerno uterino se devolvió a la cavidad abdominal y la piel fue cerrada mediante puntos separados con seda de 3-0.

6.5.2 IMPLANTACION DE CAPSULAS DE SILICONA PARA LIBERACION PROLONGADA DE PROGESTERONA.

Objetivo:

Alcanzar niveles sistémicos estables de progesterona.

La totalidad de los animales fueron anestesiados y afeitados en el dorso, para practicarles una incisión cutánea de 1 cm de longitud en la zona interescapulo-vertebral, se introdujeron unas pinzas de mosquito largas y mediante movimientos sucesivos de apertura y cierre se formo un túnel sc para alojar la cápsula. La herida se cerró mediante dos puntos separados con seda trenzada de 3-0. Las cápsulas fueron elaboradas usando tubo semipermeable de silicona (*Sani-Tech*) de 3.9 cm de longitud, 3.12 mm de diámetro interno y 3.92 mm de diámetro externo, sus extremos fueron

sellados con pegamento de silicona de grado médico (Medical Adhesive 891). Con el propósito de asegurar la rápida liberación de la progesterona, las cápsulas fueron preincubadas con movimientos suaves durante 12 hr a 37 °C en solución salina al 0.9%, con 0.01% de albúmina sérica bovina (Sigma S-9625) para lograr saturación de las paredes. Al sacrificio de los animales nos aseguramos de extraer la cápsula para garantizar su integridad.

Nota : Las cápsulas de silicona para la liberación prolongada de compuestos lipofílicos se han utilizado desde hace varias décadas y el procedimiento es una parte rutinaria de los protocolos actualmente en curso en nuestro laboratorio, sin embargo, para asegurarnos de haber alcanzado las concentraciones séricas esperadas de progesterona, bajo anestesia profunda con éter anhidro se sacrificaron por decapitación dos ratas controles y dos experimentales a los 14 y 28 días posimplante sc, siendo estas independientes a las programadas en nuestros grupos de trabajo, en el suero se cuantificó la concentración de progesterona mediante radioinmunoanálisis (RIA).

6.5.3 AXOTOMIA-TUBULIZACION.

Objetivo:

Crear una lesión en el nervio ciático mediante resección de un segmento, para analizar los efectos por la tubulización con silicona ó *quitosana* y la influencia del neuroesteroide progesterona sobre la regeneración nerviosa en los animales tubulizados con *quitosana*.

Los animales (n=21) fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (ip) de droperidol (2 mg/Kg) y ketamina (50 mg/Kg), se inmovilizaron en posición decúbito ventral para mostrar la cara dorsal externa del muslo derecho, se afeitó la zona quirúrgica y se aplicó solución jabonosa de yodo como antiséptico, a continuación se practicó una incisión longitudinal en la piel a lo largo del muslo para localizar el músculo glúteo externo y se separaron sus haces para descubrir el nervio ciático, este se liberó de sus tejidos circundantes y bajo técnica microquirúrgica se seccionó un segmento de 9 mm, a nivel del tercio superior de su trayecto por el muslo. Para evitar la pérdida del contenido axonal, inmediatamente después de la axotomía, se insertaron 2 mm del muñón axónico proximal y distal en el interior de un tubo de silicona (Dow-Corning), o de un tubo elaborado con *quitosana*. Ambos fueron de 15 mm de longitud, 1.62 mm de diámetro interno y 2.12 mm. de diámetro externo.

Antes de su implantación las prótesis fueron preincubadas durante 2 hr a 37 °C en 0.9% de solución salina. Los muñones nerviosos se fijaron al tubo mediante dos puntos de sutura epineural con nylon 10-0, por lo que resultó una cámara de crecimiento axónico de 11 mm de longitud, con una micro-jeringa *Hamilton*, en el interior de los tubos de silicona fue depositado aceite de sésamo (vehículo), mientras que en el interior de los tubos de quitosana se inyectó vehículo (10 µl), o el neuroesteroide progesterona (10 µl). La herida quirúrgica se reconstruyó por planos con catgut crómico 4-0 para el tejido muscular y puntos simples separados con nylon 6-0 para la piel. Se permitió la recuperación de los animales sobre una manta tibia y húmeda antes de regresarse a sus condiciones habituales de bioterio, 10 días después de la axotomía se realizó la primera evaluación funcional del nervio ciático (IFC), tomando en consideración los indicadores morfométricos especificados para esta prueba (Medinaceli y col., 1982; Lowdon y col., 1988; Bain y col., 1989; Johnston y col., 1991; Ninjiang y col., 1995), la evaluación fue repetida cada 10 días, hasta el día 90 poslesión.

6.6 INDICE FUNCIONAL DEL NERVIJO CIÁTICO (IFC).

Objetivo:

Valorar la recuperación motora de la pierna lesionada mediante análisis de las huellas.

Consiste en el análisis de la deambulación, de modo semejante a como se describió en el método de *Medinaceli* (Medinaceli y col., 1982) con algunas modificaciones en las dimensiones de la caja de deambulación, para permitir el libre paso de las ratas; por lo que fabricamos una caja rectangular de acrílico gris con 10 cm. de ancho, 60 cm. de largo y 11 cm de altura, con una cubierta superior, una puerta de ingreso y otra de salida. Un día antes de lesionar el nervio, cada rata fue entrenada para caminar a lo largo de la cámara de prueba y el recorrido se repitió en tres ocasiones. El piso de la caja se cubrió con papel blanco, se sumergieron las patas traseras de la rata en tinta para sellos de goma de color negro, inmediatamente después el animal se introdujo en un extremo de la caja para recorrerla de un lado a otro. Se analizaron las huellas de tinta sobre el papel, con el propósito de registrar correctamente la locomoción se realizó un segundo ensayo con el mismo animal; descartando las huellas con manchas irregulares y en las que se deformó la impresión por arrastramiento de la cola sobre la tinta. 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)*

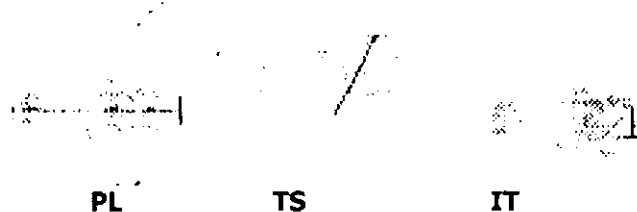


Fig. 12 Parámetros del Índice Funcional del Nervio Ciático.

Para fines de interpretación consideramos como referencia los valores promedio de las huellas obtenidas de la pierna izquierda no lesionada del mismo animal, ellos se compararon con los resultantes de la pierna derecha axotomizada-tubulizada. Aplicamos la fórmula *Bain* para calcular el IFC sobre una escala de 0 a -100. Cero representa función normal y -100 incapacidad (Lowdon y col., 1988; Bain y col., 1989; Johnston y col., 1991; Ninjiang y col., 1995).

Análisis estadísticos:

Los datos fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza aleatorizado (ANOVA) de una sola vía, seguida de la prueba de *Tukey* para las comparaciones *post hoc* de los valores de medias. Se estableció un nivel de confianza de $P < 0.05$ para definir como significativas las diferencias.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

6.7 PREPARACION DE TEJIDOS PARA ANALISIS MEDIANTE MICROSCOPIA DE LUZ Y MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

Objetivo:

Fijación de los tejidos para análisis morfológico del nervio regenerado.

A los 60 y 90 días poslesión una parte de los animales controles y experimentales fueron sacrificados mediante perfusión intravascular (3 y 4 por periodo y grupo respectivamente), bajo anestesia profunda por inyección ip de pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso).

Perfusión intravascular.

Los animales anestesiados fueron inmovilizados en posición decúbito dorsal, se practicó toracotomía amplia para exponer el corazón y los pulmones, con pinzas de mosquito se pinzó la arteria aorta torácica descendente y se realizó una incisión en el vértice del ventrículo izquierdo para introducir una cánula roma del número 18. Inmediatamente después, se seccionó la aurícula derecha y durante 3 min se hicieron pasar 100 ml de una solución lavadora a temperatura corporal, compuesta por 0.9% de solución salina isotónica con 1 gr de procaína (Sigma P-9879) y 10,000 UI de heparina/litro (Sigma H-3393), bajo presión de 120 cm³ de columna de agua, para eliminar la mayor cantidad de sangre. Enseguida, a temperatura ambiente, se hicieron pasar 250 ml durante 8 min de una solución fijadora compuesta por 3% paraformaldehído (Sigma P-6148) y 1% glutaraldehído (Sigma G-7776) amortiguados en fosfato de sodio 0.1 M, pH.7.3 y 580 Mosm/l.

6.7.1 DISECCION DE LOS TEJIDOS.

De los animales fijados se separó un segmento amplio del nervio ciático tubulizado que contenía completa la cámara de crecimiento nervioso (tubo de *quitosana* o de silastic), así como el segmento correspondiente del nervio ciático contralateral que no fue lesionado. Ambos segmentos nerviosos fueron sumergidos durante 4 hr a temperatura ambiente en una solución fijadora compuesta por 3% de

paraformaldehído y 1% de glutaraldehído, amortiguados en fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.3 y 580 Mosm/lit, luego fueron lavados mediante varios cambios de 20 min con amortiguador de fosfato. De estos animales también se separó un segmento de la médula espinal comprendido entre la 4^a - 6^a vértebras lumbares, para analizar la supervivencia neuronal mediante tinción con el colorante de Nissl.

6.7.2 INCLUSION DEL SEGMENTO NERVIOSO EN RESINAS EPOXICAS.

De la zona distal del nervio regenerado, a intervalos de 2 mm se obtuvieron fragmentos de tejido con 1 mm/lado, ellos fueron posfijados durante 2 hr en 1% de tetroxido de osmio amortiguado en fosfatos, y deshidratados mediante cambios en series crecientes de alcohol (Sigma R-8382) y acetona (Sigma A-4206) (2 x 30 min), los tejidos deshidratados fueron preincluidos en mezclas de resinas epóxicas (SPI 02660-AB); 20 min en una mezcla de resinas y solvente en proporción 1:3, seguida de una mezcla de Epón y solvente 1:1 (20 min), y una mezcla 3:1 de Epón y solvente (30 min), después de esto los tejidos fueron sumergidos durante 1 hr en resina pura, se hizo un cambio y allí se dejaron durante 12 hr a temperatura ambiente con movimientos suaves. Finalmente, los fragmentos de tejido fueron incluidos en cápsulas Been (16659-1 Polysciences, Inc.), antes de la polimerización se orientaron para regularizar la cara de corte y se dejó polimerizar la resina durante 48 hr a 60 °C. De los tejidos incluidos en resinas, se hicieron cortes de 1 µm de espesor con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo Sorvall y se tiñeron con azul de toluidina (Sigma T-0394) para estudiar la citoarquitectura del nervio con microscopía de luz, fueron cuantificados el número de fascículos, número de axones, porcentaje (%) del área ocupada por mielina, % de axones mielinizados y no mielinizados.

Para el estudio con microscopía electrónica de los tejidos, se hicieron cortes finos de 70 a 90 nm de espesor en un ultramicrotomo Sorvall (rango dorado a plateado del espectro de difracción de luz visible), solo fueron analizados los crecimientos axónicos de los nervios provenientes de tres ratas por grupo experimental y control sacrificadas a los 90 días poslesión. Una vez montados los cortes -tres cortes por rejilla y seis rejillas por animal- fueron contrastados con una

solución de acetato de uranilo y citrato de plomo para realizar el análisis ultraestructural a 3,000 aumentos en campos aleatorios, fue cuantificado el diámetro axonal como indicativo de regeneración nerviosa, y con base en las características morfológicas distintivas del núcleo y citoplasma se identificaron elementos celulares y no celulares de origen nerviosa o no nervioso presentes en el segmento nervioso regenerado, esto es; presencia de fibras de colagena ó elastina, células de Schwann, fibroblastos, axones mielinizados o no mielinizados en diferente estadio de maduración, plasmocitos y leucocitos. Para fines de comparación el segmento nervioso contralateral no lesionado del mismo animal fue considerado como control intacto.

Para análisis del diámetro axonal fue utilizado un sistema automatizado QWIN550 (LEICA) y los valores resultantes fueron sometidos al mismo tratamiento estadístico antes descrito, a fin de establecer significancia.

6.8 ESTUDIO HISTOQUIMICO CON LA TECNICA DE NISSL.

Objetivo:

Determinar la supervivencia neuronal en la zona de dominio medular del nervio ciático axotomizado-tubulizado, a diferentes tiempos poslesión.

En un vibratomo (American Optical) se hicieron cortes coronales de 50 μm de espesor, de las regiones medulares lumbar 4-6, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y deshidratados mediante cambios sucesivos de 3 min en concentraciones crecientes de alcohol; 70, 80, 90, 96% y alcohol absoluto, los cortes luego fueron sumergidos durante 1 min en una solución alcohólica (80%) de eosina amarillenta, seguida de dos lavados rápidos en alcohol al 96 y 100%, e inmersión durante 2 a 3 min en una solución al 0.5% de acetato de violeta de cresilo (colorante de Nissl, Sigma-5042), luego los tejidos fueron deshidratados y montados en resina Entellan (Merck 1 07961 0100) para su análisis microscópico.

Para identificar cualquier indicio degenerativo se analizó la morfología de neuronas presentes en la región medular del nervio ciático axotomizado, ésta fue comparada con las imágenes de neuronas presentes en el segmento lumbar contralateral (control interno). Asimismo, se examinó el grado de compactación del neuropilo para detectar la presencia de espacios vacíos que contuvieran remanentes membranales, -sugestivos de necrosis neuronal.

Análisis estadísticos:

Los datos fueron analizados utilizando la prueba estadística de análisis de varianza aleatorizado (ANOVA) de una sola vía, seguida de la prueba de *Tukey* para las comparaciones *post hoc* de los valores de medias. Se estableció un nivel de confianza de $P < 0.05$ para definir como significativas las diferencias.

7 RESULTADOS.

7.1 INDICE FUNCIONAL DEL NERVIJO CIÁTICO.

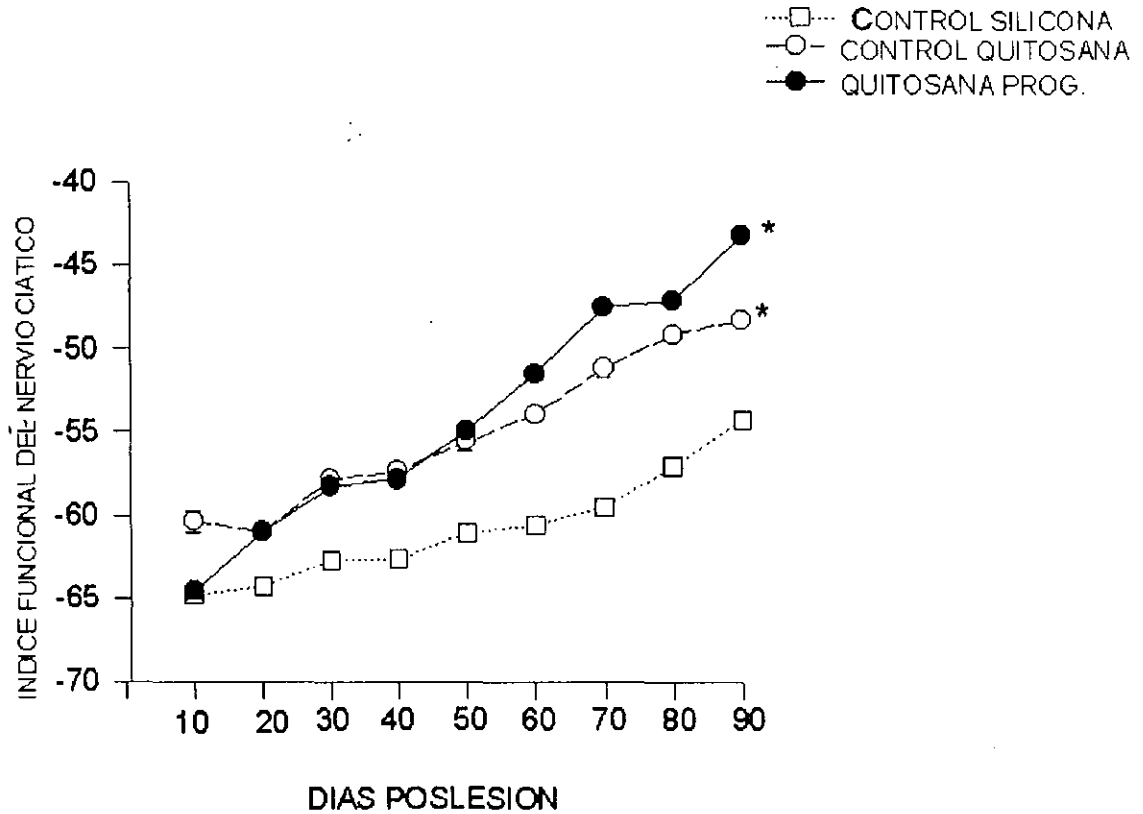
A los 10 días después de axotomía y tubulización del nervio ciático, tanto los animales controles como los experimentales revelaron una incapacidad motora comparable en la pierna lesionada, independientemente de sí fueron tubulizados con silicona o quitosana y del tratamiento con progesterona (Cuadro 1).

A los 30 días posaxotomía-tubulización los mejores resultados, -indicativos de regeneración nerviosa, correspondieron al grupo de ratas tubulizadas con quitosana y tratadas con el neuroesteroide progesterona, sus valores fueron significativamente diferentes al grupo de animales controles que no recibieron progesterona y que fueron tubulizados con silicona ($p < 0.05$), (gráfico 1). A los 90 días posesión los mejores resultados se observaron en el grupo de ratas tratadas con progesterona y tubulizadas con quitosana, a su vez, el grupo de ratas controles que recibieron prótesis de quitosana alcanzó una mejor recuperación de la función locomotriz del miembro dañado, en comparación con el grupo de ratas controles que fueron tubulizadas con silicona ($p < 0.05$), (gráfico 1).

Cuadro 1 Evolución del IFC de los grupos de ratas tubulizadas con quitosana ó silicona
-100 indica incapacidad y 0 normalidad

GRUPOS			PROTESIS DE SILICONA	PROTESIS DE QUITOSANA	
			CONTROL	CONTROL	PROGESTERON A LOCAL Y SISTEMICA
IFC	Días	10	-64.8333	-60.3400	-64.5667
		30	-62.7332	-58.2333	-57.8333
		60	-60.6000	-53.9667	-51.5833
		90	-54.3333	-48.3000	-43.2700

INDICE FUNCIONAL DEL NERVIJO CIÁTICO



ANOVA-Tukey ($p < 0.05$)

GRAFICO MUESTRA MEDIA \pm ERROR ESTANDAR

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL GRUPO CONTROL

0 INDICA NORMALIDAD, -100 INCAPACIDAD TOTAL

Gráfico 1: Evolución del índice funcional del nervio ciático a través de 90 días poslesión, los dos grupos de animales; controles silicona y controles quitosana mostraron una más lenta recuperación de la función locomotriz del miembro lesionado, en comparación con el grupo de ratas tubulizadas con quitosana que fueron tratadas con progesterona.

7.2 SUPERVIVENCIA NEURONAL (NISSL).

Para este estudio se realizó la cuantificación de la población neuronal con signos degenerativos presente en la zona de dominio medular del nervio ciático que previamente fue identificada mediante marcaje retrógrado con peroxidasa de raíz fuerte (HRP), utilizando el sistema analizador de imágenes Leica Q500IW, se revisaron cortes transversales de 50 μm de espesor provenientes de médula espinal, comprendidos entre las zonas lumbares cuarta, quinta y sexta, equivalentes a un volumen tisular de alrededor de 2.5 cm^2 . En ninguna de las preparaciones de médula espinal de ratas controles tubulizadas con silicona o quitosana, y experimentales tubulizadas con quitosana que fueron sometidas a los efectos del neuroesteroide progesterona, se produjo necrosis neuronal en las zonas diana medulares axotomizadas.

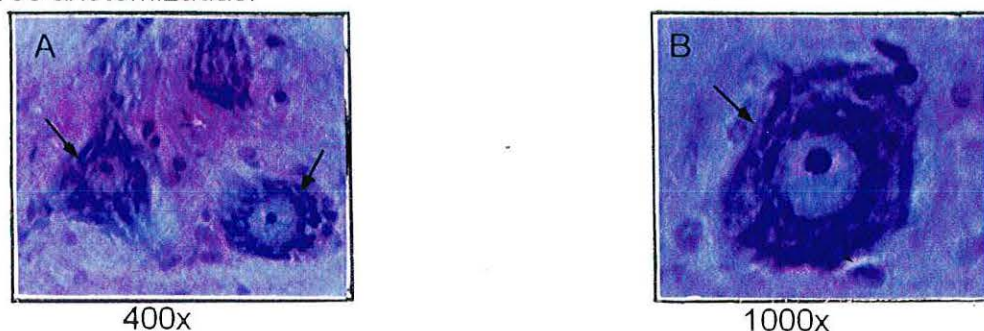


Fig 13. Cortes transversales de 50 μm de espesor teñidos con la técnica de Nissl, correspondientes a la 5^a región medular lumbar. Las flechas indican neuronas motoras de aspecto normal. (A: Imagen panorámica que muestra un agregado de somas neuronales pertenecientes al dominio del nervio ciático axotomizado-tubulizado, B: A mayor amplificación se muestra una neurona en la que se distinguen cuerpos de Nissl intracitoplasmáticos).

7.3 ANALISIS CON MICROSCOPIA DE LUZ DEL NERVIJO EN REGENERACION.

Al final del estudio, en el 95.23 % de los animales lesionados se produjo crecimiento nervioso a través de la cámara de crecimiento axónico de quitosana o silicona (prótesis), independientemente del tratamiento con progesterona (Cuadro 2). Sin embargo, debido a que no es posible demostrar que todos los crecimientos observados permitirán recuperar totalmente las funciones motora y sensitiva de la pierna lesionada, se realizó un estudio de la anatomía microscópica del nervio en regeneración, con el propósito de aumentar la información acerca del grado de reorganización de los crecimientos axónicos, -indicativo de su maduración, así como un análisis con microscopía electrónica de transmisión de los nervios en regeneración, con el propósito de identificar los componentes celulares presentes.

Cuadro 2: Crecimientos axónicos alcanzados a los 60 y 90 días poslesión

$n=7$

GRUPOS	NUMERO DE CRECIMIENTOS
Control-silicona	7/7
Control-quitosana	6/7
Progesterona local y sistémica-quitosana	7/7

% de éxito = número de crecimientos / total de operados

$$= 20 / 21 \times 100 = 95.23 \%$$

Se realizó un análisis microscópico del contenido de la cámara a los 60 y 90 días poslesión para identificar los tipos de crecimiento nervioso (Cuadro 3), asociando las dos principales situaciones experimentales; tipo de prótesis (silicona ó quitosana) y la presencia o no de progesterona, de lo anterior fue posible identificar cuatro tipos de crecimientos nerviosos que se describen a continuación:

Cuadro 3: Características macroscópicas de los crecimientos nerviosos observados en los grupos tubulizados con prótesis de silicona, quitosana y quitosana y progesterona.

* $n = 7$

Tipo de Crecimiento	Tubulización con silicona	Tubulización con quitosana	
	Control *	Control*	Prog. Local y sist. *
Formación de un cable de crecimiento axónico entre los dos muñones nerviosos.	3	2	1
Crecimiento nervioso organizado y regular entre ambos conos axónicos.	3	2	6
Crecimiento nervioso fuera y por encima de la cámara de crecimiento axónico.		1	
Crecimiento axónico desorganizado e irregular	1	1	
No se observó crecimiento		1	

Estudio de la citoarquitectura del nervio en regeneración:

Con la ayuda del analizador de imágenes Leica QWIN550 se estudiaron cortes transversales de 1 μm de espesor de los crecimientos nerviosos, se cuantificó el área fascicular (conjunto de axones), la superficie ocupada por mielina (%) y el porcentaje de axones mielinizados, asimismo se realizó una descripción histológica del contenido de las cámaras de crecimiento axónico. Para ello se utilizaron tejidos incluidos en plástico (resinas epóxicas) que fueron teñidos con azul de toluidina y cortados en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio.

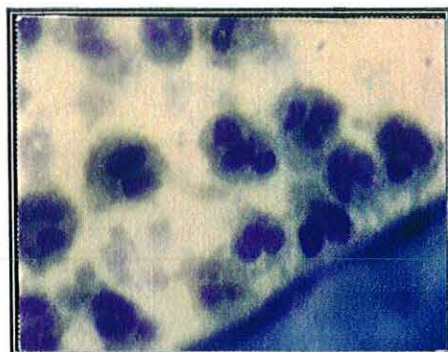
En los crecimientos nerviosos de los animales tubulizados con silicona y sacrificados a los 60 días poslesión se distinguió el epineuro formado por una capa concéntrica-estratificada de tejido conectivo laxo, en ella se observaron algunos fibroblastos, también se distinguió el perineuro, allí se observaron células de soporte y fibras reticulares, en la región más interna del nervio; en el endoneuro, se observaron axones mielinizados y no mielinizados aislados, espacios redondeados

correspondientes al lumen de capilares sanguíneos, y células de mayor tamaño que los fibroblastos, por su morfología ellas fueron identificadas como células de Schwann (Fig. 15).

En los crecimientos nerviosos de los animales axotomizados y tubulizados con quitosana sacrificados a los 60 ó 90 días poslesión, también se diferenciaron las principales zonas de compartimentalización de un nervio normal. Entre el epineuro y perineuro estaban presentes numerosas células del endotelio vascular, muy similares a las observadas en nervios tubulizados con silicona, además de leucocitos mononucleados y polimorfonucleados (Fig. 14), la mayor concentración de éstos se observó cerca de la pared de la cámara de quitosana. Entre los componentes endoneurales presentes al día 60 poslesión en nervios tubulizados con quitosana pudieron distinguirse fibras de arreglo concéntrico reticular, fibroblastos, células endoteliales vasculares, axones mielinizados y no mielinizados.

El área fascicular y el calibre del crecimiento axónico que fueron cuantificados a través del curso temporal (60 y 90 días poslesión), no mantuvieron una relación constante entre los diferentes grupos de animales controles y experimentales (Cuadro 4). En el grupo de ratas tubulizadas con silicona se encontró una mayor superficie del área ocupada por mielina y mayor cantidad de axones mielinizados, en comparación con los grupos de animales que fueron tubulizados con quitosana. La mielinización fue más notable en el grupo de animales tratados con progesterona y tubulizados con quitosana (gráfica 5). Los tejidos examinados de éstos animales revelaron en sus nervios una mayor área ocupada por mielina que la correspondiente a un nervio control intacto ($p < 0.05$).

A los 60 días poslesión se observaron diferencias significativas en el porcentaje de superficie nerviosa ocupada por mielina, al comparar los nervios axotomizados que fueron tubulizados con quitosana, con los nervios tubulizados con silicona, el mejor efecto se logró por la tubulización con quitosana y tratamiento con progesterona (Cuadro 4).



1000x



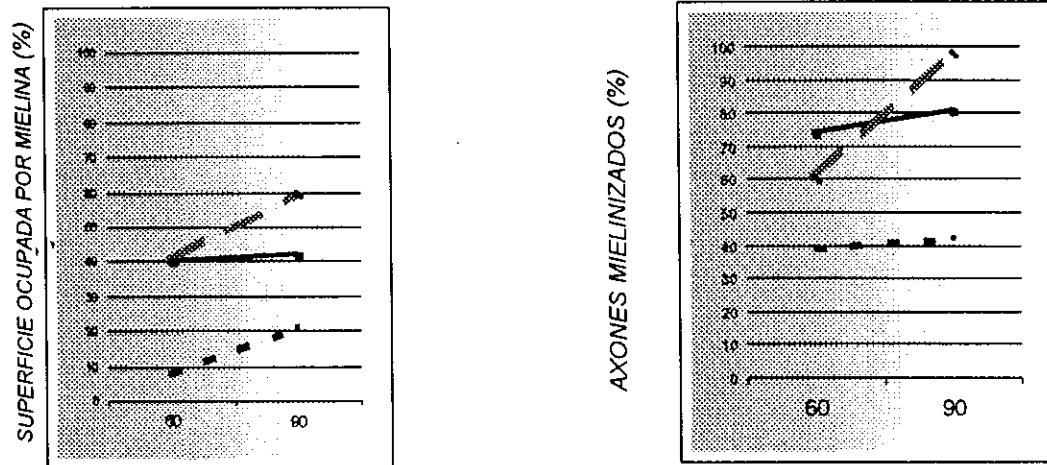
Fig. 14: Se muestra la población de células no nerviosas presentes en la vecindad de la pared interna de la prótesis de quitosana, se distinguieron abundantes células estrechamente asociadas con la quitosana, por su morfología fueron identificadas como leucocitos mononucleados y polimorfonucleados, (inclusión en resinas epóxicas, técnica de azul de toluidina, espesor 1 μm).

Cuadro 4: Análisis del número de fascículos de axones y área del calibre nervioso (μm^2) del extremo distal del nervio de animales controles y experimentales sacrificados a los 60 y 90 días posesión, se muestra el valor promedio de los crecimientos observados en cada grupo.

	DIAS POSLESION			
	60		90	
	NUMERO DE FASCICULOS	AREA (μm^2)	NUMERO DE FASCICULOS	AREA (μm^2)
Control silicona	1	13,218.9	1	16,088.6
Control quitosana	1	31,685.44	1	32,587.23
Progesterona local y sistémica -quitosana	1	20,575.70	1	37,453.20

En todos los cortes analizados de nervios en crecimiento provenientes de los diferentes grupos de ratas controles y experimentales, se produjo un incremento del área fascicular con respecto al tiempo transcurrido después de la axotomía-tubulización. A través del estudio, los nervios tubulizados con silicona revelaron una menor área, comparados con los tejidos de animales tubulizados con quitosana.

Mielinización del extremo distal del nervio en regeneración.

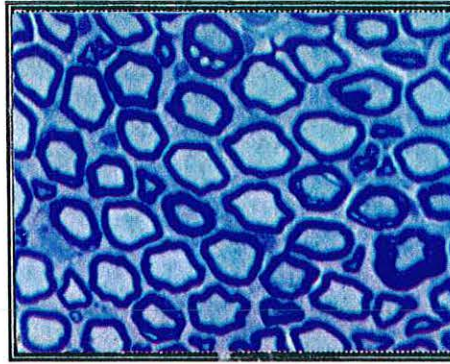


★ El eje de las X muestra los diferentes tiempos posesión en que se realizó el estudio.
 INDICA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA P < 0.05

SILICONA QUITOSANA QUITOSANA -PROGESTERONA

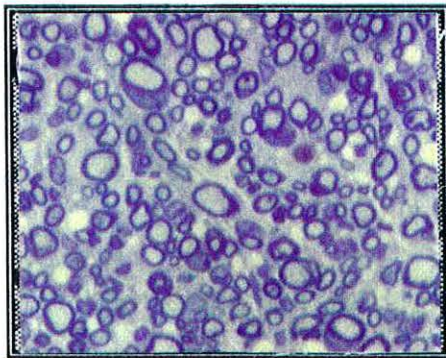
Gráfica 2: Se muestra los resultados obtenidos en los grupos de ratas controles lesionadas (sin progesterona) y tubulizadas con quitosana (con progesterona), sobre la mielinización del extremo distal del nervio en regeneración.

A los 90 días después de la axotomía-tubulización en que finalizó el estudio, los mejores resultados se observaron en los nervios de ratas que fueron implantadas con prótesis de quitosana y tratadas con progesterona, en ellos se observó una mayor superficie mielinizada, así como un mayor porcentaje de axones mielinizados. En los crecimientos nerviosos provenientes del grupo de ratas tubulizadas con prótesis de silicona se produjo un menor desarrollo, al compararlos con los crecimientos presentes en ratas controles (sin progesterona) que fueron tubulizadas con quitosana.

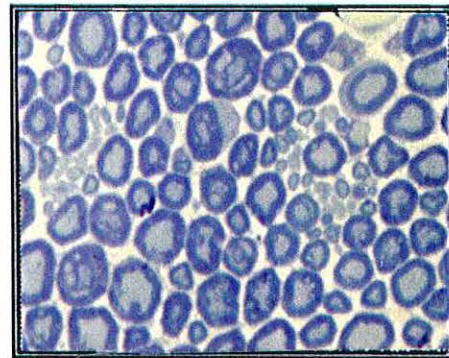


CONTROL INTACTO

TUBULIZACION CON QUITOSANA

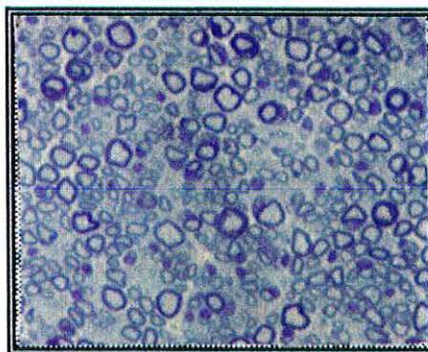


CONTROL



PROGESTERONA LOCAL Y SISTEMICA

TUBULIZACION CON SILICONA



CONTROL

Figura 15: Fotomicrografías de cortes transversales del extremo distal del nervio ciático. (La serie corresponde a cortes de 1 μ m de espesor, de nervios incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina, 400x).

7.4 ESTUDIO A LOS 90 DIAS POSLESION DEL SEGMENTO MEDIO DEL NERVIJO EN REGENERACION MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

Se analizó la porción media del crecimiento nervioso en el interior de la cámara de crecimiento axónico de ratas controles y experimentales, se seleccionó la etapa de 90 días poslesión con el objeto de identificar la población celular presente, así como la organización de los componentes tisulares en este estadio de maduración del nervio en regeneración, -la más cercana a la recuperación final a través del curso temporal estudiado. Fueron cuantificados indistintamente; el número de axones mielinizados y no mielinizados, así como el diámetro interno de los axones presentes en cada campo visual examinado -equivalente a $368 \mu\text{m}^2$ - como indicadores de una regeneración exitosa o de fracaso regenerativo, también se realizó una descripción de los componentes celulares implicados en la regeneración nerviosa, su identificación estuvo basada en el análisis de su morfología ultraestructural.

Descripción de los componentes celulares.

En los cortes transversales provenientes de nervios obtenidos de animales tubulizados con silicona ó quitosana se observaron axones mielinizados y no mielinizados de diferente diámetro, células con morfología diversa y vainas de mielina con espesor variable, en todas las muestras examinadas la mielina mostró aspecto compacto y formas esféricas regularmente distribuidas a través del corte. En estas preparaciones no se identificaron células de origen inflamatorio, estuvieron presentes algunos componentes extracelulares de tejido fibroconectivo laxo, cuya presencia está asociada con la formación de una cicatriz incipiente y el andamiaje para la organización fascicular de los grupos de axones; fibras elásticas, reticulares y colágenas.

En cambio, en los cortes examinados de nervios de animales que fueron tratados con progesterona y tubulizados con quitosana se observaron axones de mayor tamaño y mielinizados en su totalidad, así como vainas de mielina

homogéneas en su espesor, la morfología axónica y su arreglo fueron similares a las observadas en los cortes de nervios intactos (Fig.16-A), sin que se identificaran células de origen inflamatorio, tampoco se observaron fibras de colágena, reticulares o elásticas, -indicativas de una reacción cicatrizal (Fig. 16 B, C y D).

Cuantificación del diámetro interno axónico (calibre).

Debido a que los axones están directamente implicados en el éxito regenerativo de un nervio lesionado, y de su funcionamiento adecuado depende la conducción de estímulos hasta la placa neuromotora, se cuantificó el diámetro interno axónico como uno de los principales criterios indicativos de regeneración (Peyronnard y col., 1987; Bieri y col 1997; Elder y col., 1998).

Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos del análisis de nervios en regeneración de ratas controles tubulizadas con silicona o quitosana, respecto a los tejidos de ratas controles-intactos, ninguno de los grupos tubulizados alcanzó los valores de normalidad, ambos difirieron significativamente del grupo control intacto ($p < 0.05$) (gráfico 4). El mayor calibre fue alcanzado en los nervios provenientes del grupo de animales tubulizados con silicona, cuando fueron comparados con los tejidos de ratas controles tubulizadas con quitosana. Por el contrario, se alcanzaron los valores mas cercanos a la normalidad en el análisis cuantitativo de cortes correspondientes a los crecimientos nerviosos del grupo de ratas tratadas con progesterona y tubulizadas con quitosana. No se encontraron diferencias significativas cuando fueron comparados los valores de estos animales con los correspondientes al grupo de nervios controles intactos, sin embargo; al comparar los valores de estas ratas quitosana-progesterona, contra los obtenidos de los otros dos grupos de animales tubulizados (vehículo-silicona y vehículo-quitosana), las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con progesterona mejoró los efectos que se alcanzaron con la prótesis de quitosana, y estos efectos se manifestaron principalmente sobre el calibre axónico, fue mayor que el observado en los otros dos grupos de ratas que no fueron tratadas con esta hormona.

Número de axones por campo visual cuantificado (368 μm^2)

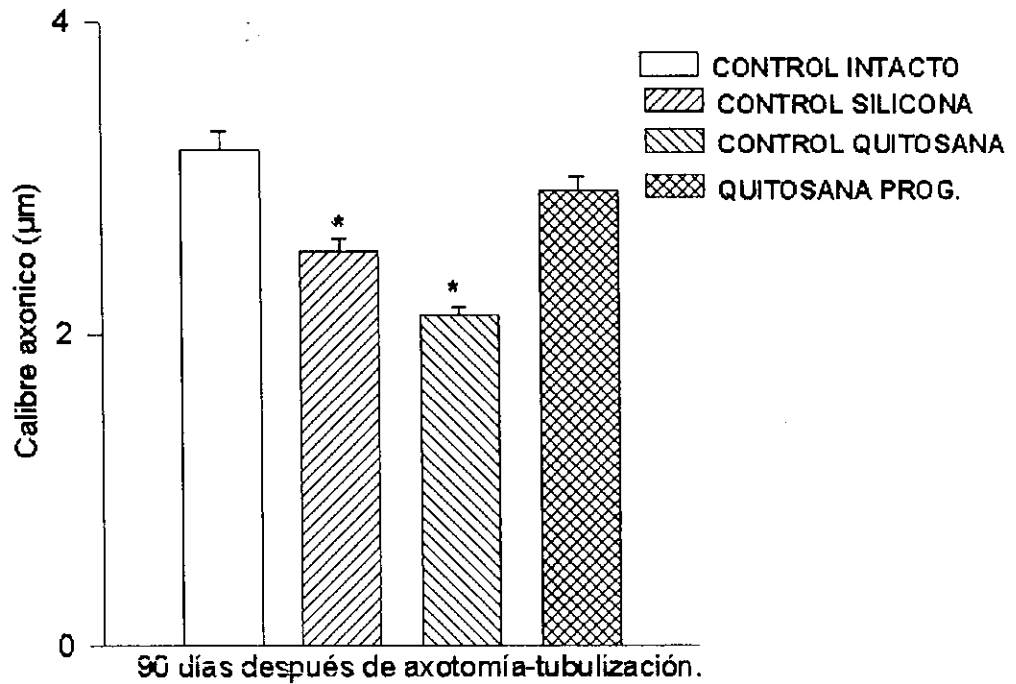
En el análisis de cortes de nervios en regeneración, provenientes de ratas sacrificadas a los 90 días después de la axotomía y tubulización del nervio ciático, los mejores resultados correspondieron al grupo de animales tubulizados con quitosana, en comparación con los tejidos de animales controles intactos ($p < 0.05$) (gráfico 5), se identificó un mayor número de axones, indicativos de los efectos favorables por la prótesis de quitosana.

Al comparar los valores obtenidos del análisis de cortes provenientes del segmento medio de los crecimientos nerviosos en el grupo de ratas tubulizadas con quitosana que no fueron tratadas con progesterona, con respecto a los valores de animales controles-vehículo tubulizados con silicona, no se observaron diferencias significativas entre ambos. Las diferencias si resultaron significativas en la comparación respecto al número de axones presentes en las muestras del grupo de nervios controles intactos, -los tejidos experimentales revelaron valores superiores a estos últimos.

Los animales tubulizados con quitosana que previamente recibieron implantes sc para liberación prolongada de progesterona y en los que también se depositó este esteroide en el interior de la prótesis para lograr efectos "*in situ*", no mostraron diferencias estadísticas en el número de axones, al compararlos con los otros dos grupos de animales tubulizados (quitosana sin progesterona), (silicona-vehículo). Las diferencias principales consistieron un mayor grado de organización estructural, -atribuible a los efectos sistémicos y locales de la progesterona, este arreglo fue muy parecido al que se observó en los nervios controles-intactos (Fig. 16-D 1 y 2).

Regeneración del nervio ciático de ratas.

SEGMENTO MEDIO DEL CRECIMIENTO NERVIOSO.



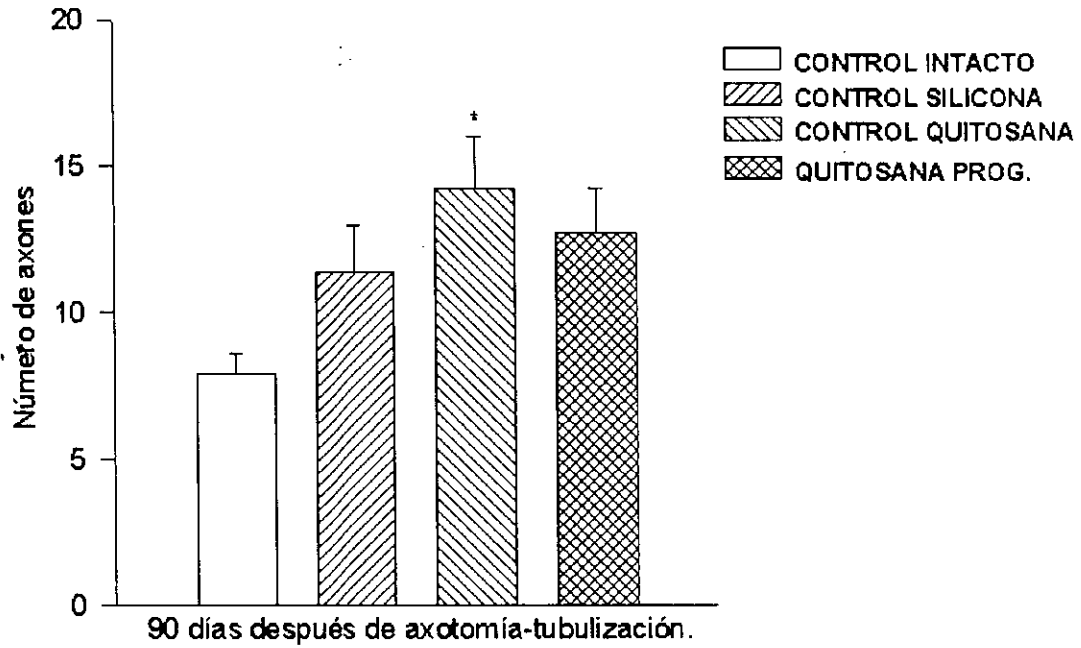
*Indica diferencia significativa con respecto al grupo control intacto
La barra marca la media \pm error estándar

ANOVA-Tukey ($p < 0.05$)

Gráfico 4: Se muestra el promedio del diámetro interno axónico en el segmento medio del crecimiento nervioso a los 90 días poslesión-tubulización, destaca el efecto benéfico por la influencia de progesterona, en comparación con los tejidos de animales controles-intactos ($p < 0.05$).

Regeneración del nervio ciático de ratas.

SEGMENTO MEDIO DEL NERVIOS EN REGENERACIÓN.



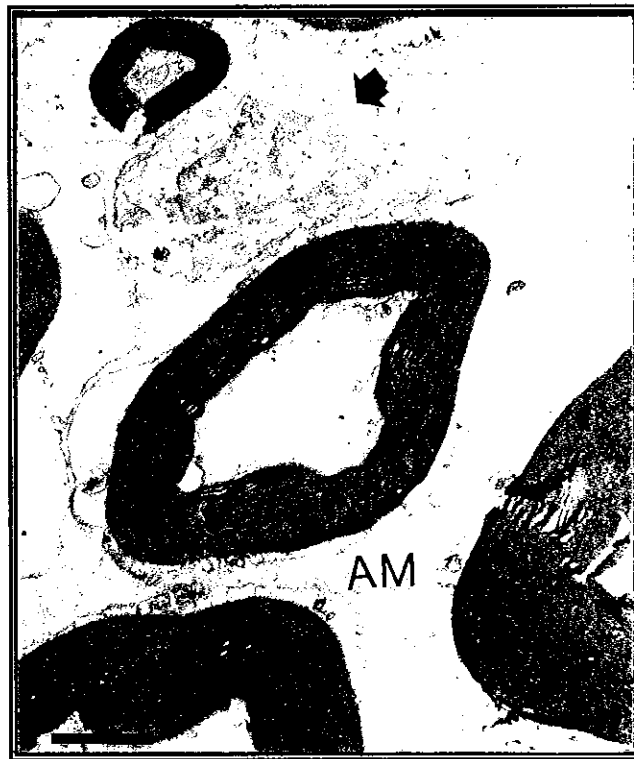
* Indica diferencia estadística con respecto al grupo control intacto
La barra muestra la media ± error estándar

ANOVA-Tukey (p<0.05)

Gráfico 5: Número promedio de axones en cortes de crecimientos nerviosos de animales controles y experimentales, destacan los efectos benéficos de la quitosana, ella produjo el mayor incremento del número de axones –indicativo de regeneración nerviosa–.

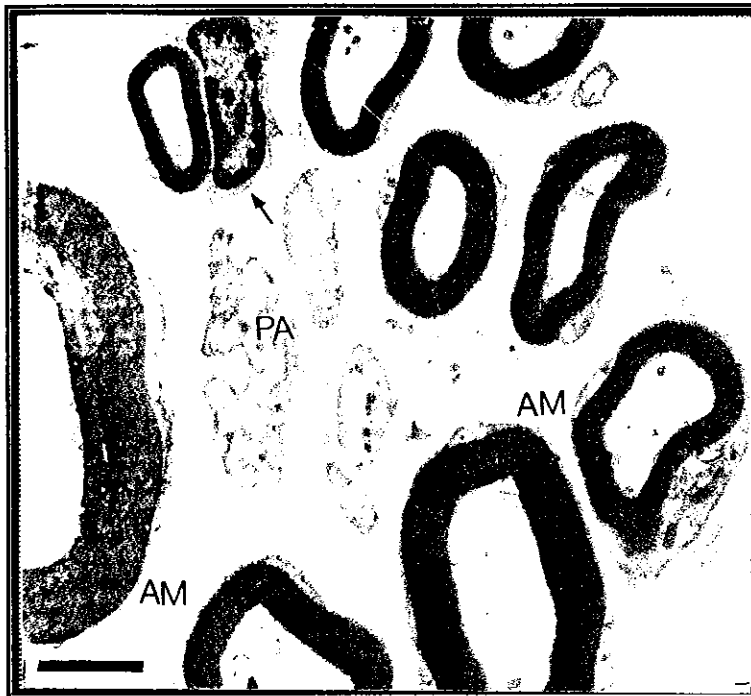
Fig. 16. Fotomicrografías de cortes transversales de 60-80 nm de espesor, del segmento medio del nervio en regeneración. Tejidos incluidos en resinas epóxicas y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, amplificación 3 K.

A) Nervios Controles Intactos, **B)** Controles Silicona, **C)** Control Quitosana y **D)** Quitosana-Progesterona.



A) NERVIOS CONTROLES INTACTOS: Se observan axones (**AM**) de apariencia normal con un espesor homogéneo de mielina, se distingue una célula de Schwann envolviendo un axón (flecha). Barra = 2 μ m.

1

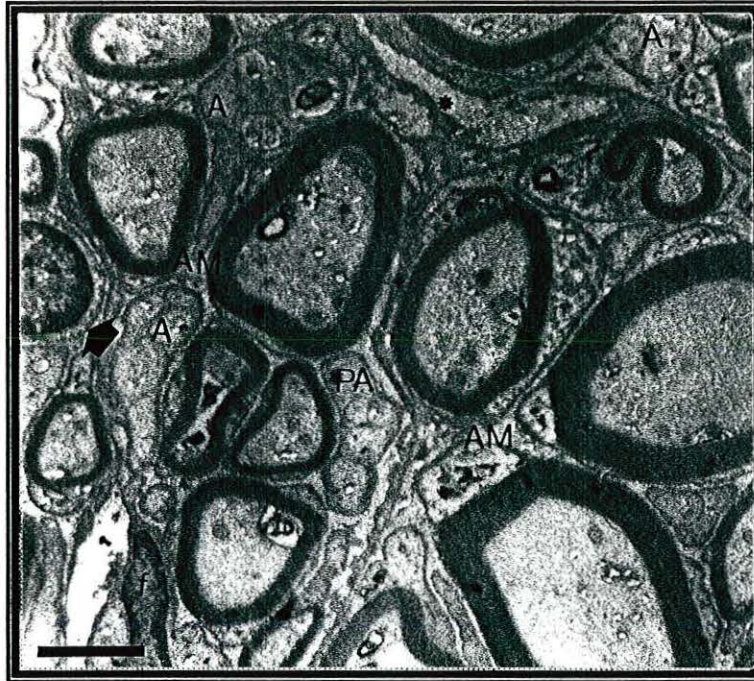


2



B) CONTROLES SILICONA: En ambas fotomicrografías, se identifican axones mielinizados (AM), en proceso de mielinización y no mielinizados (PA), en todos los cortes examinados se observaron axones de calibre irregular. Barra = 2 μ m.

1



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

2



C) CONTROL QUITOSANA: En la fotomicrografía 1 y 2 se observan células de Schwann en distintos estadios de maduración (flechas), así como fibras de colágena, elásticas y reticulares (*). También se identifican axones mielinizados (**AM**) y no mielinizados (**PA**), el la fotomicrografía número 1, se observa un fibroblasto (**f**), Barra = 2 μ m.

1



2



D) QUITOSANA-PROGESTERONA: Se observan en ambas imágenes axones mielinizados (AM), ellos muestran características morfológicas semejantes a las observadas en los axones presentes en cortes de nervios controles intactos en la última fotomicrografía se distingue una célula de Schwann envolviendo un axón (flecha), además de axones mielinizados y en proceso de mielinización (PA).

Barra = 2 μ m.

8 DISCUSION

Las prótesis de quitosana no produjeron manifestaciones evidentes de rechazo, al parecer este biomaterial fue bien tolerado al utilizarse como prótesis para facilitar la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas, por lo puede considerarse como una alternativa terapéutica de gran valor en la medicina reconstructiva, sin embargo no es posible afirmar que puede utilizarse para otras especies animales sin ningún riesgo, para ello es necesario que se realice un estudio de tipo inmunológico que revele si existen manifestaciones de respuesta celular o humoral por la presencia de la prótesis, lo anterior es actualmente motivo de estudio en nuestro laboratorio.

En la rata se ha descrito una gran tolerancia inmunológica, aparte que la cantidad utilizada de quitosana fue mínima, respecto a la masa corporal del animal, para otras posibles aplicaciones de la quitosana, como por ejemplo; para el revestimiento de áreas extensas de superficie corporal lesionada por abrasión o quemadura, podría suponerse que la posible respuesta sería más intensa, por la mayor superficie de contacto.

En este estudio, en los crecimientos nerviosos que se observaron en los tejidos de ratas tubulizadas con prótesis de quitosana se distinguieron crecimientos axónicos similares a los resultantes en nervios de animales tubulizados con prótesis de silicona, sin embargo una de las principales ventajas por el uso de las primeras es que no se requiere de una segunda cirugía para retirarlas, debido a que gradualmente desaparecen, al ser atacada la quitosana por enzimas tisulares (Allan, 1984; Tomihata y col., 1997); esta propiedad física de la quitosana quedó demostrada al analizar las paredes del tubo a los 90 días después de haber colocado la prótesis, en ellas se observó un desgaste notable, por lo que suponemos que terminará por desaparecer completamente en un periodo de tiempo mayor, para demostrar esta hipótesis sería necesario realizar otros estudios por periodos de tiempo más largos con implantes de quitosana de la misma composición química que la utilizada en este estudio -- *N-acetilglucosamina* -- (Allan, 1984; Kristiansen, 1998; Hirano y Midorikawa, 1998) ,

ya que otra de las cualidades de este material es la posibilidad de modificar su forma química mediante la incorporación de otros compuestos como aldehídos, para formar entrecruzamientos poliméricos que hagan más estable el compuesto y prolonguen su permanencia en los tejidos por periodos variables de tiempo. Un inconveniente por el uso de aldehído (glutaraldehído) es la mayor reacción tisular que no favorece la reparación del daño, por lo que otra posibilidad es el uso de compuestos como el ácido glioxálico, que además puede modificar las propiedades físicas del compuesto (adhesividad, elasticidad, dureza etc.) (Kas y col., 1997).

En el análisis microscópico de las paredes externas del tubo se identificaron abundantes leucocitos, así como macrófagos, la presencia de éstos últimos podría explicar el desgaste observado de la quitosana, por sus propiedades fagocíticas (Nicolli-Aldini y col., 1993; Lee y col., 1995; Tomihata y col., 1997).

Tal como había sido reportado previamente por diferentes autores, la aplicación del Índice Funcional del Nervio Ciático (IFC) resultó una prueba adecuada para valorar la regeneración nerviosa, -evaluada mediante el control motor de los dedos a través del análisis de huellas, que refleja la recuperación motora de la pierna lesionada (Lowdon y col., 1988; Bain y col., 1989; Johnston y col., 1991; Ninjiang y col., 1995), sin embargo es importante hacer notar que mediante esta prueba solamente se analiza una de las funciones de la pierna lesionada, sin que sea posible inferir que es lo que sucede con las fibras sensitivas, debido a que el nervio ciático es un nervio mixto, para ello sería necesario realizar estudios de electroconductividad en respuesta a potenciales evocados, lo que no corresponde a los objetivos propuestos en este estudio.

Al analizar los diferentes parámetros contemplados para este estudio se hicieron evidentes notables diferencias entre los dos grupos de animales controles; cuyos nervios fueron reparados utilizando tubos de quitosana o silicona. El uso de uno u otro tipo de prótesis produjo diferentes resultados, los mejores correspondieron a la quitosana, independientemente de sus efectos benéficos directos, este biomaterial también puede utilizarse como vehículo para la liberación prolongada de otras sustancias con efectos mitogénicos o tróficos para el tejido nervioso lesionado, por si misma parece actuar como matriz para orientar el

crecimiento de neuritas y así facilitar la recuperación del nervio en regeneración (Uttley y col., 1996).

En los animales pertenecientes al grupo de ratas que fueron implantadas con cápsulas subcutáneas de silicona para la liberación prolongada de progesterona, a fin de que alcanzaran niveles séricos estables antes de practicar la axotomía y tubulización con quitosana, este neuroesteroide permitió que el IFC alcanzara valores más cercanos a la normalidad al finalizar el estudio. Además; en el examen estereomicroscópico, la apariencia de estos nervios fue lo más parecida a la de nervios normales. Todos estos datos nos confirman que es posible utilizar prótesis para liberación prolongada de esteroides a partir de quitosana, este recurso representa una alternativa terapéutica importante para una posible aplicación en clínica reparativa humana.

Al realizar el análisis microscópico del dominio medular del nervio ciático utilizando la tinción de Nissl para el marcaje de neuronas, de las cuales se analizó su integridad; en ninguna de las muestras analizadas se identificaron células con signos degenerativos, o que hayan sufrido necrosis. Estos resultados demuestran que la axotomía seguida de tubulización del nervio ciático con prótesis de quitosana o silicona, no produjo degeneración neuronal en ninguno de los periodos analizados (60 y 90 días post-axotomía), independientemente de los posibles efectos benéficos de la progesterona sobre la supervivencia neuronal. La tubulización impidió que se produjera degeneración neuronal retrograda, que podría haberse manifestado por cromatolisis, excentricidad nucleolar, edema, vacuolización y finalmente necrosis (Hans, 1969; Chaudhry y col., 1992; Dumitru, 1994; Ganong, 1997).

Debe señalarse que la tubulización temprana de un nervio seccionado es un factor de fundamental importancia para que pueda lograrse la regeneración del mismo, no sería posible lograr los mismos resultados cuando se tubulice un nervio seccionado después de una hora o en tiempos más prolongados, ya que para entonces sería necesario hacer resección de un segmento, -a fin de alcanzar una porción del nervio que no haya sufrido degeneración, resultando un alargamiento de la distancia entre los muñones, este es el segundo aspecto que debe tenerse en cuenta para alcanzar una regeneración exitosa, ya que a pesar de que se tengan

todas las circunstancias favorables, existen límites máximos permisibles de separación entre los extremos del nervio, para alcanzar una regeneración exitosa, ya que en distancias mayores a 15 mm es menos probable lograr una regeneración nerviosa exitosa (Lundborg y col., 1994; Chavez-Delgado y col., 1997, 1998). En el estudio histológico con microscopía de luz de cortes transversales de los extremos distales de nervios regenerados a través de prótesis de silicona o quitosana, se observó un mayor grado de organización estructural en el grupo de animales tubulizados con silicona, comparados con los crecimientos presentes en los nervios provenientes del grupo de animales controles tubulizados con quitosana, que no recibieron implantes sc de progesterona desde antes de seccionar el nervio.

En estos nervios solo se observaron crecimientos monofasciculados, parecidos a los que se encuentran en un nervio normal, esto nos indica un estadio de maduración casi completa del crecimiento nervioso, el cual estaba compuesto por una sola capa de células perineurales envolviendo al crecimiento nervioso, como ya ha sido descrito por otros autores con modelos similares de reparación mediante tubulización (Morris y col., 1972; Williams y col., 1987; Lundbrong, 1988; Spector 1991, 1992).

Por otra parte, el neuroesteroide progesterona, en combinación con la prótesis bioactiva de quitosana contribuyó notablemente a incrementar el número de axones, su tamaño y el grado de mielinización axónica, estos resultados nos permitieron confirmar la hipótesis motivo de este estudio, -el uso combinado de progesterona y prótesis de quitosana facilita la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas-, ya que los crecimientos resultantes tuvieron una organización muy semejante a la que correspondería a un nervio control no lesionado.

En los tejidos nerviosos del grupo de ratas que recibieron implante sc de cápsula de silicona para liberación prolongada de progesterona, y en las que se colocaron prótesis de quitosana conteniendo progesterona en sus paredes para su liberación *"in situ"*, se observó un aumento del área ocupada por mielina, en comparación con los valores obtenidos de nervios controles intactos. Lo anterior posiblemente fue debido a una sobre-estimulación inducida por los efectos *"in situ"* y sistémicos de progesterona, sobre las células de Schwann (Koenig y col., 1995, Baulieu y

col., 1997; Desarnaud y col., 1998). Posiblemente el estadio en que fueron sacrificados los animales correspondió a una etapa intermedia en la regeneración y maduración del nervio lesionado, sin que se haya completado la remodelación de las estructuras nerviosas neoformadas, lo cual se ha descrito que sucede en estadios tardíos mediante un mecanismo apoptótico (Martín y col., 1999), de modo semejante a como normalmente se produce remodelación del tejido nervioso durante el desarrollo posnatal.

Del análisis con microscopía de luz, en cortes transversales de nervios de ratas sacrificadas a los 90 días después de la axotomía-tubulización, tanto en los tejidos de animales controles tubulizados con prótesis de quitosana o silicona se identificaron células de Schwann, fibroblastos y células endoteliales vasculares en distintos estadios de maduración, así como fibras de colágena, elásticas y reticulares.

Consideramos favorable la presencia de éstas células; por una parte son componentes de una cicatriz incipiente y asimismo pueden considerarse como precursores de una matriz celular y de tejido conectivo laxo, misma que posteriormente contribuirá a la formación de una membrana basal, -substrato de crecimiento para las fibras nerviosas y la producción de factores tróficos (Kanje y col., 1988; Chen y col., 1989, 1995; Chongliang y col., 1992; Spector y col., 1993; Varón, 1993), estos elementos celulares y del tejido conectivo normalmente están presentes durante la regeneración de un nervio periférico.

A través del estudio, en ninguna de las muestras analizadas se identificaron células de origen inflamatorio, tampoco se observó una cicatriz fibroide ocupando el lugar del nervio en regeneración, independientemente del tipo de prótesis utilizada y del tratamiento con progesterona. Lo anterior indica que la manipulación quirúrgica se realizó adecuadamente y que la presencia de quitosana no provocó inflamación local, tomando en consideración los parámetros analizados es posible afirmar que fue igualmente tolerada que la silicona.

Los mejores crecimientos nerviosos correspondieron al grupo de animales que fueron tratados con progesterona sistémica (*implantes sc de silicona para la liberación prolongada de progesterona desde antes de provocar la lesión*) y local

(tubos de quitosana que contenían progesterona embebida en sus paredes), en los cortes de estos nervios se observaron axones mielinizados de aspecto muy semejante a los de nervios controles intactos.

En el análisis mediante microscopía electrónica de los crecimientos nerviosos de animales sacrificados a los 90 días poslesión no se observaron células de origen no nervioso ó inflamatorias; en ninguno de los grupos de animales controles y experimentales. En los cortes provenientes de los animales controles se pudieron observar elementos de tejido conectivo precursores de la organización de una estructura fascicular, células de Schwann en distintos estadios de maduración - tomando en consideración la distribución y el aspecto de la cromatina nuclear; los mayores acúmulos perinucleares de heterocromatina fueron considerados como indicativos de inmadurez-. También se observaron axones mielinizados y no mielinizados de distinto calibre, así como vainas de mielina compacta de espesor variable, todo esto indicativo de un nervio en proceso de maduración.

En ninguna de las muestras del segmento nervioso distal se observaron axones con indicios de degeneración, manifiesta por fragmentación de las laminas de mielina o retracción axonal. Por otra parte, se observaron axones de mayor calibre y completamente mielinizados en los crecimientos nerviosos donde se utilizaron prótesis de quitosana y los animales estuvieron bajo la influencia "*in situ*" y sistémica de progesterona, en estas preparaciones los axones revelaron una mayor homogeneidad en el espesor de las vainas de mielina, siendo esta imagen muy similar a la observada en nervios controles intactos.

Estos resultados confirman los hallazgos previamente reportados; se describieron efectos benéficos de la progesterona sobre la reorganización de nervios periféricos lesionados, estas acciones fueron explicadas por una influencia específica del esteroide sobre receptores clásicos a progestágenos (vía interacción con GABA_A), fue promovida la activación de mRNA para proteínas implicadas en la síntesis de mielina (MAP, MBP, MAG, PO y PMP22), así como la producción de factores tróficos, promotores del crecimiento nervioso y proliferación de células de Schwann. De esta manera, la progesterona posiblemente produjo sus efectos al unirse a sitios receptores específicos, ellos han sido descritos en el nervio ciático y

células de Schwann, donde modulan la síntesis y metabolismo de proteínas productoras de mielina (Morfin y col., 1992; Akwa y col., 1993a; Koenig y col. 1995; Baulieu y col., 1997; Desarnaud y col., 1998; Reiner y Florian, 1999; Melcangi y col., 2000).

Por lo anterior, es posible afirmar que con la combinación de dos factores; prótesis nerviosas biocompatibles y tratamiento con esteroides neuro-activos puede ofrecerse una alternativa terapéutica distinta a las actualmente utilizadas para reparación de nervios lesionados, que podría aplicarse en cirugía reconstructiva de lesiones nerviosas, que por sus características están fuera del alcance de los métodos convencionales. Una de las limitaciones que pueden surgir para la utilización de progesterona es por sus características de hormona femenina, sin embargo existen otros compuestos como la pregnenolona que podrían utilizarse para varones, aparte de que también es posible la utilización "*in situ*" de los esteroides, con efectos favorables semejantes a los descritos.

Por otra parte, además del estudio de tolerancia inmunológica mediante análisis de las respuestas celular y humoral de los individuos implantados con quitosana, es necesario realizar un estudio estructural para identificar el linaje de cada uno de los elementos celulares y no celulares presentes en el nervio en regeneración, mediante análisis inmunocitoquímico con microscopía electrónica de transmisión, a fin de aumentar la comprensión del fenómeno. Del mismo modo, el estudio correlativo entre morfología y funcionalidad, -evaluada mediante análisis electrofisiológico haría posible determinar si también se produjo regeneración de fibras sensitivas, -indicativa de una completa regeneración del nervio.

EN RESUMEN:

Mediante la utilización del modelo de tubulización del nervio ciático de ratas adultas se analizaron los efectos por el uso de prótesis de quitosana, en combinación con progesterona, -hormona gonadal que es también un neuroesteroide, y que ha demostrado efectos facilitadores sobre la reorganización de nervios lesionados. Tomando como referencia la utilización de prótesis de silicona se analizaron los siguientes parámetros;

a Velocidad de recuperación motora de la pierna lesionada.

- b Reactividad glial en el dominio medular del nervio ciático axotomizado-tubulizado (Gómez-Pinedo y col., 1997, 1998ab).
- c Arreglo histológico del nervio axotomizado y tubulizado (segmento distal).
- d Organización ultraestructural de elementos extracelulares, células nerviosas y no nerviosas presentes en la cámara de crecimiento nervioso.

Los resultados obtenidos de los distintos parámetros examinados demostraron que las prótesis de quitosana produjeron efectos comparables a los que se lograron por el uso de prótesis de silicona, la ventaja por el uso de las primeras es el evitar una segunda cirugía para retirarlas, los mejores efectos sobre la respuesta regenerativa de los nervios se lograron por la combinación de prótesis de quitosana y el uso del neuroesteroide progesterona. Este esteroide estimula el crecimiento nervioso, independientemente de las consecuencias por el tipo del material utilizado para elaborar la prótesis.

Deben realizarse estudios adicionales para garantizar la ausencia de efectos secundarios por la presencia prolongada del biomaterial analizado, así como su posible utilización para liberación prolongada de compuestos, - esto último tendría significativas implicaciones benéficas en lesiones del tejido nervioso.

9 CONCLUSIONES

- ❖ La progesterona facilitó la regeneración del nervio ciático de ratas axotomizado y tubulizado.
- ❖ El uso de quitosana produjo mejores resultados que la silicona, sobre la recuperación funcional del nervio lesionado.
- ❖ La utilización de quitosana en combinación con progesterona favoreció la regeneración y recuperación funcional del nervio ciático lesionado.
- ❖ La ausencia de efectos secundarios atribuibles a la presencia de la prótesis de quitosana, que podrían haberse evidenciado mediante las técnicas de análisis utilizadas y los hallazgos morfológicos indicativos de regeneración nerviosa permiten proponer la utilización del biomaterial "quitosana" en la reparación de nervios de otras especies animales.

10 BIBLIOGRAFIA

- Aguado A., David S., Richardson P., Bray G.** Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Adv Cell Neurobiol.* 1982;3:215.
- Akbuga J., Bergisadi N.** 5-Fluorouracil-loaded chitosan microspheres: preparation and release characteristics. *J Microencapsul.* 1996; 13:161.
- 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).* 1993a;316:410.
- 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.* 1993b;121:135.
- Allan G.** Biomedical applications of chitin and chitosan. In: Chitin, Chitosan, and related enzymes. *Ed. Academic Press, Inc. Montreal.* 1984;119.
- Azzam N., Zalewski A., Williams L., Azzam R.** Nerve cables formed in silicone chambers reconstitute a perineurial but not a vascular endoneurial permeability barrier. *J Comp Neurol.* 1991;314:807.
- Bain J., Mackinnon S., Hunter D.** Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83:129.
- 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.* 1994;39:23.
- 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.* 1993;22:176.
- Barakat W.** Role of thyroid hormones and their receptors in peripheral nerve regeneration. *J Neurobiol.* 1999; 40: 541.
- Bates D., Ranford J., Mängelsdorf D.** Blot and Culture Analysis of Neuronotrophic Factors in Nerve Regeneration chamber Fluids. *Neurochem Res.* 1991;16:621.
- Baulieu E., Schumacher M.** Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone o myelination in peripheral nerves. *Multiple Sclerosis.* 1997; 3:105.
- Baulieu E.** Neurosteroids: a new function in the brain. *J Biol Cell.* 1991;71:3.
- Baulieu E., Robel P.** Neurosteroids: A new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990;37:395.

- Baulieu E.** Steroid hormones in the brain: several mechanisms?. En *Steroid Hormone Regulation of the Brain*. Ed. Fuxé K., Gustafsson JA and Wettenberg L. Pergamon Press, Oxford. 1981;pp 3.
- Bayomi M., Suwayeh S., Helw A., Mesnad A.** Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharm Acta Helv* 1998;73:187.
- Bernadette K., Stewart G., Sherman D., Brophy P.** Schwann cells of the myelin-forming phenotype express neurofilament protein NF-M. *J Cell Biol.* 1992;118 (2): 397.
- Braun R.** Comparative studies of neuroorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. *Surg Gynecol Obstet.* 1966;122:15.
- 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. 1991;24:3,739.
- Bridge P., Ball D., Mackinnon S., Nakao Y., Brandt K., Hunter D., Hertl C.** Nerve crush injuries. A model for axonotmesis. *Exp Neurol* 1994;127:284.
- Broussignac P.** Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie Le Chitosane. *Chimie et Industrie –Genie Chimique* 1968;99:1241.
- Bunge M., Williams A., Wood P.** Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol.* 1982;92:449.
- Campbell J., Bassett C., Husby J., Thulin C., Feringa E.** Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma.* 1961;1:139-157.
- Clemens L., Weaver D.** Structure and biosynthesis of gonadal steroids. En "*Handbook of behavioral neurobiology*". Normand Adler, ed, Plenum Press, New York. 1985;7:185.
- 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.
- Chavez-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. IV Reunión nacional de Investigación médica-IMSS. 1997.
- Chávez-Delgado M., García-Estrada J., Huerta-Viera M., Gómez-Pinedo U. Luquín de Anda S.** El neuroesteroide progesterona modula la astrogliosis del núcleo motor del nervio facial. 4ta Reunión Regional de Investigación Médica de Occidente. 1998.
- Chen Y., Wang-Bennett L., Coker N.** Facial Nerve regeneration in the silicone chamber: The influence of Nerve Growth Factor. *Exp Neurol.* 1989;103:52.

- Chen Z., Wang M. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16:547.
- Chongliang H., Zhongwei C., Zhengrong C. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery*. 1992;13:151.
- Del Cerro S., Garcia-Estrada J., Garcia Segura LM. Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adults rats. *Glia*. 1995;14:65.
- Danielsen N. Nerve regeneration and repair. *Diabetic Medicine*. 1996;13:677.
- Danielsen N., Pettman HL., Vahlsing M., Varon S. Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res*. 1988;20:320.
- Davis G., Varon S., Engvall E., Manthorpe M. Substratum-binding neurite-promoting factors:relationships to laminin. *Trends Neurosci*. 1985;8:528.
- Denuziere A., Ferriere D., Damour O., Domard A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials* 1998;19:1275.
- Desarnaud F., Thi Do, Brown A., Lemke G., Suter U., Baulieu E., Schumacher M. Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem*. 1998; 71 (4):1765.
- Douglas F., Ellisman M. Axons regenerated through silicone tube splices. *Exp Neurol*. 1986b; 92:61.
- Douglas F., Ellisman M. Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction Properties. *Exp Neurol*. 1986a;92:48.
- Dumitru D. Reaction of the peripheral nervous system to injury. In *Electrodiagnostic Medicine*. Ed Hanley-Belfus, Inc., Philadelphia. 1994;341.
- Duncan I., Greveer W., Chun-Zhang S. Repair of myelin disease: strategies and progress in animal models. *Mol Med Today*. 1997;12:554.
- Elder G., Friedrich V., Pereira D., Tu P., Zhang B., Lee V., Lazzarini R. Mice with disrupted mid-sized and heavy neurofilament genes lack axonal neurofilaments but have unaltered numbers of axonal microtubules. *J Neurosci Res*. 1999; 57:23.
- Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill G., Denoroy L., Klepper 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*. 1985;133:554.
- Felt O., Buri P., Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998;24:979.

- Forssman J.** Uber die Ursachen welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nervenfasern bei der regeneration bestimmen. *Beit Pathologisch Anat allgem Pathol.* 1989;24:56.
- Forssman J.** Zur kenntnis des neurotropismus. *Pathologisch Anat allgem Pathol.* 1900;27:407.
- Gabrielson G., Stenstrom J.** A contribution to peripheral nerve suture technique. *Plast Reconstr Surg.* 1996;38:68.
- Ganong W.** Tejido excitable:Nervio. In: *Fisiología médica.* Ed: Manual Moderno S.A de C.V. México D.F.-Santafé de Bogotá, 16va edición. 1997.pag.57.
- Genta I., Peruginini P., Pavanetto F.** Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:779.
- Gentty R.** Anatomia de los animales domesticos. Ed. *Salvat.* 1986; pp. 2219.
- 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.
- Hall Susan.** Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 1997; 190:57.
- Hann Bonnekoh P., Scheidt P., Friede R.** Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studing myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol .* 1989;48:140.
- Heathcock C., StrieiT Wieser A.** Chemical Organic. McGraw Hill Ed. Berkeley USA. 1993; 29: 1041.
- 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).* 1987;84:8735.
- Hildebrad M.** Anatomia y embriologia de los vertebrados. Ed. Limusa. 1982; pp. 419.
- Hirano S., Midorikawa T.** Novel metod for the preparation of N-acylchitosan fiber and N-acylchitosan-cellulose fiber. *Biomaterials.* 1998;19(1):3293.
- Hurtado Hernán, Bernard Knoop, Phillippe Van Den Bosch de Aguilar.** Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp Neurol.* 1987;97:751.
- Ide C.** Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996;25:101.
- Ide C.** Role of extracellular matrix in the regeneration of a painian corpuscle. *Brain Res.* 1987;413:155.

- Ide C., Tohyama K., Yokota R., Nitatori T., Onodera S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* 1983;288:61.
- Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998;15:1326.
- Jameela S., Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitosantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials* 1995;16:10,769.
- Jameela S., Kumary T., Lal A., Jayakrishnan A. Progesterone-loaded chitosan microspheres. A long acting biodegradable controlled delivery system. *J Controlled Release* 1998; 52:17.
- Jo D., Abdallah M., Young J., Baulieu E., Robel P., Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and its sulfur sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids.* 1989;54:287.
- Johnston R., Zachary L., Dellon A. Improved imaging of the rat hindfoot prints for walking track analysis. *J Neurosci Methods.* 1991; 28:111.
- Jung-Testas I., HU Z., Baulieu E., Robel P. Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone as progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology.* 1989;125:2083.
- Jung-Testas I., Schumacher M., Robel M., Baulieu E. Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1994;48:145-154.
- Kable W., Leonhardt H., Platzer W. Sistema nervioso y órganos de los sentidos. En *Atlas de Anatomía.* Ed Omega, S.A.-Plató- Barcelona. 1988; pag.34.ç
- Kanda K., Soto H., Hashizume K., Yamada J. The effects of blocking nerve conduction on retrograde HRP labeling of rat motoneuron. *Neurosci Lett.* 1989; 99:153.
- 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.* 1988;439:116.
- Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul* 1997;14:689.
- Kliment P., Persson H., Bethold C. Removal of retrogradely transported material from rat lumbosacral alpha-motor axon by paranodal axon-Schwann cell networks. *Glia.* 1997; 20: 115.
- Koenig H., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi A., Ressousches A., Guennoun R. Progesterone Synthesis and Myelin Formation by Schwann Cells. *Science.* 1995;268:1500.

- 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* 1996;58:963.
- Kotzé A., Luessen H., Boer A., Verhoef J., Junginger H.** Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1999;7:145.
- Kristiansen A., Varum KM., Grasdalen H.** Quantitative studies of the non-productive binding of lysozyme to partially N-acetylated chitosan. Binding of large ligands to a one-dimensional binary lattice studied by a modified McGhee and von Hippel model. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:137.
- Kujawa K., Kinderman N., Jones K.** Testosterone-induced acceleration of recovery from facial paralysis following crush axotomy of the facial nerve in male hamsters. *Exp Neurol*. 1989;105:80.
- Kumar G., Smith P., Payne G.** Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol Bioeng* 1999;63:154.
- Lawrence R.** Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochem Res*. 1987;12:851-860.
- Lawrence R.** Regeneration of the axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. *Exp Neurol*. 1993;120:49.
- Lee K., Ha W., Park W.,** Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. *Biomaterials*. 1995;16:1211.
- Lesson C., Lesson T.** Histology. Ed. Interamericana, 5^o Edition, pp 235-238.
- Levi-Montalcini R.** Developmental Neurobiology and the Natural History of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*. 1982;5:341.
- Lindholm D., Heumann R., Meyer M.** Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*. 1987;330:658.
- Lipton S.** Growth factors for neuronal survival and process regeneration. *Arch Neurol*. 1989;46:1241.
- Lorenzo-Lamosa M., Rémunan C., Vila-Jato J., Alonso M.** Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Controlled Release* 1998;52:109.
- Lowdon I., Seeber A., Urbaniak J.** Improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *J Neurosci. Meth*. 1988; 24:279.

- Lundborg G., Bongo F., Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Brain Res.* 1982;232:157.
- Lundborg G., Rosen B., Abrahamson S., Dahlin L., Danielsen N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. *J Hand Surg Brit Eur.* 1994;19B:273.
- Mackinnon S., Dellon A., Hudson A. Chronic nerve compression-an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg.* 1984;13:112.
- Macleoid G., Collett J., Fell J. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *J Controlled Release* 1999;58:303.
- Madison R., Archibald S. 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.* 1994;128:266.
- Majewska M. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA receptor . Mechanisms of action and physiological significance. *Prog Neurobiol.* 1992;38:379.
- Martin L., Kaiser A., Price A. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and apoptosis. *J Neurobiol.* 1999; 40: 185.
- Medinaceli L., Freed W., Wyatt R. . An index of the functional condition of rat sciatic nerve based o measurements made from walk-ing tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77: 634.
- Medinaceli L., Wyatt R.J., Freed W. Peripheral nerve reconnection: Mechanical, thermal and ionic conditions that promote the return of function. *Exp Neurol.* 1983;81:469.
- Melcangi R., Magnaghi V., Martini L. Aging in prophral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *P Neurobiol.* 2000; 60:291.
- Miledi R, Salter C. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol.* 1970;207:507.
- Millaruelo A., Nieto-Sampedro M., Cotman C. Cooperation between nerve growth factor and laminin or fibronectin in promoting sensory neuron survival and neurite outgrowth. *Dev Brain Res.* 1988;28:219.
- Mitsutomi M., Isono M., Uchiyama A., Nikaidou N., Ikegami T., Watnabe T. Chitosanase activity of the enzyme previously reported as beta-1,3-1,4-gluconase from *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62:2107.
- Montero O., Airoidi C. Some Thermodynamic data on copper-chitin and copper -chitosan biopolymer interactions. *J Colloid Interface Sci.* 1999;212:212.
- Müller H., Lawrence R., Varon S. Nerve regeneration chamber: evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Res.* 1987;413:320.

- Muzzarelli RA.** Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci* . 1997;53:131.
- Navarro X., Verdú E., Butí M.** Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol*. 1994;129:217.
- Ninjiang S., Zhu J.** Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery*. 1995; 16:552.
- Ochoa J., Mair WGP.** The normal sural nerve in man. *Acta Neuropath Berl*. 1969;13:197.
- Onishi H., Machida Y.** Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999;20:175.
- Peluso G., Petillo O., Ranieri M., Santin M., Ambrosio L., Calabro D., Avallone B., Balsamo G.** Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994;15:1215.
- Pellegrino R., Politis M., Ritchie J.** Events in degenerating cat peripheral nerve: Induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol*. 1986;15:17.
- Perry V., Luner E., Brown M.** Evidence that the rate of wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur J Neurosci*. 1990; 2:408.
- Peyronnard J., Charron L., Lavoie J. Messier P., Bergouignan F.** A comparative study of the effects of chronic axotomy, crush lesion and re-anastomosis of the rat sural nerve on horseradish peroxidase labelling of primary sensory neurons. *Brain Res*. 1988; 443:295.
- Pham H., Padilla J., Nguyen K., Rosen J.** Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*. 1991;7:31.
- Puia G., Santi M., Vicini S., Prichert D., Purdy R., Paul S., Seeburg P., Costa E.** Neurosteroids act on recombinant Human GABA_A receptors. *Neuron*. 1990;4:759.
- Quong D., Yeo J., Neufeld R.** Stability of chitosan and poly-L-lysine membranes coating DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes. *J Microencapsul* 1999;16:73.
- 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. 329.
- Rao S., Sharma C.** Sterilization of chitosan: implications. *J Biomater Appl* 1995;10:1136.
- Rao S., Sharma C.** Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997;34:21.

- Reiner R., Florian H. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; 22:410.
- 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.* 1991;111:332.
- Rich K., Luszczynski J., Osborne P., Johnson E. Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J Neurocytol.* 1987;16:261.
- Richardson M.P. Neurotrophic factors in regeneration. *Cur Opin Neurobiol.* 1991;1:401.
- Robel P., Baulieu E. Neurosteroids. Biosynthesis and Function. *TEM.* 1994;5:1.
- Robel P., Baulieu E. Neurosteroids: Biosynthesis and Function. *Crit Rev Neurobiol.* 1995b;9:383.
- Robel P., Young J., Corpéchet C., Mayo W., Perché F., Haug M., Simon H., Baulieu E. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1995a;53:355.
- 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.
- Saintigny G., Bonnard M., Damour O., Collombel C., Reconstruction epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG fibroblast. *Acta Derm Venerol* 1993;73:175.
- Salonen V., Peltonen J., Roytta M., Virtanen I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J Neurocytol.* 1987;16:713.
- Sanes J. Laminin for axonal guidance? *Nature.* 1985;315:714.
- Seddon H. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 1994;35:151.
- Sezer A., Akbuga J. Release characteristic of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *J Microencapsul* 1999;16:195.
- Shepherd R., Reader S., Falshaw A. Chitosan functional properties. *J Glycoconj* 1997;14:535.
- 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.* 1990;529:79.

- Smith J.** Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1964;33:317.
- Snider W.** Nerve growth factor enhances dendritic arborization of sympatic ganglion cell in developing mammals. *J Neurosci.* 1998; 8 (7):2628.
- Spector G., Lee P., Derby A., Frierdich G., Neises G., Roufa D.** Rabbit Facial Nerve regeneration in NGF-containing Silastic Tubes. *Laryngoscope.* 1993;103:548.
- Spector G., Lee P., Derby A., Frierdich G., Burke J., Vogler P.** Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope.* 1992; 102:784.
- Spector G., Lee P., Derby A., Roufa D.** Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope.* 1991b; 101:1109.
- Spector J., Lee P., Peterein J., Roufa D.** Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: A clinical and experimental study. *Laryngoscope.* 1991a;101:537.
- Spencer P., Weinberg H., Krygier-Brevart V.** An in vivo method to prepare normal Schwann cells free of axóns and myelin. *Brain Res.* 1979;165:119.
- Stoll G., Griffin J., Li CY.** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. Participacion of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 1989;18:671-683.
- Sunderland S.** The anatomic basis of nerve repair. In: Jewett D, ed. Nerve Repair and regeneration: its clinical and experimental basis. St. Louis: CV Mosby, 1980.
- Terris D., Fee W.** Current issues in nerve reapiar. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:725.
- Tomihata K., Ikada Y.** In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 1997;18:567.
- Trapp B., Hauer P., Lemke G.** Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J Neurosci.* 1988;8:3515.
- Tsai G., Su W.** Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. *J Food Prot* 1999; 62:239.
- Uchegbu I., Schatzlein A., Tetley L., Gray A., Sludden J., Siddique S., Mosha E.** Polymeric chitosan-based vesicles for drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 1998;50:453.
- Ugimoto K., Yoshida M., Yara T., Higaki K., Kimura T.** Evaluation of poly(vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. *Biol Pharm Bull.* 1998;21:11,1202.
- Usami Y., Okamoto Y., Minami S., Matsushashi A., Kumazawa N., Tanioka S., Shigemasa Y.** Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells. *J Vet Med Sci.* 1994a;56:761.

- Usami Y., Okamoto Y., Minami S., Matsushashi A., Kumazawa N., Tanioka S., Shigemasa Y.** Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan. *J Vet Med Sci* . 1994b;56:1215.
- Usami Y., Okamoto Y., Takayama T., Shigemasa Y., Minami S.** Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2. *J Biomed Mater Res*. 1998; 42:517.
- Valtschanoff J., Weinberg R., Rustioni A.** Peripheral injury and anterograde transport of wheat germ agglutinin-horse radish peroxidase to the espinal cord. *Neurosciences*. 1992; 50 (3): 685.
- 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. 371.
- Várur, K., Holme H., Izume M., Stokke BT., Smidsrd O.** Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochim Biophys Acta* 1996;1291:5.
- Wang W., Xu D.** Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol*. 1994;16:149.
- 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*. 1990;107:222.
- Weinstein D.** The role of Schwann cell in neural regeneration. *Neuroscientist*. 1999; 5:208.
- Weiss P.** The technology of nerve regeneration: sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *Neurosurgery*.1944;1:400.
- Werner K.** Sistema Nervioso y Organos de los Sentidos, Ediciones Omega, 1988; tomo 2:32.
- White F., Toews A., Goodrum J.** Lpid metabolism during early stages of wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurochem*. 1989;52:1085-1092.
- Williams L.** Exogenous fibrín matrix precusors stimulatee the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochem Res*.1987;12:851.
- Williams L., Azzam N., Zalewski A., Azzam R.** Regeneration axóns are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. *Exp Neurol*. 1993;120:49.
- Williams L., Longo F., Powell H.** Spatial temporal progress of peripheral nerve regeneration in a silicone chamber; parameters for a bioassay. *J Comp Neeurol*. 1983;218:460.
- Wynn C.** Physiology Book, Harper Collins Publisher, 1987;1:14
- Yu W.** Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem motor nuclei of female rats. *J Neurosci*. 1989;9:3902.

Yu W. Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res.* 1989;491:491-379.

Zhong W., Min-Sheng W. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16:547-551.

Zhu Q., Lindenbaum M., Lavavasseur F., Jacomy H., Julien J. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axónopathy resulting from the toxin β,β' -iminodipropionitrile. *J Cell Biol.* 1998; 143(1):183.

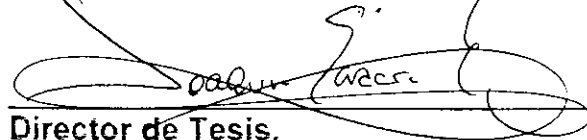


INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMÉDICA DE OCCIDENTE

El Dr. Joaquín García Estrada, Investigador Titular de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente informa que el QFB Ulises A. Gómez Pinedo cumplió cabalmente con los objetivos propuestos para desarrollar el trabajo experimental **“REORGANIZACION DEL NERVIO CIATICO DE RATAS TUBULIZADO CON PROTESIS BIOACTIVAS DE QUITOSANA Y ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL”**, por lo que el trabajo reúne todas las condiciones para considerarse como debidamente concluido para su defensa como Tesis de Maestría.

En Guadalajara Jalisco, el doce de julio del año dos mil.

ATENTAMENTE
“Seguridad y Solidaridad Social”



Director de Tesis.

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL