



TESIS DOCTORAL

Evaluación de la reparación microquirúrgica del nervio periférico mediante el uso de conductos sintéticos y terapia celular en un modelo experimental.

FRANCISCO JAVIER VELA GONZÁLEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Conformidad de la directora Dra. Elena Abellán Rubio y codirector Dr. José María Lasso Vázquez

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y codirector de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2022

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS	5
2.	RESUMEN	9
3.	SUMMARY	10
4.	INTRODUCCIÓN	11
5.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	13
6.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
6.1.	El sistema nervioso	14
6.1.1.	Las neuronas	14
6.2.	Perspectiva histórica	16
6.3.	Lesiones de nervio periférico	24
6.3.1.	Lesiones que permiten neurorrafia sin tensión	24
6.3.2.	Injertos nerviosos	25
6.3.3.	Transferencias nerviosas	27
6.3.4.	Conductos nerviosos	28
6.3.5.	Terapias coadyuvantes	30
6.4.	Modelos animales experimentales	37
6.4.1.	Modelos animales de lesión de nervio periférico	37
6.5.	Investigación preclínica en nervio periférico	38
6.5.1.	Fomento de la regeneración nerviosa	38
6.5.2.	Estudio de la plasticidad neuronal	40
6.5.3.	Estudio del dolor neuropático	41
6.5.4.	Entrenamiento de habilidades y destrezas	41
6.5.5.	Ética en los animales de experimentación	42
6.5.6.	Evaluación de resultados	42
6.5.7.	Limitaciones y direcciones futuras	44
7.	MATERIAL Y MÉTODO	46
7.1.	Justificación del método	46
7.2.	Diseño experimental	47
7.2.1.	Modelo animal	47
7.2.2.	Fases de Laboratorio	49
7.2.3.	Procedimientos quirúrgicos	50
7.2.4.	Seguimiento de los animales y toma de muestras	53

7.3.	Histopatología.....	54
7.4.	RTq-PCR.....	55
7.5.	Análisis estadístico	56
8.	RESULTADOS.....	57
8.1.	Fase de laboratorio.....	57
8.1.1.	Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata.....	57
8.2.	Fase quirúrgica y seguimientos.....	58
8.2.1.	Tiempos quirúrgicos	58
8.2.2.	Peso y estado de los animales.....	60
8.2.3.	Análisis del Índice Funcional del Ciático.....	61
8.3.	Final de estudio y hallazgos macroscópicos.....	64
8.4.	Histopatología.....	65
8.5.	RTq-PCR.....	66
9.	DISCUSIÓN.....	69
9.1.	Limitaciones del estudio.....	77
10.	CONCLUSIONES.....	79
11.	BIBLIOGRAFÍA / REFERENCIAS.....	80
12.	TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS.....	99
12.1.	Artículos científicos	99
12.2.	Abstracts publicados en revistas científicas indexadas en JCR	99
12.3.	Comunicaciones a congresos	100
12.4.	Participación en proyectos de investigación.....	101
12.5.	Experiencia docente y formadora.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de una neurona.....	14
Figura 2. Tipos de neurona según número de prolongaciones.....	15
Figura 3. <i>Nerve Flap</i>	17
Figura 4. Autoinjerto nervioso.....	18
Figura 5. Neurorrafia termino-lateral.....	20
Figura 6. Algoritmo de reparación del nervio periférico.....	25
Figura 7. Imágenes de la cirugía.....	53
Figura 8. Medidas para el cálculo del IFC.....	54
Figura 9. Marcadores celulares de las poblaciones de CMM.....	57
Figura 10. Diferenciación de las CMMAd en las tres líneas celulares.....	58
Figura 11. Tiempos quirúrgicos.....	59
Figura 12. Tiempo de neurorrafia.....	59
Figura 13. Peso medio de los diferentes grupos de estudio.....	60
Figura 14. Impresión de las huellas plantar.....	61
Figura 15. Valor medio del IFC.....	64
Figura 16. Hallazgos macrocópicos.....	64
Figura 17. Resultados histológicos de las muestras control a 40x.....	65
Figura 18. Tinciones histológicas de los diferentes grupos.....	66
Figura 19. Expresión de los genes de las muestras.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de las lesiones de nervio periférico.....	22
Tabla 2. Nervios más utilizados como autoinjertos.....	26
Tabla 3. Moléculas utilizadas en regeneración nerviosa.....	32
Tabla 4. Escala de valoración del dolor en rata.....	48
Tabla 5. Genes estudiados mediante RTq-PCR.....	56
Tabla 6. Medias de las distancias para el cálculo del IFC.....	62

1. ABREVIATURAS

$2^{-\Delta\Delta Ct}$: fórmula para calcular la expresión génica.

3Rs: Principio de las tres erres.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ALCAR: Acetil-L-carnitina.

AMPc: *Adenosine Monophosphate Cyclic* (Adenosín monofosfato cíclico).

Angpt2: Gen de *Angiopoietin 2* (Angiopoyetina 2).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm; Ácido ribonucleico mensajero.

Bcl2: Gen de *B-Cell Lymphoma 2* (Linfoma de células B).

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Factor neurotrófico derivado del cerebro).

Casp3: Gen de *Caspase 3* (Caspasa 3).

Casp9: Gen de *Caspase 9* (Caspasa 9).

CCMIJU: Centro de cirugía de mínima invasión Jesús Usón.

cDNA: *complementary Desoxyribonucleic Acid*.

cm: Centímetros.

cm²: Centímetros cuadrados.

CMM: Células madre mesenquimales.

CMMAd: Células madre mesenquimales de tejido adiposo.

CN: Conducto nervioso.

CNF: *Ciliary Neurotrophic Factor* (Factor neurotrófico ciliar).

CO₂: Dióxido de carbono.

D1'5e: Distancia entre dedos I-V del pie intervenido.

D1'5n: Distancia entre dedos I-V del pie sano.

D2'4e: Distancia entre dedos II-IV intervenido.

D2'4n: Distancia entre dedos II-IV sano.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Medio Eagle modificado de Dulbecco).

EMG: Electromiografía.

EPO: Eritropoyetina.

Em Máx: Emisión máxima.

Ex Máx: Absorción máxima.

FBS: *Fetal Bovine Serum* (Suero fetal bovino).

FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos).

FGF: *Fibroblast Growth Factor* (Factor de crecimiento de fibroblastos).

Ggf2: Gen de *Fibroblast Growth Factor 2*.

g: Fuerza centrífuga relativa.

GAP 43: *Growth Associated Protein 43* (Proteína asociada al crecimiento 43).

GDNF: *Glial Derived Neurotrophic Factor* (Factor neurotrófico derivado de las células gliales).

GGF: *Glial Growth Factor* (Factor de crecimiento glial).

gr: Gramos.

Gusb: Gen de *Glucuronidase, beta* (Beta-glucoronidasa).

Hif1a: Gen de *Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit* (Factor 1-alfa inducido por hipoxia).

ID: Identificación.

IFC: Índice funcional del ciático.

Il1b: Gen de *Interleukin 1 beta* (Interleucina 1 beta).

Il6: Gen de *Interleukin 6* (Interleucina 6).

Il10: Gen de *Interleukin 10* (Interleucina 10).

kDa: Kilodalton.

kg: Kilogramos.

l: Litros.

LFB: *Luxol Fast Blue*.

LHe: Longitud de la huella del pie intervenido.

LHn: Longitud de la huella del pie sano.

LNP: Lesiones de nervio periférico.

meq: Miliequivalentes.

mg: Miligramos.

min: Minutos.

ml: Mililitros.

mm: Milímetros.

NAC: N-acetilcisteína.

NGF: *Nerve Growth Factor* (Factor de crecimiento nervioso).

nm: Nanómetros.

Nro.: Número.

NT-3: Neurotrofina-3.

PAN: Potencial de acción nervioso.

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (Tampón fosfato salino).

PCAM: potencial compuesto de acción motora.

PCL: Policaprolactona.

PCLL: Copolímero de policaprolactona y ácido poliláctico.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa).

PEG: Polietilenglicol.

PGA: *Polyglycolic acid* (Ácido poliglicólico).

PGM: Primera Guerra Mundial.

PI3K: *Phosphoinositide 3 Kinase* (Fosfoinositol-3 quinasa).

PKA: *Protein Kinase A* (Proteína quinasa A).

PKB: *Protein Kinase B* (Proteína quinasa B).

PLA: *Polylactic Acid* (Ácido poliláctico).

PLGA: *Polylactic-co-glycolic Acid* (Copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico).

PODE: Proyección ortogonal de distancia de la punta del pie intervenido al pie sano.

PODn: Proyección ortogonal de distancia de la punta del pie sano al pie intervenido.

PVA: *Polyvinyl Alcohol* (Alcohol polivinílico).

Ras-ERK: Señal extracelular-quinasa regulada del sarcoma de rata.

R.D.: Real Decreto.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNA: *Ribonucleic Acid*.

RTq-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

SC: Subcutáneo.

Sec-CMMAd: Secretoma derivado de células madre mesenquimales de tejido adiposo.

Sem.: Semanas.

SGM: Segunda Guerra Mundial.

SN: Sistema nervioso.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

Sod1: Gen de *Superoxide Dismutase 1, soluble* (Superóxido dismutasa 1 soluble).

T-L: Término-lateral.

Tnf: Gen de *Tumor Necrosis Factor* (Factor de necrosis tumoral).

T-T: Término-terminal.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento endotelial vascular).

Vegfa: Gen de *Vascular Endothelial Growth Factor A*.

- $\Delta\Delta$ Ct: Delta-delta ciclos de transcripción.

μ l: Microlitros.

μ m: Micrómetros.

$^{\circ}$ C: Grados Celsius.

2. RESUMEN

En el ámbito de la microcirugía reconstructiva, la lesión de los nervios es una patología que afecta a una gran parte de los pacientes que acuden a los centros sanitarios. La resolución de este defecto depende de varios factores, destacando la capacidad regenerativa del nervio. Dicha capacidad se ve agravada cuando existe una brecha entre los dos extremos, para la cual los cirujanos emplean autoinjertos o conductos para su tratamiento. Además, la terapia celular es una herramienta que se ha utilizado en los últimos años para tratar de conseguir mejorar los resultados en estos casos, los cuales contribuyen a que los pacientes obtengan una mejor calidad de vida. El uso de modelos preclínicos permite estudiar y comprender el comportamiento del nervio en regeneración, siendo esenciales para llegar a obtener tratamientos eficaces.

El objetivo que se ha planteado en este trabajo ha sido utilizar secretoma derivado de células madre mesenquimales, procedentes de tejido adiposo de rata, dentro de un conducto nervioso sintético, como tratamiento en un modelo animal murino con defecto del nervio ciático.

El estudio se llevó a cabo en un total de 27 ratas Wistar, distribuidas en tres grupos: grupo control, a los animales se les realizó el abordaje, pero sin lesión del nervio; grupo conducto, donde se realizó el defecto nervioso e implantación del conducto y grupo tratamiento, en el que además se aplicó el secretoma dentro del conducto. Para evaluar la capacidad regenerativa del nervio se han empleado métodos de seguimiento consistentes en: índice funcional del ciático mediante la impresión de la huella plantar a lo largo del estudio, histopatología de los nervios, y el análisis de expresión génica al final del estudio.

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas indicaron que la aplicación del secretoma no presenta diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo que lleva el conducto vacío, pero sí que se observa una tendencia a reducir la expresión de genes que favorecen la apoptosis y la inflamación. Sin embargo, no se observó mejoría en la marcha de los animales en el análisis del índice funcional del nervio ciático comparando estos mismos grupos.

A través del estudio de la marcha, se determinó que la manipulación quirúrgica sin lesión nerviosa no alteró la capacidad motora de los animales. Se ha evidenciado que la aplicación del secretoma es segura, aunque no se aprecia efecto terapéutico a los 3 meses, observando que su concentración y método de conservación están muy relacionados con su efecto regenerador. La expresión génica que favorece la inflamación estaba aumentada en los animales con conducto al final del estudio, pero se contempla una inclinación a la reducción de dicha expresión en los animales del grupo con secretoma. Por tanto, se evidencia la necesidad de realizar estudios posteriores que arrojen más información en este campo.

3. SUMMARY

In the field of reconstructive microsurgery, the peripheral nerve injury is a pathology that affects a considerable proportion of patients who visit healthcare centers. The resolution of this defect depends on several factors, especially the regenerative capacity of the nerve. This ability gets worse when there is a gap between the two ends, for which surgeons use autografts or conduits as treatment. In addition, cell therapy is a tool that has been used in recent years to try to improve the results in these cases, which contribute to a better quality of life for patients. The use of preclinical models makes it possible to study and understand the behavior of the regenerating nerve, which is essential to obtain effective treatments.

The objective of this work was to use secretome derived from mesenchymal stem cells, from rat adipose tissue, inside a synthetic nerve conduit, as a treatment in a murine animal model with a sciatic nerve defect.

The study was conducted in a total of 27 Wistar rats, distributed in three groups: control group, in which the animals underwent the approach, but without nerve injury; conduit group, in which the nerve defect was repaired with the implantation of a collagen conduit; and treatment group, in which the secretome was also applied inside the tube. To evaluate the regenerative capacity of the nerve, follow-up methods have been used consisting of: sciatic functional index by plantar footprint impression throughout the study, histopathology of the nerves, and gene expression analysis at the end of the study.

The results obtained from the different tests indicate that the application of the secretome does not present statistically significant differences compared to the group with the empty conduit, but there is a tendency to reduce the expression of genes that favor apoptosis and inflammation. However, no improvement in the gait of the animals was observed in the analysis of the sciatic functional index comparing these same groups.

Through the study of gait, it was shown that surgical manipulation without nerve injury did not alter the motor capacity of the animals. It has been shown that the application of secretome is safe, although no therapeutic effect was seen after 3 months, observing that its concentration and storage are closely related to its regenerative effect. The gene expression that favors inflammation was increased in the animals with conduit at the end of the study, but there is a trend toward reduced expression in the animals in the group with secretome. Therefore, it is evident that further studies are needed to provide more information in this field.

4. INTRODUCCIÓN

Las lesiones de nervio periférico (LNP) son un trastorno común en la actualidad, puesto que, aproximadamente, un millón de pacientes requieren una intervención quirúrgica cada año en todo mundo (1). Hay una gran variedad de factores que causan las LNP, pero principalmente vienen ocasionadas por: aplastamientos, cortes, tracción, isquemia y en menor medida, las causadas por shock eléctrico o vibración (2,3). Dentro de la población civil los accidentes de tráfico son la causa primaria de traumas con afectación nerviosa (4), mientras que las heridas por armas de fuego, bombas y otros dispositivos explosivos resultan ser la causa más común de los militares (5).

Una tercera parte de las LNP son el resultado de laceraciones por objetos afilados o fractura de huesos largos (6), con casi tres cuartas partes de todas las lesiones afectando al miembro superior (7), especialmente al nervio cubital (8). A pesar de que la regeneración axonal ha sido estudiada durante más de un siglo, aún sigue siendo un reto obtener buenos resultados funcionales en lo que respecta a la reparación de los nervios periféricos. Hay muchos factores que afectan a la regeneración nerviosa tras la reconstrucción quirúrgica como, por ejemplo: el tiempo transcurrido entre la lesión y el tratamiento, la edad del paciente, el grado de severidad, la extensión o el tipo de lesión (9). Además, las habilidades técnicas y estrategias utilizadas por los cirujanos también pueden afectar al éxito regenerativo. La introducción de técnicas microquirúrgicas para la reparación del nervio en el año 1964 (10) mejoró los resultados a nivel de la reconstrucción nerviosa.

La primera opción para reparar un nervio traumatizado es la coaptación término-terminal (T-T), realizada mediante sutura epineural o perineural. Sin embargo, los tipos de procedimientos para reparar el nervio han ido extendiéndose con diferentes técnicas como la coaptación término-lateral (T-L) o los injertos y trasplantes nerviosos. Uno de los aspectos más importantes que debería tenerse en cuenta durante la reparación de un nervio es la tensión, ya que los estudios que se han realizado con reparaciones nerviosas sin tensión han demostrado mejores resultados en la regeneración nerviosa que aquellos en los que sí existía tensión (11).

A finales del siglo pasado empezó a estudiarse una forma de potenciar y mejorar la regeneración de los nervios lesionados mediante la terapia celular (12). La aplicación de células madre mesenquimales (CMM), derivadas de varias fuentes como la médula ósea, tejido adiposo, o cordón umbilical entre otras, podían suponer un avance en la regeneración nerviosa. Sus características antiinflamatorias y multipotentes podrían acelerar el proceso

de regeneración reduciendo el malestar de los pacientes que sufren estas lesiones (13). Más adelante se descubrió que la acción beneficiosa de la aplicación de CMM procedía de las microvesículas, micro-ARN y proteínas solubles que excretaban, y del microambiente que generaban (14,15). Por ese motivo se han ido centrando más los estudios recientes en la aplicación de dicho secretoma, que además de poseer esos factores multipotenciales tienen la ventaja de que no generan inmunorreactividad, no siendo necesaria la terapia de inmunosupresión por utilizar CMM de otra persona o no siendo necesario esperar el tiempo requerido para extraer este secretoma de células autólogas, tras cultivarlas, diferenciarlas y expandirlas (16).

Entender la fisiología y regeneración del nervio es fundamental para mejorar la recuperación funcional después de sufrir un daño, siendo necesario fomentar el conocimiento e investigación en este campo. En primer lugar, la realización de estudios *in vitro* para valorar la toxicidad y biocompatibilidad de los diferentes medicamentos, productos y materiales supondría una reducción del uso de animales de experimentación de acuerdo con el principio de las tres erres (3Rs) (17). No obstante, estos ensayos deben continuarse con estudios *in vivo* para evaluar las reacciones tisulares, la respuesta del sistema inmune, la revascularización, la alteración de la función mecánica y otras variables (18). Los animales de laboratorio se han utilizado desde hace mucho tiempo en investigación y los resultados obtenidos en dichos ensayos han mejorado indudablemente la calidad y la eficacia de la medicina y la salud. Los animales experimentales que más comúnmente se utilizan para investigación en neurociencia son: roedores, lagomorfos, pequeños carnívoros, cerdos, pequeños rumiantes y simios (19). El modelo animal traslacional ideal debe reproducir los procesos específicos que ocurren en las lesiones de nervio periférico en el ser humano. Sin embargo, cada modelo animal tiene sus propias ventajas e inconvenientes (20). Con todo esto se requiere la identificación de modelos animales con sus limitaciones y beneficios para producir evidencia científica preclínica antes de desarrollar ensayos clínicos en humanos (21).

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La administración de 10 μ l de secretoma derivado de células madre mesenquimales de tejido adiposo (Sec-CMMAd) de rata a una concentración de 1.526 μ g/ml, dentro de un conducto de colágeno (NeuraGen®), en un modelo murino donde se ha producido una brecha o *gap* de 10 mm en el nervio ciático, podría mejorar o acelerar la regeneración del nervio reduciendo de ese modo la morbilidad que sufren los pacientes con esta patología.

El objetivo principal de este estudio es evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento con Sec-CMMAd frente a la implantación del NeuraGen® vacío en un modelo animal de rata.

Dicho propósito, se divide en diferentes objetivos secundarios:

- Valorar si el abordaje y la disección del nervio afectan al normal comportamiento de la marcha de los animales.

- Estudiar la capacidad del tratamiento para favorecer la regeneración del nervio.

- Evaluar la influencia de la terapia celular sobre el remodelado del nervio en regeneración y determinar si existe mejoría de la función nerviosa.

- Estudiar la expresión génica en los nervios tras la aplicación del tratamiento.

6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

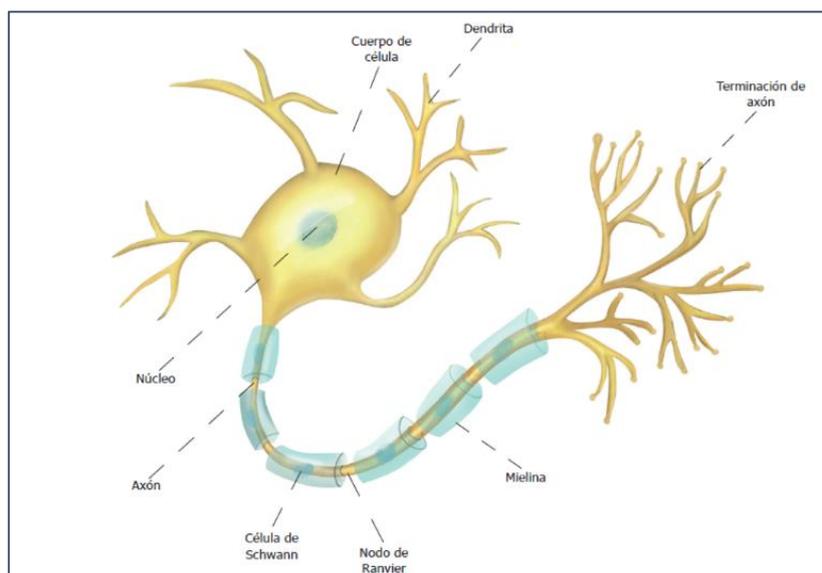
6.1. El sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) está dividido en dos partes, el sistema nervioso central (SNC) compuesto por el cerebro, cerebelo, tallo encefálico y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico (SNP) que lo componen los nervios que salen de los pares craneales y de la médula espinal. Todo este sistema conforma una red de conexiones a través de los nervios con todos los órganos del cuerpo y el SNC envía y recibe señales de estos a través del SNP (22).

6.1.1. Las neuronas

La unidad funcional del SN son las neuronas, células cuya función principal es percibir, procesar y transmitir información. Esto es posible gracias a la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática, que le permite enviar y recibir señales eléctricas y químicas. La morfología de las neuronas es: el cuerpo celular, el axón y las dendritas (Figura 1). El axón se encarga de dirigir los impulsos desde el cuerpo celular hacia otra neurona u órgano diana, mientras que, las dendritas transmiten impulsos hacia el cuerpo celular (23). Los axones pueden estar rodeados de una banda de mielina y células de Schwann, los de mayor calibre, o sólo por células de Schwann, los de un calibre pequeño (24).

FIGURA 1. MORFOLOGÍA DE UNA NEURONA

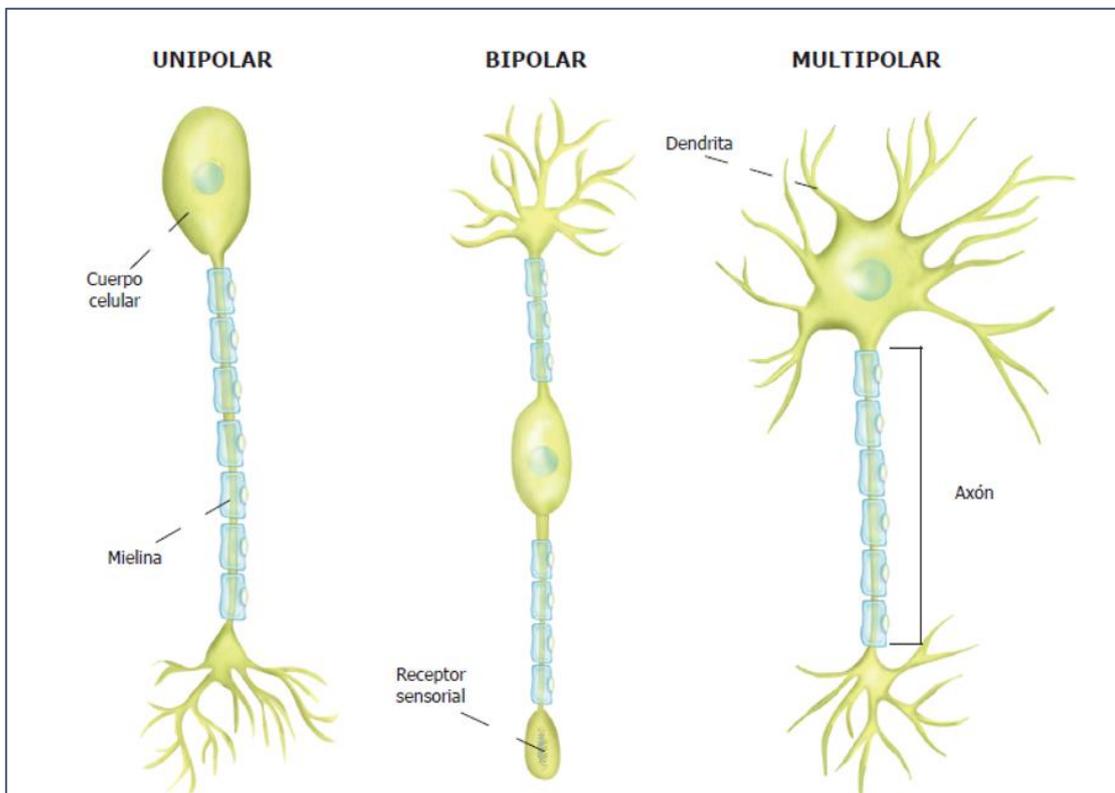


Anatomía de una neurona donde se diferencian las estructuras que la componen: Cuerpo celular, dendritas, núcleo, axón, células de Schwann, nódulos de Ranvier, mielina y las terminaciones del axón.

Las neuronas están especializadas en la recepción de estímulos y conducción del impulso nervioso (en forma de potencial de acción) entre ellas mediante conexiones llamadas sinapsis, o con otros tipos de células como, por ejemplo, la placa motora de las fibras musculares (25). La mayoría de las neuronas no se dividen una vez alcanzada su madurez, ya que se trata de un tipo celular altamente diferenciadas; no obstante, una minoría sí lo hace, las células madre neuronales (26,27).

Las neuronas se pueden clasificar en función de varios criterios como el tamaño, la forma, la polaridad, etc. (28). Una de las más utilizadas es según el número de prolongaciones que salgan del núcleo las neuronas, y se clasifican como indica la figura 2:

FIGURA 2. TIPOS DE NEURONA SEGÚN NÚMERO DE PROLONGACIONES



Neurona unipolar: Tiene una única prolongación que sale del cuerpo celular, pero se ramifica en una rama periférica y otra central. Neurona Bipolar Neurona que consta de dos prolongaciones que tienen origen en el cuerpo. Están en el oído y en la cavidad nasal. Neurona multipolar: Es el tipo de neurona más numeroso. Son neuronas que poseen diversas reorganizaciones de dendritas múltiples y un único axón.

Además, según la función que desempeñan pueden clasificarse como sensoriales o motoras. Las primeras transmiten impulsos desde un receptor, que puede ser interno (como la señal del estómago que informa que está vacío o lleno) o externo (como la amenaza que capta el ojo), hasta una localización específica del SNC (29). Por otro lado, las neuronas

motoras llevan la información desde el SNC hacia un efector como por ejemplo un músculo (29).

Existen causas que pueden alterar el correcto funcionamiento de estas conexiones provocando enfermedades y discapacidades en los pacientes. Estas causas pueden ser internas, como las provocadas por algunos tumores, neuromas, daños en el SNP, etc.; o bien, pueden ser externas, como las provocadas por explosivos, cortes, accidentes, quemaduras, etc. (6).

6.2. Perspectiva histórica

Antes del siglo XIX no existe apenas literatura de reparación de LNP, salvo algunos trabajos a finales de siglo, en los que la mayoría se basaban en teorías erróneas de regeneración del SNP, como el *nerve flap* o la conexión lateral; siendo en el siglo XX cuando se desarrollaron prácticamente la totalidad de los estudios de relevancia (30).

La primera referencia escrita que se ha encontrado de la coaptación de un nervio seccionado es en 1608 por el italiano Gabriele Ferrara, barbero de la época (actualmente se le reconocería como médico) (31). En su libro, *Nuova Selva di Cirugía, Divisa in Tre Parti*, se recoge un gran sumario de enfermedades médicas, métodos de fabricación de drogas y enfermedades quirúrgicas; bastante avanzado para la época (31).

Cabe destacar la descripción realizada de la técnica de la neurorrafia, siendo algunos conceptos que describe muy cercanos a los actuales (31). Según Ferrara era preciso identificar los muñones proximal y distal del nervio lesionado, que posteriormente, se sumergían en una solución de vino y rosas (método antiséptico de la época) y se afrontaban utilizando una aguja curva, tratando de evitar lesionar con el hilo los dos bordes del nervio. Para terminar, se rodeaba la zona de coaptación con aceite, y se procedía a inmovilizar la articulación durante varios meses (31).

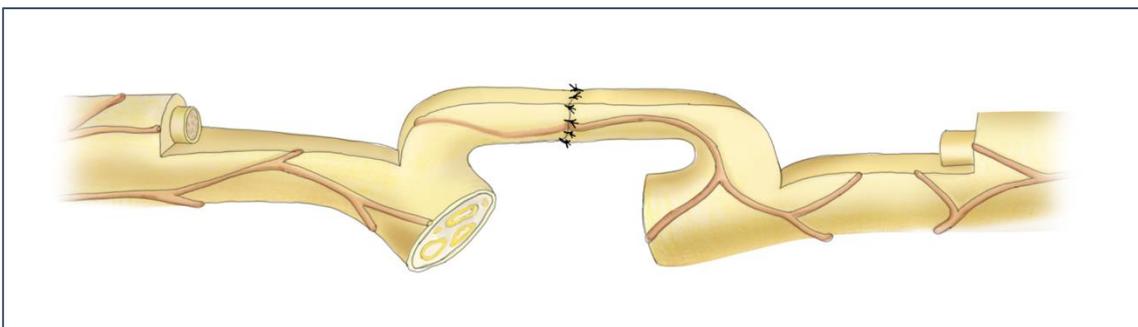
A pesar de esta descripción y de algunas otras que llegaron posteriormente, durante los siglos XVII y XVIII los médicos y cirujanos no siguieron este procedimiento con la frecuencia que cabría esperar (31). Tanto fue así, que los médicos militares ingleses que lucharon contra Napoleón en el siglo XIX recomendaban no realizar técnicas de reparación de nervios seccionados (32).

En esta época (s. XIX), cabe destacar al médico y cirujano Weir Mitchell que trabajó a cargo de los heridos que dejó la guerra civil norteamericana. Fue un investigador clave porque determinó la evolución natural de una lesión en un nervio, estableciendo el porcentaje que se esperaba de mejoría o curación de una forma muy precisa través de la

observación de las lesiones de sus pacientes. Además, logró desbancar la teoría de la regeneración espontánea de los nervios divididos, que era común en esa época (33). Bien es cierto que su trabajo no incluye el desarrollo de ninguna técnica quirúrgica reparatoria, pero sí que permitió comprender muchas de las características de las LNP y la importancia de su trabajo radica en haber creado una base para el desarrollo terapéutico posterior (34).

La mayor aportación del siglo XIX a la regeneración del SNP fue reconocer la necesidad de una conexión intacta entre el axón y el cuerpo nervioso central y que dicha regeneración requiere una cantidad de tiempo considerable (30). Este nuevo conocimiento fue principalmente el resultado del trabajo de Augustus Waller en 1852, cuya detallada descripción de los cambios histológicos que ocurren en la parte distal del nervio seccionado se conoce como degeneración walleriana (35). No obstante, su aportación no tuvo una aceptación inmediata, de hecho, se describieron gran cantidad de técnicas que evaluadas con el conocimiento actual resultan completamente inapropiadas (30). Por ejemplo, en 1873 fue descrita por Létiévant la técnica *nerve flap*, que consiste en suturar una parte longitudinal del segmento proximal del nervio afectado en dirección próximo-distal y otra sección longitudinal del segmento distal en dirección disto-proximal (36) (Figura 3). Assaky por su parte, describió en 1886 la "sutura a distancia", pero por la falta de coaptación ente ambos extremos del nervio, el valor terapéutico se consideró nulo (37). Mackenzie en 1909, concluyó que "la regeneración del nervio se produce tanto desde la parte proximal como distal del nervio dividido" (38). Esta teoría descrita 60 años después de la de Waller es completamente contradictoria (30).

FIGURA 3. *NERVE FLAP*

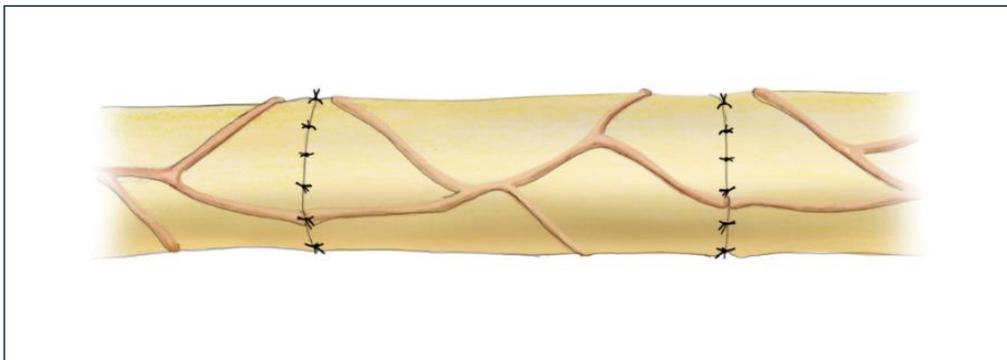


Técnica del *nerve flap* descrita por Létiévant que consistía en unir dos medias partes de un nervio para tratar de reparar una brecha nerviosa.

A principios del siglo XX la cirugía del nervio periférico se encontraba en un punto muy atrasado. Fueron los cirujanos militares durante y después de las guerras los que empezaron a reportar los resultados derivados de las lesiones de la gran cantidad de pacientes que atendieron debido a los conflictos bélicos (30). No fue hasta los años 20 y 30

cuando se publican y reportan las lecciones que ha aportado la Primera Guerra Mundial (PGM). Los esfuerzos del profesor de anatomía de la Universidad de Michigan, Gotthelf Carl Huber, coordinando durante la PGM el *US Army Medical Corps*, para dirigir las lesiones de nervio periférico en hospitales civiles y militares, fueron muy importantes para mejorar la atención de los pacientes. En estos centros se realizaron investigaciones de laboratorio y algunas de ellas aportarían resultados que fomentarían el uso de los injertos autólogos (34). El libro de texto "*A Manual of Neurosurgery*", que publicó en 1917 y revisado en 1919, recogía todo el estado del arte de esa época y sirvió para la formación de los neurocirujanos generales (30,39). Llevó a cabo un estudio y desarrolló un modelo animal fiable, utilizando injertos extraídos de diferentes fuentes: el mismo paciente (autoinjertos), cadáveres (homoinjertos), u otros animales (heteroinjertos), concluyendo que los que mejor resultado proporcionaban eran los autoinjertos (Figura 4) (34). No obstante, no se observaron resultados clínicos en cuanto a recuperación funcional, posiblemente debido a la falta de conocimiento en inmunología comparado con el que tenemos hoy en día, a lo que, si añadimos que la técnica quirúrgica de reparación no estaba bien definida y estandarizada, se pueden entender los motivos de la baja tasa de éxito (34).

FIGURA 4. AUTOINJERTO NERVIOSO



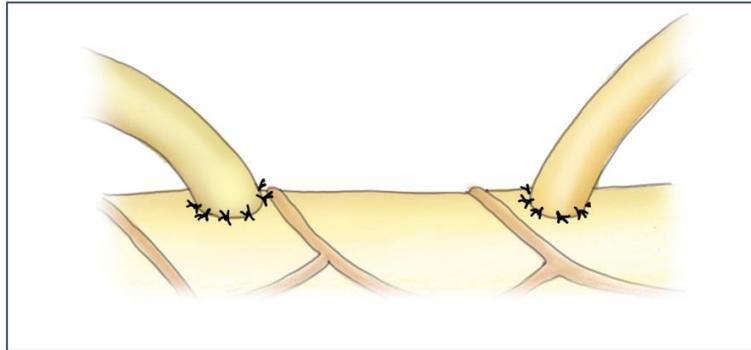
Técnica de sutura de un autoinjerto nervioso, utilizando de referencias las estructuras anatómicas como los *vasa-vasorum*.

Otro investigador que merece mención es uno de sus aprendices, Byron Stookey, que en 1919 publicó un trabajo donde se demostraba en un modelo animal que el *nerve flap* era una técnica inútil (40) y en 1922 con la experiencia adquirida por la guerra publicó el libro "*Surgical and Mechanical Treatment of Peripheral Nerves*" (41). Además de Stookey, Charles Elsberg y Karl Ney también coincidieron con la práctica quirúrgica moderna (42,43). Elsberg se dio cuenta de que la aposición ideal de los extremos del nervio es aquella en la que los axones son colocados con el que está exactamente enfrente de ellos (Figura 4) (42).

Para realizar las neurorrafias recomendó la coaptación epineural o la perineural, ya que antes de la guerra era muy común suturar el nervio atravesando todo el tejido, prestando especial atención a la hora de anudar evitando aplicar excesiva fuerza a la hora de cerrar el nudo (42). Elsberg describió que “la aproximación de los bordes debe hacerse siempre sin tensión”, una de las claves principales actuales para reparar el nervio periférico. También concretó que se podía reducir la formación de fibrosis en los neuromas de amputación seccionándolos hasta encontrar fibras sanas y realizando la neurorrafia desde la capa perineural (42). Actualmente, ambos principios son reglas básicas de las técnicas quirúrgicas sobre los nervios (6).

Desafortunadamente, las heridas causadas en la PGM provocaban brechas nerviosas que no se podían resolver simplemente liberando los bordes, pues había pérdida de tejidos blandos en algunos casos (42). Para resolver esta disyuntiva los cirujanos militares fueron creativos y diseñaron técnicas que, a pesar de no haber sido un éxito, permitieron replantear el procedimiento y dieron un impulso para solucionar definitivamente el problema, empleando injertos nerviosos. Una de las principales opciones y que a día de hoy sigue utilizándose es la transposición de otro nervio (30). Si esta medida no era suficiente para evitar la tensión, se procedía a colocar las articulaciones en posiciones ventajosas para reducir la longitud del espacio entre los bordes (44). Uno de los mecanismos que se utilizaron al principio para reducir la tensión a la hora de suturar fue realizar la neurorrafia con la articulación del miembro en flexión, para después inmovilizarlo en esa posición con una escayola por un tiempo determinado (44). Posteriormente, se realizaban extensiones graduales de la articulación con nuevos yesos, hasta conseguir la extensión total de la articulación (44). Hay trabajos que describen y cuantifican la longitud de nervio que puede ganarse con la posición apropiada de diferentes articulaciones, aunque también se realizaron osteotomías de miembros para acortarlos y reducir de ese modo la longitud del hueco (44). Además del *nerve flap*, surgieron varias alternativas, entre ellas, pasar múltiples bucles de sutura para tratar de crear un andamio o utilizar vasos sanguíneos, canales óseos, fascia o tubos de goma, para conectar los extremos del nervio. Otra técnica fue la sutura nerviosa T-L de ambos extremos a un nervio sano, utilizada frecuentemente durante la PGM, pero abandonada al poco tiempo (Figura 5) (30).

FIGURA 5. NEURORRAFIA TERMINO-LATERAL



Técnica de coaptación T-L de dos muñones a un nervio sano.

Como se ha mencionado anteriormente, hay que tener en cuenta que en esta época no se tenían los conocimientos actuales sobre la inmunología y por ese motivo y por la falta de estandarización de la técnica, muchos de los trasplantes nerviosos realizados de cadáver a paciente no tuvieron mucho éxito (45). Se realizaron estudios comparando los nervios frescos o fijados en formalina de cadáveres y también autotrasplantes frescos frente a degradados (39). No se continuaron utilizando los trasplantes de nervio, dado que el grado de regeneración y recuperación funcional no coincidía con el que se esperaba conseguir en base a los resultados de los experimentos con animales (45). Ya en 1943, Walter Dandy expuso por medio de su trabajo que “el único método para que el nervio recuperase su funcionalidad era la coaptación T-T, y de no se conseguirse se perdería para siempre” (46)

Henri Delagenerie y Jules Tinel observaron en sus estudios que la regeneración es aparentemente más rápida cuando hay separación fisiológica pero no existe separación física de ambos lados de la lesión del nervio (47). También supuso que los axones crecían a una velocidad de 1-2 milímetros al día dependiendo del tiempo de la lesión nerviosa y de la edad del paciente, advirtiendo que era necesario esperar un periodo suficiente para estar seguro de que el nervio no ha podido regenerarse de forma natural (47). Karl Ney por su parte, observó que la mayoría de las LNP se resuelven sin necesidad de intervención quirúrgica (43). Su descripción de los neuromas de amputación no fue la primera, pero refleja la sofisticación fisiológica de los cirujanos de nervio periférico de la época (43).

Resumiendo, los avances en cirugía de nervio periférico que derivaron de la PGM fueron: demostrar que la técnica del *nerve flap* era completamente ineficaz, aprender a manejar correctamente los neuromas de amputación, utilizar los autoinjertos o injertos autólogos para tratar nervios en los que la brecha era demasiado grande, la sutura epineural, demostrar la importancia de evitar la tensión a nivel de la sutura (34).

Con la experiencia obtenida en la PGM cabría esperar que se hubiesen continuado con avances en regeneración del nervio periférico. Desafortunadamente, tuvo que llegar la Segunda Guerra Mundial (SGM) para avanzar realmente en este campo y Woodhall y Bebe desarrollaron un registro del nervio periférico en 1944 (48). La creación del registro y la coordinación de los estudios de seguimiento fueron dirigidas por Barnes Woodhall que lo definió como “una herramienta para evaluar la influencia de los procedimientos técnicos recientemente desarrollados en los resultados inmediatos de la reparación y para proporcionar una lista de pacientes con lesiones graves tan definida con datos básicos de identificación que pueda utilizarse en una evaluación a largo plazo de esta fase de la neurocirugía militar” (49). Desde el inicio de la guerra, se abandonaron algunos métodos fisiológicamente inverosímiles de reconectar los *gap* nerviosos, pero sí que se mantuvieron las técnicas de sutura directa sin apenas modificaciones (30). Un estudio muy detallado, cuyo título es “*Peripheral Nerve Regeneration: A Follow-up Study of 3656 World War Injuries*”, permitió establecer un *gold standard*, ya que se convirtió en una base de datos con la que comparar todas las técnicas novedosas y los nuevos desarrollos de la especialidad (48). Hubo dos trabajos que cuestionaron la técnica de estiramiento paulatino de la articulación fijada con yeso. En el primero, Highet y Holmes encontraron en estudios de reparaciones fallidas, una fibrosis intraneural masiva en casos en los que se había utilizado la técnica de estiramiento (50). Este hallazgo supuso el desarrollo del segundo, un estudio en perros para demostrar esta teoría y abandonar este método definitivamente (50).

Para aquellos casos en los que había mucha distancia entre los bordes nerviosos, Sir Herbert Seddon, basado en la experiencia obtenida en el conflicto bélico, comenzó a utilizar la técnica descrita por Huber, pero más depurada, para extraer los injertos autólogos del donante obteniendo buenos resultados en muchos de sus intentos de reinervación (51), y dedujo que era la mejor elección para evitar la tensión del nervio siendo la única opción viable (51).

Sin embargo, la contribución más importante que hizo Seddon fue la clasificación de las lesiones nerviosas, describiendo tres niveles de afectación (52). La neurapraxia, axonotmesis y neurotmesis. La neurapraxia o axonopraxia es la pérdida de conducción nerviosa, sin que se pueda demostrar daño estructural del nervio y no conlleva a la degeneración Walleriana (52). En los nervios que sufrían este daño, únicamente podría observarse a nivel microscópico la fragmentación de la vaina de mielina en la zona traumática. La axonotmesis es la lesión del axón distal. Al no verse afectado el endoneuro, la regeneración del axón es óptima, ya que lo guía hacia sus conexiones distales (52). Por último, la neurotmesis consiste en cualquier lesión del nervio completa o parcial que

suponga la discontinuidad del axón y la vaina de mielina, lo que supone la pérdida de funcionalidad nerviosa tanto motriz como sensitiva (52).

Ya en la postguerra, Sydney Sunderland describió otra clasificación de grados de LNP (53), en la que diferenciaba en tres la neurotmesis de Seddon, sugiriendo cinco grados de lesión. Grado I y Grado II se corresponden con la neurapraxia y la axonotmesis respectivamente. La neurotmesis con los otros tres grados restantes dependiendo de las capas del nervio que se vean afectadas: Grado III, sólo se afecta el endoneuro además del axón; Grado IV, afectación del axón, endoneuro y perineuro; y el Grado V, donde existe una sección completa de todas las capas del nervio; axón, endoneuro, perineuro y epineuro.

En 1987 Göran Lundborg profundiza más en la neurapraxia y la divide en 3 niveles (54) dependiendo de la afectación o no de la vaina de mielina y en función del tipo de bloqueo que sufre el nervio, por lo que en total habría siete grados diferentes de daño del nervio periférico (Tabla1).

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES DE NERVIOS PERIFÉRICOS.

Seddon 1943	Neurapraxia (Bloqueo transitorio)		Axonotmesis (Lesión en continuidad)	Neurotmesis (división del nervio)		
Sunderland 1951	Grado I		Grado II	Grado III	Grado IV	Grado V
Lundborg 1987	Bloqueo fisiológico		Daño Mielínico	Daño axonal	Daño axonal y endo- neural	Daño axonal, endo- y perineural
	Tipo A	Tipo B				

Diferentes clasificaciones de las lesiones nerviosas según Seddon, Sunderland y Lundborg.

Continuando con la cronología después de este salto, Sunderland observó recuperación espontánea en muchos de los pacientes que inicialmente habían tenido un déficit completo (55). Además de su clasificación, Sunderland reconoció que la evidencia experimental apoyaba que la reparación temprana de los nervios seccionados tenía mejor pronóstico y por tanto había que actuar sobre ellos lo antes posible (56).

El primer gran hito tras la SGM fue la introducción del microscopio quirúrgico, para las cirugías de nervio periférico en 1964 por Smith (10). Este hecho fue seguido de los acontecimientos más importantes en las décadas posguerra como fueron la introducción de la monitorización intraoperatoria de los nervios y la validación del injerto nervioso (30). Hanno Millesi y sus colaboradores, presentaron una serie de publicaciones en los años 70

que demostraba que el grado de regeneración del nervio era mayor con injertos nerviosos que con coaptaciones directas en las que existía tensión (57,58). Su técnica de coaptación consistía en suturas perineurales bajo visión microscópica, en lugar de hacerlo como si se tratase de un cable, tal como propuso Seddon (30). La introducción del potencial de acción nervioso (PAN) por David Kline y colaboradores supuso uno de los puntos con más controversia en la reparación nerviosa (59). Desde los avances de Sunderland no se había conseguido desarrollar métodos que mejorasen el manejo de los neuromas en continuidad. La capacidad de registrar un PAN producido desde el muñón distal depende de la presencia de axones de diámetro moderado o grande y de la mielinización (60). De este modo se podía tratar un neuroma de dos maneras diferentes: si existía PAN bastaba con realizar una neurolisis del neuroma, pero si no se obtenía registro había que seccionar y suturar el nervio (60).

A finales del siglo XX se estudiaron varios campos para profundizar en el conocimiento de la reparación del SNP. La pobre capacidad de obtener imágenes en alta resolución obstaculizaba la evaluación de las lesiones nerviosas periféricas, pero con las nuevas técnicas de neurografía mediante resonancia magnética se puede cuestionar dicha deficiencia (61-63). En los trabajos de Carlstedt y colaboradores se reimplantaron exitosamente avulsiones de raíces nerviosas y se indicaron como una alternativa a las transferencias nerviosas en avulsiones del plexo braquial en un futuro (64,65). También se investiga cómo reducir la cicatriz postquirúrgica (66). Otro campo que se abre es la sustitución de autoinjertos por injertos sintéticos destacando a Dellon y Mackinnon que fueron pioneros (67). Además, la investigación científica básica está revelando de manera gradual la respuesta neuronal a las LNP, las bases fisiológicas del crecimiento y el transporte de los axones y la curación del tejido conectivo (30).

En la actualidad, son varios los tratamientos que se están probando para mejorar las condiciones de los pacientes (68). Por un lado, la utilización de fármacos y terapia celular se lleva estudiando varias décadas atrás con el fin de acelerar la capacidad regenerativa de los nervios y reducir el tiempo de recuperación (68). La bioingeniería por su parte ha avanzado mucho, tratando de desarrollar un *scaffold* fabricado con biomateriales que no provoquen reacciones de cuerpo extraño y fomenten de ese modo la regeneración del nervio haciendo de guías (69). También se encuentran avances en el desarrollo de productos que pueden sustituir a la sutura y por tanto reducir los tiempos quirúrgicos (20). Y, por otro lado, los marcadores genéticos que pueden estar implicados en el proceso de degeneración y regeneración son también los últimos avances que se están haciendo (70).

6.3. Lesiones de nervio periférico

Varios tipos y grados de lesiones del nervio periférico deben ser resueltas de manera diferente (71). Siguiendo el algoritmo de tratamiento de reparación de nervios periféricos (68) (Figura 6), el planteamiento para la reparación nerviosa se hará en función de: la distancia que hay entre los bordes del nervio afectado, si hay o no pérdida de tejido, si es una lesión limpia, etc. Es más importante trabajar en un campo limpio, con una hemostasia precisa, tratando los tejidos con delicadeza y en un ambiente húmedo que la utilización de antibióticos para evitar infecciones.

6.3.1. Lesiones que permiten neurorrafia sin tensión

El tratamiento de elección para tratar nervios seccionados es la coaptación T-T sin tensión, que puede realizarse de dos maneras: neurorrafia epineural o perineural (71). Esta segunda técnica aporta un alineamiento más preciso de los fascículos y de la regeneración de los axones, pero también conlleva un mayor coste en cuanto a la duración de la intervención, mayor disección de tejido con mayor cicatriz y trauma quirúrgico (9). La técnica epineural es más rápida y si se utilizan referencias anatómicas, como los *vasa-nervorum* para el alineamiento de los axones que van dentro de los fascículos, estos se encontrarán con más facilidad (72). Hay otras estrategias para la coaptación nerviosa directa como pueden ser los adhesivos, bien los cianoacrilatos o los pegamentos basados en fibrina (73-77). El uso de estos adhesivos es sencillo y eficiente, reduce el trauma y puede crear una barrera que invade la cicatriz y, además, la presencia de pegamento entre ambos bordes no impide el crecimiento axonal, ya que estos pueden atravesarlo para llegar al muñón distal (78). Sin embargo, la mayor desventaja que poseen los pegamentos es que no tienen mucha capacidad de contención, pudiendo separarse los muñones en algún movimiento que haga aumentar la tensión del nervio, siendo necesarios uno o dos puntos de sutura de anclaje (78).

FIGURA 6. ALGORITMO DE REPARACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO

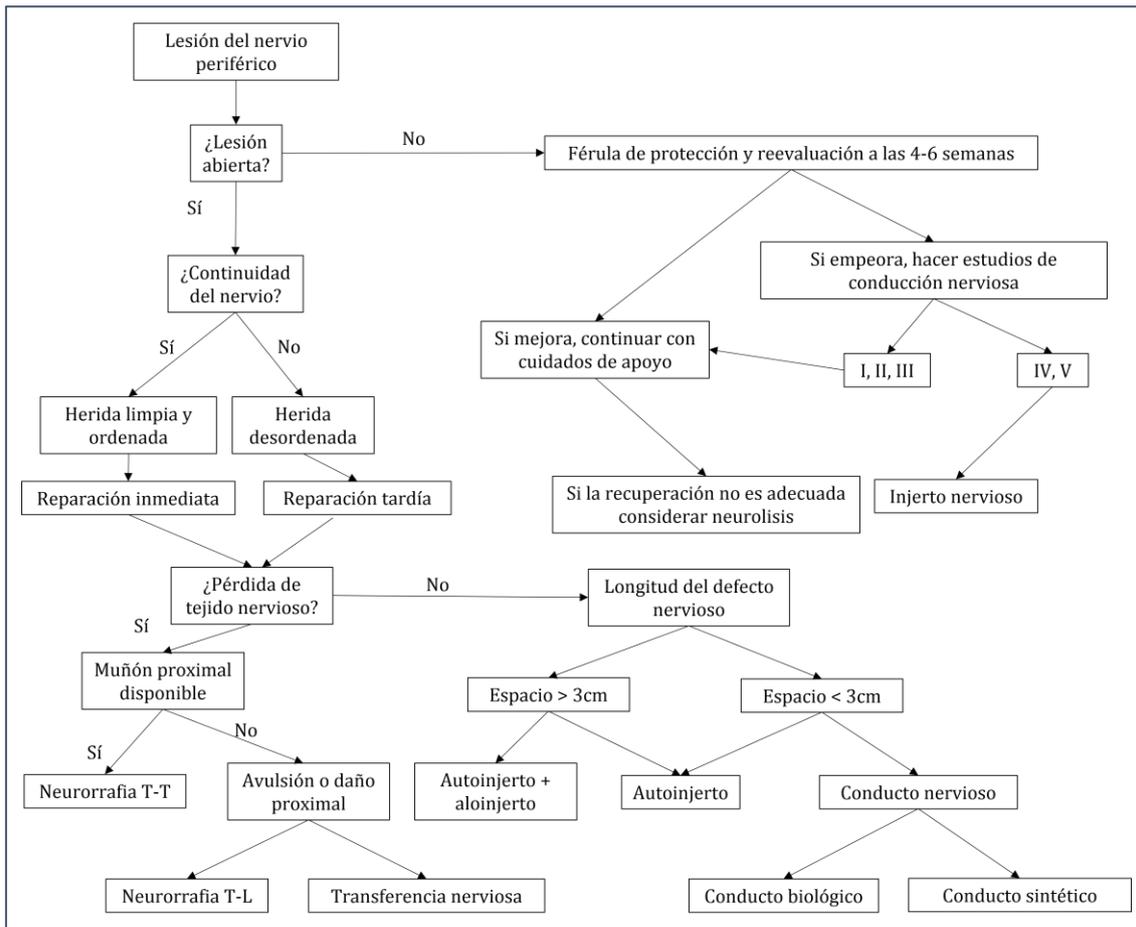


Diagrama de seguimiento y actuación frente a una LNP en función del tipo, tamaño y características. I, II, III, IV y V hacen referencia al grado de la lesión según la clasificación de Sunderland.

6.3.2. Injertos nerviosos

La situación ideal de coaptación directa sin tensión no es la que se encuentran los cirujanos en los quirófanos cada día. De hecho, es muy común encontrar lesiones en las que el *gap* nervioso es significativo, siendo la distancia que separa al borde proximal del distal mayor a 2-3 centímetros, por lo que no es posible realizar esa neurorrafia T-T sin tensión (79). Estas lesiones pueden ser provocadas por armas de fuego o accidentes que provocan neurotmesis y axonotmesis (79). La elección de tratamiento en estos casos es el injerto nervioso, que implica extraer de una zona del cuerpo una porción de nervio sano y unirlo a los bordes proximal y distal del nervio afectado, suponiendo una morbilidad en la zona sana de donde se ha cogido el injerto (80). Ambos muñones tienen que desbridarse hasta encontrar fascículos normales que permitan un realineamiento correcto, teniendo en cuenta los diferentes fascículos motores y sensitivos (80,81). En este proceso hay que manejar el nervio con mucho cuidado para evitar la protrusión de endoneuro hacia fuera

que conlleva a la retracción del epineuro (81). El hecho de que se llegue a dicho tejido tras el desbridamiento significa que estas terminaciones nerviosas concretas son adecuadas para la sutura o la interposición de injertos (81). Es importante tener en cuenta la tensión a la que va a ser sometido el injerto en caso de flexiones y extensiones de los miembros y, por tanto, hay que considerar que lo ideal es utilizar un injerto un 15% más largo que la brecha que existe entre los extremos (68). Estos injertos pueden ser aloinjertos (injerto nervioso ajeno) o autoinjertos (injerto nervioso propio), siendo estos últimos el *gold standard*, ya que aportan factores neurotróficos y células de Schwann viables, ambos esenciales para la regeneración axonal.

Hay varios factores que condicionan la elección de un injerto nervioso autólogo, como son la localización y el tamaño del *gap*, y la morbilidad asociada al lugar de extracción (80). También son varios los modelos de autoinjertos que podemos obtener: simples, tubulares, troncos interfasciculares o vascularizados (82,83). El tipo de neurorrafia es epineural o fascicular, en función de la localización, tamaño y tipo de nervio que se haya visto afectado. El debate radica en que lo ideal es colocar el menor número de puntos de sutura posibles, garantizando el correcto alineamiento de los axones (68). Una de las alternativas para reducir el número de puntos es el uso de pegamentos de fibrina, que además generan poca reacción a cuerpo extraño (82,83). Los nervios que más comúnmente se utilizan para realizar injertos nerviosos suelen ser de fascículos sensitivos, y coinciden con los de la Tabla 2.

TABLA 2. NERVIOS MÁS UTILIZADOS COMO AUTOINJERTOS

Nervio Donante	Longitud	Defecto Sensorial
Nervio sural	30-40 cm	Zona lateral del pie y región dorsal de la parte baja de la pierna.
Nervio cutáneo medial antebraquial	10-12* cm 8-10 ** cm	Antebrazo medial.
Nervio cutáneo lateral antebraquial	10-12 cm	Antebrazo lateral.
Rama sensorial superficial del nervio radial	25 cm	Zona radio-dorsal de la mano.

*Antes de la articulación del codo. **Después de la articulación del codo.

No obstante, antes de dejar insensibilizada una parte del cuerpo de un paciente, sería preferible utilizar un aloinjerto, pero esto podría suponer someter a los pacientes a una terapia de inmunosupresión (84). Para reducir la antigenicidad de los aloinjertos estos se han sometido a diversos tratamientos como la congelación, liofilización e incluso

radiación (84). A pesar de estos esfuerzos los aloinjertos no han conseguido reducir ese poder antigénico y por ello se han investigado otros campos como son, la descelularización de los aloinjertos con digestiones enzimáticas, irradiación, y uso de detergentes químicos, que permiten mantener la estructura tridimensional del nervio, pero sin la presencia de células que conlleven a la reacción antigénica que venían presentando (68). El resultado final es un *scaffold* que permite al muñón proximal crecer por el interior de las estructuras vacías favoreciendo la regeneración axonal (85). Actualmente, se encuentra disponible en el mercado únicamente un injerto descelularizado (*Avance® Nerve Graft*), pero sólo se recomienda su uso en brechas de no más de 30 mm de longitud y 1-2 mm de diámetro (86).

6.3.3. Transferencias nerviosas

El concepto de transferencia nerviosa no es nuevo (87,88), pero sí que se ha retomado recientemente y está cogiendo fuerza (68). La transferencia nerviosa consiste en una neurorrafia de un nervio sano a uno lesionado (89). Una transferencia nerviosa convierte un problema neuronal proximal en uno distal, realizando el traspaso de un nervio con función redundante cercano a la zona afectada (80). Son varias las indicaciones para practicar una transferencia nerviosa: zonas de lesión amplia con una gran cantidad de tejido cicatricial, lesiones del plexo braquial, en especial avulsiones o pérdida segmentaria de la función del nervio (90).

Las coaptaciones mediante transferencia nerviosa más comunes son la flexión y la extensión del codo, abducción del hombro, estabilización escapular y transferencias motoras distales (89). Estas transferencias presentan una serie de beneficios que están bien definidos, ya que: se evitan los autoinjertos y, por tanto, la morbilidad asociada del nervio donante; al encontrarse los nervios donantes próximos a las placas terminales motoras diana, la reinervación es más temprana; en la mayoría de los casos, sólo existe una neurorrafia en lugar de las dos que se producen en los injertos; tanto la neurorrafia como la disección tienen lugar en lechos de tejido sano y sin cicatrices; no hay alteración de la biomecánica muscular original; y además, una recuperación nerviosa es muy probable, así como una reeducación motora más rápida (80,90,91). Sin embargo, las principales desventajas incluyen la posible pérdida de función en la zona del nervio donante, y que el músculo donante ya no puede ser un donante aceptable para la transferencia muscular (80,90,91).

Otro concepto parecido a la transferencia es la coaptación T-L (80,92). Se describió en 1873, fue abandonada y resurgió a manos de Viterbo y colaboradores a principios de los 90 (93). La neurorrafia T-L está indicada cuando el extremo proximal del nervio lesionado no es viable o su acceso es imposible, el extremo distal se sutura al lateral de un nervio donante sano (94). Actualmente no hay mucha literatura de ensayos clínicos, pero si algunos informes de casos de diferentes aplicaciones: plexo braquial, neuromas dolorosos, lesiones de nervio sensitivos o lesiones del nervio facial (95). Los resultados son debatibles en cuanto a la reinervación, ya que hay evidencia de que existe crecimiento axonal colateral en fibras sensitivas habiendo realizado ventana perineural o sin ella (96). Sin embargo, en los nervios motores se requiere hacer esta ventana para obtener un resultado aceptable (97). Es importante tener en cuenta que esta práctica debe reservarse para casos en los que el resto de las opciones no son posibles o han fracasado (80,92). También se ha descrito la neurorrafia T-L “supercargada” en la que se lleva un nervio sano hacia uno lesionado, siendo su primera denominación “técnica *babysitter*” (98,99).

6.3.4. Conductos nerviosos

En las últimas décadas ha crecido el número de estudios que tratan de buscar alternativas viables al autoinjerto debido a: la cicatriz que provoca, la morbilidad de la zona donante y la posibilidad de que se forme un neuroma en ella (100). Para ello, se han estudiado canales sintéticos y biológicos que guían al nervio, que se conocen como conductos nerviosos (CN) (68). Estos conductos son unas estructuras cilíndricas huecas que permiten a los axones del nervio crecer por su interior y alcanzar el extremo distal, en nervios en los que la lesión no permite realizar una coaptación directa que, además, lo independiza y protege de tejido circundante y la formación de cicatrices (100). Actualmente, existen varios CNs disponibles aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento, con diferentes longitudes y diámetros comprendidos entre los 1,5 mm y los 10 mm. Su uso clínico se ha limitado a defectos con longitudes inferiores a 3 cm, en nervios digitales de pequeño calibre y como material nervioso de envoltura (101). La clave que esconde el uso de conductos es que la capacidad de guiar a los axones no reside únicamente en un efecto mecánico, ya que es hueco y además evita que otras estructuras interfieran en la trayectoria, sino también químico, pues se acumulan factores neurotróficos en su interior que favorecen la regeneración (100). Este proceso permite la formación de una nueva matriz extracelular donde pueden migrar células de Schwann, fibroblastos y vasos sanguíneos que conducen a una regeneración nerviosa exitosa (100).

Para comenzar, habría que discutir los diferentes tipos de CNs que existen en el mercado, la naturaleza de estos y el método de fabricación. En los últimos 60 años se han estudiado una gran cantidad de materiales con los que elaborar conductos que sirvieran al nervio de guía para poder alcanzar al muñón distal (18). Estos tubos pueden ser de dos tipos: biológicos (autólogos y externos) y artificiales (naturales y sintético) (18). Los biológicos autólogos se componen de estructuras anatómicas como arterias, venas o tendones entre otros, y los externos pueden ser nervios descelularizados o fabricados con tela de araña, mientras que los creados con polímeros artificiales naturales están basados en polisacáridos, como la quitina, la celulosa y el quitosano, o en proteínas, como el colágeno, la gelatina, la trombina y el fibrinógeno (18). Estos componentes proporcionan un entorno favorable a las células, pero sus propiedades mecánicas son bajas (18). Por su parte, los polímeros sintéticos son fabricados por el ser humano, como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), la policaprolactona (PCL), y el copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico (PLGA) (18). Estos presentan buenas propiedades mecánicas, pero no son muy compatibles con las células ya que poseen mayor reactividad inmunológica en el cuerpo del paciente (18). Varios autores, utilizan una mezcla de polímeros naturales y sintéticos, buscando las ventajas de ambos: una menor reacción y buen entorno para las células por mediación y un soporte estructural y mecánico adecuado (18). Los diseños de estos conductos han sido muy diversos dividiéndose en 5 grupos: hueco y no poroso, poroso, acanalado, multicanal y rellenos (69).

Los materiales utilizados para elaborar los CNs varían considerablemente, sin embargo, la técnica de preparación y colocación es prácticamente similar (68). El conducto seleccionado ha de ser ligeramente más grande que el *gap* del nervio a reparar y se debe empapar en solución salina normal o heparinizada antes utilizarse (100). Seguidamente, se pueden estabilizar los tejidos blandos circundantes mediante puntos de anclaje, con sutura discontinua, para facilitar la inserción del muñón nervioso y a continuación, para obtener un tamaño del lumen apropiado, el implante se enrolla en forma de U sobre sí mismo (sólo en los conductos de envoltura o *wraps*) (100). Por último, los dos extremos nerviosos se introducen 2 mm en el tubo y se fijan mediante 2 ó 3 puntos epineurales para finalmente, inyectar solución salina en el interior para evitar la formación de coágulos y la obstrucción de la luz (100).

Los CNs pueden ser de varios tipos en función del material del que se compongan, encontrando conductos biológicos y conductos sintéticos (absorbibles, no absorbibles y procesados de materiales biológicos) (100). Los biológicos incluyen vasos sanguíneos, músculos, tendones, y vainas epineurales (68). A pesar de que se han obtenido resultados

prometedores en su uso experimental y en pequeños estudios, actualmente no se recomienda su uso en la práctica clínica (100,102,103). Por otro lado, están los conductos nerviosos sintéticos a base de materiales biológicos que incluyen principalmente el colágeno de tipo I, como NeuraGen® (Integra LifeSciences Co, Plainsboro, New Jersey) o NeuroFlex™ (Collagen Matrix Inc, Oakland, New Jersey); la fibroína de seda; la gelatina (que es una proteína derivada del colágeno); los polisacáridos como el alginato; el quitosano, que cada vez gana más fuerza; y los conductos basados en hidrogeles de agarosa (104–106).

Las ventajas que posee el colágeno son: gran abundancia en el cuerpo, fácil de aislar y purificar, tiene un carácter adhesivo para algunos tipos de células, y su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* ha sido demostrada a lo largo de los años (107). Sin embargo, la principal desventaja es el tiempo de degradación tan variable que tiene, pues oscila entre 8 meses (NeuroFlex™) a 48 meses (NeuraGen®), y esto puede conllevar a la compresión del nervio (107).

Los materiales de los CNs sintéticos absorbibles van desde poliésteres alifáticos a copoliésteres como el PLA, PGA, PCL, copolímero de policaprolactona y ácido poliláctico (PCLL) y alcohol polivinílico (PVA) (6,108). Los sintéticos no absorbibles incluyen la silicona y el politetrafluoroetileno expandido (Gore-Tex; W. L. Gore & Associates, Inc, Newark, Delaware) (109,110).

Se han realizado estudios donde se añadían aditivos en el interior de la luz de los conductos con la intención de mejorar su eficacia y probar su eficacia en brechas nerviosas con mayor longitud, aumentando la distancia entre los muñones en la regeneración nerviosa (111). Actualmente, los CNs son una alternativa viable a los injertos nerviosos autólogos únicamente en ciertas situaciones clínicas (68). Se espera que en un futuro cercano se hayan desarrollado nuevos implantes mediante ingeniería tisular que además se acompañen de componentes que favorezcan la regeneración nerviosa. Sin duda el mayor reto que se presenta es el desarrollo de conductos que permitan reparar brechas nerviosas de mayor longitud y desplazar al autoinjerto (68).

6.3.5. Terapias coadyuvantes

Existen varias terapias que permiten obtener mejores resultados en las neurorrafias si acompañan a la coaptación (68). Estas terapias coadyuvantes son las siguientes.

➤ **Fármacos**

Actualmente, no hay ninguna terapia farmacológica que mejore la capacidad de regeneración de los axones (68). No obstante, se han estudiado varias moléculas pequeñas, hormonas, péptidos, neurotoxinas y factores de crecimiento (112). Con los resultados obtenidos se han propuesto posibles opciones para acelerar la regeneración y mejorar la reparación nerviosa, favoreciendo el crecimiento axonal y reduciendo la muerte neuronal (112). Los avances en biología molecular sugieren focalizar pasos específicos en las vías moleculares, pues podría permitir una intervención farmacológica objetiva, lo que podría conducir a una mejor recuperación funcional tras una lesión nerviosa (112).

Los estudios preclínicos han evidenciado que hay varias vías moleculares implicadas en la supervivencia y el crecimiento de las neuronas y las principales son: la cascada de señalización PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa) /PKB (proteína quinasa B), la señalización Rho-ROK, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinasa A (PKA), y la vía Ras-ERK (sarcoma de rata-señal extracelular-quinasa regulada) (112). Empezando por la cascada de señalización PI3K/PKB se ha demostrado que proporciona a las neuronas apoyo trófico, media el crecimiento, la diferenciación y la señalización direccional de los axones, y bloquea la apoptosis (113). Por otro lado, las Rho GTPasas, en la vía de señalización Rho-ROK, sirven para unir los conos de crecimiento al citoesqueleto de actina y median su respuesta a los ligandos extracelulares, modulando de manera positiva o negativa el de los axones (114). El ibuprofeno, el fasudil y la enzima de digestión de proteoglicanos condroitinasa ABC son algunos de los agentes que actúan sobre esta de señalización (112). La vía AMPc/PKA está implicada tanto en la supervivencia como en el crecimiento, en la diferenciación y en la orientación de las neuronas, en estudios *in vitro* e *in vivo* (115). La testosterona y el rolipram son los agentes que actúan sobre esta vía, siendo utilizados en investigación para la regeneración nerviosa (112). Por otro lado, la vía Ras-ERK se ha descubierto que mejora la supervivencia de los axones y es un promotor clave de su crecimiento (113).

También se han estudiado otras moléculas que se utilizan con frecuencia en un entorno clínico totalmente diferente, por su posible influencia en el proceso de regeneración nerviosa. Entre ellas se encuentran la eritropoyetina (EPO) (116), ibuprofeno (117), N-acetilcisteína (NAC) (118), acetyl-L-carnitina (ALCAR) (119), tacrólimus (120), melatonina (121), y transtiretina (122) (Tabla 3) (123-127).

TABLA 3. MOLÉCULAS UTILIZADAS EN REGENERACIÓN NERVIOSA

Molécula	Uso clínico / propiedades	Efectos observados
EPO	Anemia en fallo renal crónico.	Aumento de la densidad y calibre de axones sensoriales, mejora crecimiento de axones motores.
Tacrólimus	Agente inmunosupresor.	Aumento de axones mielinizados, grosor de la mielina, y tasa de regeneración; neuro-protección.
Geldanamicina	Agente quimioterapéutico.	Aumento tasa de regeneración de axones y recuperación funcional.
ALCAR	Antioxidante natural.	Aumento del número y diámetro de los axones, grosor de la mielina y mayor supervivencia.
NAC	Mucolítico.	Disminución de la muerte neuronal y fomento de la regeneración de neuronas sensoriales.
Rolipram	No aplica.	Evita disminución del potencial compuesto de acción motora (PCAM) y aumenta mielinización y número de neuronas.
Testosterona	Hormona.	Aumento del ratio de regeneración axonal.
Fasudil	Tratamiento de la hemorragia subaracnoidea en Japón.	Aumento del número, densidad y grosor de los axones; número de axones gruesos mielinizados; y crecimiento neuronas sensoriales.
Condroitinasa ABC	Enzima que degrada proteoglicanos.	Aumento regeneración neuronas motoras y sensoriales.
Ibuprofeno	Antiinflamatorio no esteroideo.	Aumento del área y grosor de los axones mielinizados.
Melatonina	Hormona, regula el ciclo circadiano.	Producción de colágeno y formación de neuromas, y disminución de propiedades antioxidantes.
Transtiretina	Portador sérico de tiroxina y retinol.	Aumento de la longitud y número de neuronas.

Diferentes fármacos y moléculas utilizadas en lesiones de nervio periférico y los efectos observados a nivel de regeneración.

El tacrólimus es un claro ejemplo de lo anteriormente comentado (68). Se trata de una lactona macrocíclica que la produce el microorganismo *Streptomyces tsukubaensis*, aislada en la ciudad japonesa de Tsukuba en 1984 (128). En la actualidad se utiliza como agente inmunosupresor para la prevención de rechazo de aloinjertos tras un trasplante de varios órganos sólidos como los riñones y el hígado. Está aprobado por la FDA y se ha demostrado que su efecto es de 10 a 100 veces mayor que la ciclosporina-A y con menos efectos secundarios (129). Por tanto, es interesante descubrir que el tacrólimus también

permite mejorar la regeneración de los nervios, induciendo la proliferación de células de Schwann y aumentando el crecimiento axonal (130). No está muy claro aún el mecanismo de su efecto en la regeneración nerviosa; varios autores sugieren que algunos de los posibles mecanismos serían: el aumento de la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 y de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43), además de la inhibición de la calcineurina (131). Se han realizado otros ensayos para determinar la dosis, vía de administración y momento ideal para utilizar el tacrólimus (131). De este modo se podría diseñar un protocolo para que el fármaco se libere de forma local y reducir al máximo los efectos secundarios que se pueden derivar de su aplicación sistémica al tratarse de un inmunosupresor (132).

La mayor parte de los fármacos que se han comentado se han utilizado únicamente en ensayos *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (estudios preclínicos de modelos animales) (68). Por eso este campo aún está por profundizar y según vayan avanzando las investigaciones y se descubran nuevas rutas moleculares, es posible que surjan nuevas dianas como opciones terapéuticas (68).

➤ Factores de crecimiento

Son varios los componentes neurotróficos que se han utilizado en investigación para estudiar su efecto en la mejora de la regeneración nerviosa (68). Estos factores han sido: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento glial (GGF), factor neurotrófico ciliar (CNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) (68). Todos ellos han resultado ser prometedores ya que favorecen la regeneración axonal, aunque unos con mejores resultados que otros (133).

➤ Terapia celular

Se han realizado investigaciones a fondo con ensayos *in vitro* obteniendo resultados bastantes aceptables introduciendo diferentes componentes celulares (134). Entre ellos destacan: las células de Schwann, células del estroma óseo y fibroblastos; componentes estructurales: fibrina, laminina y colágeno (134).

Las (CMM) han demostrado tener la capacidad de ayudar a la regeneración de neuronas perdidas, aumentar las células de apoyo gliales y crear un microambiente favorable en la zona de la lesión nerviosa (135,136). Algunos autores en sus trabajos remarcaban la creciente tendencia que había a utilizar CMM en estudios de regeneración nerviosa, comenzando a introducirlas en conductos en 1992 (137,138). Cultivar células de

Schwann autólogas es bastante tedioso, sin embargo, las CMM que se han diferenciado a un fenotipo parecido al de las células de Schwann pueden ayudar a la remielinización y la guía axonal, así como a aumentar la producción de factor de crecimiento y de matriz extracelular (136). En el campo de la medicina regenerativa se ha debatido durante muchos años la selección de las CMM ideales (139). Deben ser fácilmente accesibles y expandirse rápidamente en cultivo, ser susceptibles de transfección y expresión de genes exógenos, y ser capaces de sobrevivir *in vitro* e integrarse en el tejido del huésped (139).

Es posible trasplantar las CMM a la región de la lesión tal y como están en su estado indiferenciado, o se pueden someter a una diferenciación *in vitro* en células similares a las de Schwann durante un corto periodo de tiempo (140). Para lograrlo es necesario exponer a las CMM al β -mercaptoetanol, al suero bovino fetal, al ácido *all-trans* retinoico, a la forskolina, al factor de crecimiento básico de fibroblastos humano recombinante, al factor de crecimiento humano derivado de las plaquetas-A recombinante y a la heregulina β -1 (140). No obstante, hoy en día la necesidad de la diferenciación de las CMM se sigue debatiendo. Algunos autores sostienen que se trata de un retraso innecesario, ya que estas revierten parcialmente *in vivo* al fenotipo original (141). Además, las CMM indiferenciadas proporcionan resultados similares y también pueden sufrir una diferenciación *in vivo* en respuesta a estímulos locales (142).

Otro gran debate viene por el tejido preferido para recolectar las CMM (68). Desde que se descubrieron, las CMM se han extraído de varios tejidos: embrionario, fetal, neural, médula ósea, tejido adiposo, piel, folículos pilosos y pulpa dental (68). También se ha descrito la reprogramación de células somáticas a CMM pluripotentes inducidas tras la coexpresión ectópica de factores de transcripción (143). En 1998 fueron aisladas por primera vez de blastocitos humanos las CMM embrionarias (144). Pueden formar derivados de las 3 capas germinales embrionarias y poseen una gran capacidad de proliferación a largo plazo y potencial de diferenciación (136). No obstante, sigue siendo un reto su diferenciación neural. Existe la controversia ética por la posible inmunogenicidad y tumorigenicidad que pueden ocasionar en el paciente, que son las principales desventajas que dificultan sus aplicaciones en la práctica clínica (136).

Las CMM fetales pueden obtenerse de la membrana y el líquido amniótico, de las células y la sangre del cordón umbilical y de la gelatina de Wharton. Dado que después de un nacimiento se suelen desechar estos tejidos, la fuente para obtenerlos es abundante (136). No es muy práctico utilizar células autólogas tras una lesión, pero las células

alogénicas han demostrado una inmunorreactividad clínica relevante, por ese motivo, almacenar productos fetales de manera generalizada puede obviar este obstáculo (136).

Existe también una falta de suministro autógeno en el caso de las CMM derivadas de folículos pilosos y pulpa dental, lo que sigue limitando su uso en experimentación (136). Por otro lado, los precursores derivados de la piel residen en la dermis, son fácilmente accesibles y expandibles en cultivo, y demuestran un comportamiento similar al de las células pluripotentes de la cresta neural y han demostrado tener efectos positivos en la regeneración de los nervios (145).

Fue a principios de los años 90 cuando las CMM nerviosas se aislaron por primera vez del cerebro murino adulto (12). Se diferencian de forma natural en células gliales y neuronas, pero esto ocurre casi exclusivamente durante la embriogénesis o en localizaciones limitadas del sistema nervioso central tras una lesión (146). A pesar de lo prometedoras que eran al principio, su uso se ha visto limitado por la gran cantidad de tumorigénesis de neuroblastomas y por la dificultad de recolección (136).

Las CMM derivadas de la médula ósea son fáciles de obtener, no presentan problemas éticos potenciales y son más aplicables clínicamente que las embrionarias y las neurales (136). Sin embargo, su recolección es invasiva y dolorosa, y su capacidad de proliferación y potencial de diferenciación es más lenta (136).

Son las CMM de tejido adiposo (CMMAd) son a las que se le ha prestado especial atención (136). Si se digiere el tejido adiposo con colagenasa y se centrifuga es posible aislar una población estromal conocida como fracción vascular estromal (147), la cual se ha demostrado que puede dar lugar a células precursoras multipotentes (148). Su recolección es muy fácil y la edad del donante y zona de extracción parece no afectar a su efecto terapéutico (149). Con todas las ventajas que tiene frente a las CMM de médula ósea se consideran la opción preferida para los estudios preclínicos (136). Estas ventajas son: potencial de diferenciación y su capacidad de proliferación, facilidad de obtención, y su fracción de células madre superior (136).

La vía de administración de las CMM es otro asunto que considerar en investigación (136). Se pueden inyectar directamente alrededor de muñones nerviosos, dentro del lumen de CNs, en un injerto nervioso, pueden suspenderse en un scaffold, administradas en una unión neuromuscular o sistémicamente (136). Las investigaciones futuras probablemente se centren en la administración sistémicamente de las CMM con la capacidad de dirigirse específicamente al sitio de la lesión y servir de apoyo allí (136).

En las últimas décadas se ha estado probando el uso de secretoma derivado de CMM, que está constituido por vesículas extracelulares que contienen factores inmunomoduladores y antiinflamatorios, también contienen proteínas hidrosolubles, liposolubles y fragmentos de micro-ARN (16). Este secretoma ha demostrado poseer el mismo poder inmunomodulador y capacidad de crear el microambiente adecuado para favorecer la regeneración que las CMM, sin el inconveniente ético de su administración al no crear reacción inmunológica en el paciente (150).

➤ **Terapia génica**

La definición de terapia génica podría ser la introducción de un gen terapéutico ajeno en células vivas para el tratamiento de una enfermedad (70). El nombre que recibe este gen es transgén, y su expresión está dirigida por un llamado promotor (70). Para introducir un transgén de la forma más eficaz en una célula es utilizando un vector viral (70). Consiste en un virus modificado de tal manera que haya perdido su capacidad replicadora, pero que sea capaz de adherirse a las células y entrar en ellas, introduciendo un transgén en el núcleo celular (70).

Son varios los potenciales vectores que se han utilizado y estudiado como: el adenovirus, el herpes simple, el lentivirus y los vectores virales adenoasociados (151). De entre ellos han sido los vectores virales adenoasociados los que han demostrado ser la plataforma de administración de genes más fiables, debido a su baja mutagenicidad e inmunogenicidad (152,153). Las dianas principales de la terapia génica en las LNP son las células de Schwann, el músculo denervado y los fibroblastos (68).

La terapia génica tiene por objetivo obtener una clase de reprogramación transcripcional para favorecer la producción de más factores neurotróficos, factores de transcripción, y moléculas de adhesión celular o de matriz extracelular (68). El vector de terapia génica regulable es esencial para prevenir la producción excesiva de factores neurotróficos, para evitar el atrapamiento local de los axones en regeneración y también para prevenir efectos secundarios como la hipersensibilidad a los factores de crecimiento (68). La terapia génica regulable tiene un mecanismo de "encendido y apagado" para la producción local de GDNF utilizando agentes extrínsecos como la doxiciclina (133,154).

Según vaya avanzado la tecnología para introducir genes hacia una aplicación clínica, está más próximo el momento en que la terapia génica se convertirá en parte integrante del arsenal de los neurocirujanos para resolver esta patología (68).

➤ Otras áreas

Hay estudios que demuestran que la regeneración nerviosa se puede mejorar con la estimulación eléctrica de baja intensidad. Esto puede deberse probablemente a que existe un aumento de la producción del NGF y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que posteriormente conduce a una mejora de la producción de mielina (155). También se han realizado muchos estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando la fototerapia con láser de baja potencia (156). Por último, se espera un futuro prometedor de la regeneración nerviosa periférica con el uso de las células envoltoras olfativas como terapia adyuvante (68). Éstas son células gliales especializadas que dan soporte a los axones que salen del epitelio olfativo y se dirigen hacia el bulbo olfativo del SNC a través del nervio olfativo (68). Son pluripotenciales y tienen propiedades similares a los astrocitos y a las células de Schwann (68). Pueden crear canales para guiar la regeneración de nuevos axones, fagocitar los axones degenerados, y producir una variedad de factores neurotróficos, como el NGF, el BDNF, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el neuropéptido Y, por tanto, mejora la supervivencia de los axones afectados en la lesión (157).

6.4. Modelos animales experimentales

Desde que se conoce que la anatomía y fisiología de regeneración de los nervios periféricos son similares entre humanos y animales, los modelos animales han sido necesarios para estudiar la cirugía nerviosa y por eso, los experimentos en modelos animales de nervio son fácilmente replicables (19). Normalmente se prefieren pequeños animales debido a que su regeneración y la reinervación de órganos depende de la longitud, y es más rápida en ellos que en los humanos (158,159). Para poder utilizar las nuevas técnicas, tratamientos y avances en el campo de la regeneración del nervio periférico en seres humanos, es necesario garantizar la seguridad y eficacia en ensayos preclínicos (19). Sin embargo, existen limitaciones y advertencias en la traslación de los resultados obtenidos en los estudios experimentales (19). Por otro lado, sí que es muy interesante y útil el uso de modelos animales para la adquisición y prácticas de habilidades de sutura microquirúrgica (19).

6.4.1. Modelos animales de lesión de nervio periférico

La rata se ha convertido en el modelo más utilizado en experimentación del sistema nervioso periférico debido a la relativa resistencia a las infecciones postquirúrgicas, el bajo coste de mantenimiento, la facilidad de disponibilidad y manejo, el menor grado de cuidado, la tolerancia al cautiverio y la aceptación social (18,20,160,161). Las especies más utilizadas

son la Sprague-Dawley, Lewis y Wistar (19). Los animales grandes son más caros de mantener y transportar, además de que son difíciles de obtener, por ello su uso es mucho menos frecuente, siendo más limitado (19).

El nervio más empleado para realizar experimentos nerviosos en animales es el ciático (18,20,95,162), por ser el nervio más grande, que facilita su manipulación y reparación (163). De todos modos, no es el único, siendo otros nervios también muy utilizados en la rata: del miembro pelviano el peroneo y el tibial; y del miembro torácico el radial, el mediano y el cubital (19). Los nervios del miembro torácico no se utilizan con frecuencia, porque son más pequeños y se requiere una habilidad microquirúrgica avanzada (95). En función de los objetivos del estudio en cuestión, se hará la selección de la "lesión" correcta (19). Generalmente, se escoge el "modelo de axonotmesis" cuando se pretende estudiar la biología de la regeneración nerviosa, para probar nuevos agentes farmacológicos y terapéuticos, especialmente en el dolor neuropático (95). Por su parte, el "modelo de neurotmesis" se usa en estudios preclínicos de intervenciones terapéuticas, debido a que las diferencias en varios de los parámetros de evaluación de resultados ayudarán a demostrar la eficacia de la intervención (95). No se ha establecido la superioridad entre los nervios del miembro pelviano y torácico (95). Normalmente se escogen nervios mixtos, sin embargo, también se puede seleccionar un nervio motor o sensorial puro, o uno autónomo, siendo utilizados estos últimos básicamente en estudios urológicos (95). Un dato para tener en cuenta es que el nervio sensorial tiene una regeneración nerviosa menos eficaz que un nervio motor (164).

6.5. Investigación preclínica en nervio periférico

6.5.1. Fomento de la regeneración nerviosa

Los mejores resultados que se han obtenido tras la reparación quirúrgica del nervio, a pesar de la mejora de las técnicas quirúrgicas, han alcanzado una meseta (19). Por tanto, la mayoría de los estudios preclínicos sobre nervio periférico tienen como objetivo mejorar la regeneración nerviosa tras la reparación de una lesión (19). Estudiar la regeneración nerviosa en seres humanos o en animales de mayor tamaño no es muy común, ya que dada la lentitud del crecimiento del nervio regenerándose, el coste y las consideraciones éticas no lo favorecen y por este motivo, se prefieren los modelos de roedores (19). El modelo más común es la transección del nervio ciático en la rata, seguida de una reparación mediante un injerto o un CN (153).

Para conseguir mejorar la regeneración nerviosa se puede emplear uno de los siguientes pasos o una combinación de ellos (85):

Promoción del crecimiento axonal

El uso de factores de crecimiento a nivel local como: el NGF, GGF, FGF, GDNF, NT-3, CNGF, BDNF y la leupeptina (89,100,133,165) han sido descritos para promover el crecimiento de los axones tras una lesión del nervio.

Una estimulación eléctrica breve del muñón proximal aumenta la expresión de factores neurotróficos como el BDNF y el NGF en las células de Schwann y, además, regula al alza los genes asociados a la regeneración neuronal como el BDNF y el receptor de tirosina quinasa B (166,167).

La terapia génica para mejorar la regeneración nerviosa es un área muy extensa para investigar. Se ha descrito una mejora en la recuperación sensorial, electrofisiológica y de la marcha tras la terapia génica regulable en modelos de nervio ciático de rata (133,154).

La terapia celular también se ha estudiado mucho, siendo las células de Schwann las más importantes para la promoción y el mantenimiento de los axones en regeneración, no obstante, ya conocemos sus limitaciones y por tanto es preferible el uso de células madre que se diferencien en células de Schwann (134). El trasplante de células madre se realiza mediante microinyección en el lugar de la regeneración o en el lumen del conducto o scaffold (134).

Medio local que favorece la regeneración de los axones

Dadas las limitaciones del autoinjerto, el uso de CNs se ha estudiado ampliamente en ensayos preclínicos y su seguridad y eficacia han quedado bien establecidas, lo que ha llevado a utilizarlos en humanos (168).

Además de los CNs, se han utilizado otros materiales como la membrana amniótica, el pegamento de fibrina y el láser para sellar el lugar de coaptación (19). Se ha demostrado que estas medidas además aíslan a los axones que se están regenerando del tejido circundante, provocando un aumento de los factores neurotróficos en la zona. Al aislar la zona se impide la entrada de células inflamatorias y fibroblastos, evitando la fibrosis y la cicatrización perineural lo que conduce a una mejor regeneración nerviosa (19). Un estudio biomecánico en conejos había demostrado que usando únicamente pegamento de fibrina para la neurorrafia del nervio ciático tenía una menor resistencia a la tracción comparado con el uso de suturas (169). Sin embargo, una revisión sistemática posterior reveló que el pegamento de fibrina tiene la misma eficacia o superior (170).

Retrasar o prevenir la aparición de la degeneración walleriana

El hecho de retrasar o evitar que se produzca la degeneración walleriana significaría que la distancia que habría entre los axones del muñón proximal al distal sería menor, mejorando así los resultados (171). Existen invertebrados como el cangrejo de río o la lombriz de tierra que poseen esta capacidad, cosa que en los mamíferos no ocurre (171). Gracias a los avances que han ido sucediendo en diferentes campos de investigación como la biología celular, ingeniería molecular y bioquímica e incluso en la microcirugía, han hecho posible la fusión de los extremos proximal y distal de la membrana axonal utilizando polietilenglicol (PEG) (172). Comenzando con estudio en lombrices de tierra, siguiendo con estudios *in vitro* y pasando finalmente a ensayos preclínicos en cobayas, conejos y ratas, esta técnica se ha investigado ampliamente (172). Se han realizado numerosos estudios de investigación en modelo murino de rata, utilizando esta técnica de fusión axonal asistida por PEG en el nervio ciático, que han demostrado una mejor recuperación electrofisiológica y del comportamiento además de una mayor supervivencia del muñón distal (172). A pesar de que aún no se conoce exactamente el mecanismo de acción de esta técnica, bien es cierto que los informes de los estudios describen una recuperación funcional mucho más rápida comparada con otras, obteniendo una mejora un plazo de días a semanas (172).

Reducción de la duración de la denervación muscular

Los músculos denervados durante un largo periodo de tiempo acaban sufriendo atrofia, fibrosis y cambios en las placas terminales, lo que acaba conduciendo a una mala recuperación neurológica (173). Williams, realizó estudios en conejos y perros, implantando un estimulador eléctrico que aplicaba una estimulación eléctrica continua del músculo denervado, y demostró que, los animales mostraban una buena recuperación funcional tras la reparación microquirúrgica del nervio (173). Además, el autor también observó que los animales presentaron una buena tolerabilidad del dispositivo implantado (173).

6.5.2. Estudio de la plasticidad neuronal

Tras la reparación nerviosa la plasticidad neural desempeña un papel importante en la mejora del resultado global (174–176). Sin embargo, aún no se comprende bien la fisiopatología de la plasticidad neural, y para ello los estudios preclínicos con modelos animales son fundamentales (19). Para el estudio de la plasticidad neural se utiliza habitualmente el mono como modelo animal, en concreto los nervios de las extremidades superiores, seguramente por el mayor parecido con los humanos y por su capacidad para

realizar movimientos motores finos distales (174,177). Con el fin de registrar los cambios en la plasticidad cerebral después de una lesión nerviosa se utilizan la resonancia magnética nuclear (RMN) y el tensor de difusión, con lo que es posible estudiar la expansión del mapa cortical intra e interhemisférico y correlacionarlo con el grado de regeneración axonal (178). Por otro lado, también se ha estudiado la plasticidad neuronal inadaptada tras una lesión nerviosa en la rata (178). Se ha demostrado en muchos estudios de modelos de rata la potenciación en el asta dorsal de la médula espinal a largo plazo debido a la activación de los receptores de N-metil D-aspartato (178). Esto conduce a la hiperalgesia y la alodinia incluso después de la recuperación completa del nervio (178).

6.5.3. Estudio del dolor neuropático

La descripción que se ha hecho del dolor neuropático es según *Shurey y colaboradores* la más terrible de las torturas (179). Dado que tratar de replicar el dolor neuropático puede llegar a producir daños nerviosos irreversibles, este proceso no se realiza en seres humanos (179). En este caso el animal que más se utiliza como modelo en estudios preclínicos es la rata (179). Principalmente se utilizan para probar la eficacia de nuevos fármacos frente al dolor neuropático (179). Las causas que pueden desencadenar dolor neuropático son muchas, por lo que han sido varios los modelos en los que se ha tratado de replicar el escenario de esta patología clínica (179). Entre los modelos destacan los de: ligadura parcial del nervio ciático, lesión por constricción crónica utilizando ligaduras alrededor del nervio, transección completa del nervio, lesión del nervio preservado (se seccionan completamente los nervios peroneo y tibial mientras que se deja intacto el nervio sural), la crioneurólisis a -60° C del nervio ciático, neuritis inflamatoria del ciático, lesión del nervio ciático inducida por láser, lesión nerviosa inducida por productos fotoquímicos, neuropatía inducida por fármacos, neuropatía diabética con estreptozotocina y neuralgia post-herpética utilizando virus de la varicela zoster (179).

6.5.4. Entrenamiento de habilidades y destrezas

Los modelos animales son una parte imprescindible en la formación del personal sanitario para adquirir habilidades (180). La neurorrafia T-T del nervio ciático en ratas es uno de los ejercicios más comunes para adquirir destrezas en microcirugía nerviosa (180). Este abordaje del nervio ciático se hace mediante disección roma de los músculos isquiotibiales (180). Se realiza un corte limpio y la coaptación se lleva a cabo con sutura discontinua epineural sin tensión usando monofilamentos como el nylon o el polipropileno de 9-0 o 10-0 (180).

Es importante que el cirujano aprenda a manejar los microinstrumentos, se familiarice con el microscopio y a cambiar el zoom variando los aumentos, así como a realizar anudados con gran aumento y a percibir la tensión necesaria para asegurar el nudo sin dañar el tejido neural (180). Es por esto, que el uso del modelo de rata proporciona uno de los mejores y más probados modelos para la adquisición de habilidades en microcirugía avanzada (180).

6.5.5. Ética en los animales de experimentación

El *International Committee for Laboratory Animal Science* ha establecido unas directrices claras para utilizar animales de experimentación tanto en investigación como en formación, el principio de las 3Rs (181).

El *Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals*, cuerpo regulador de la experimentación animal de la India, añadió una cuarta "R": "Rehabilitación" (rehabilitación y cuidados de los animales después del experimento, de modo que el investigador tiene una responsabilidad moral hacia los animales) (182).

6.5.6. Evaluación de resultados

Es importante realizar una evaluación de los resultados con el fin de documentar correctamente el grado de regeneración nerviosa haciendo posible que los diferentes grupos experimentales sean comparables entre sí.

Evaluación funcional

La evaluación funcional motora es uno de los métodos más comunes para evaluar los resultados (183). Hay muchos parámetros que permiten analizar la marcha y por tanto la función motora de los miembros traseros, como son el índice funcional ciático, la relación de longitud de los pasos, el análisis de la trayectoria de la marcha, el análisis de los peldaños de la escalera, la puntuación de Basso-Beattie-Bresnahan (Una escala de 21 puntos de función locomotora) y el análisis computarizado de la marcha (183). Por otro lado, para los miembros anteriores, la función motora se puede evaluar mediante la prueba de agarre, la escala de miembros anteriores de Irvine-Beattie-Bresnahan, la prueba de la escalera, etc. (95,184,185).

Para evaluar la función sensorial es posible realizar pruebas de sensibilidad térmica y la prueba de Von-Frey (154,186).

Electrofisiología

La función nerviosa se puede evaluar con la ayuda de la evaluación electrofisiológica mediante electromiografía (EMG) y PCAM (154,187,188). Los PCAM que se registran proximal y distalmente al lugar de la lesión nerviosa, ayudan a evaluar la recuperación funcional del nervio (19).

Histología e histomorfometría

La evaluación funcional y electrofisiológica se complementa con un análisis histológico e histomorfométrico del segmento nervioso (183). Mediante la evaluación histológica se pueden identificar reacciones a cuerpos extraños y granulomas (183). También es muy útil para evaluar la presencia y el grosor de la vaina de mielina, el número de axones en regeneración, las adherencias perineurales y la fibrosis (183). Para ello hay una gran variedad de tinciones como el azul de toluidina, el tricrómico de Masson y hematoxilina y eosina entre otros, que ayudan a visualizar y estudiar cada uno de estos parámetros (183).

Imágenes médicas

Recientemente se están utilizando técnicas de imagen *in vivo* no invasivas como la RMN y la ultrasonografía para evaluar la regeneración nerviosa (189). La ultrasonografía permite evaluar la regeneración del axón dentro de un CN artificial (183,189). Sin embargo, sigue presentando un reto debido al coste y las dificultades técnicas para obtener imágenes útiles en animales pequeños (189).

Etiquetado retrógrado

Un método para evaluar la regeneración nerviosa consiste en el etiquetado retrógrado de las neuronas en la médula espinal de la rata o el ratón (19). Se utiliza habitualmente para estudiar el modelo de nervio femoral en ratas (190). Para ello se utiliza un rastreador, como el azul rápido, el *fluoro-goldo* el rubí fluorado (mediante una inyección intramuscular, aplicación del cristal, o mediante el depósito de conductos) (190). Después, se cuentan en la médula las neuronas teñidas, proporcionando una prueba cuantitativa de la reconexión entre la médula espinal y el nervio distal al lugar de la lesión (191). El etiquetado retrógrado también es útil para determinar la cantidad de axones regenerados mal dirigidos que pueden impedir una recuperación funcional (190).

6.5.7. Limitaciones y direcciones futuras

El éxito que se ha obtenido en los modelos animales de regeneración del nervio periférico no ha conseguido progresar a la práctica clínica (19). El hecho de que no sea posible extrapolar los datos obtenidos en los ensayos preclínicos directamente a humanos, es una de las principales y se debe a las diferencias fisiológicas entre animales y humanos en la regeneración nerviosa (19). Si bien es cierto que la fisiología de los primates se asemeja más a la de los humanos, pero debido al coste que supone la adquisición, transporte y mantenimiento además de las consideraciones éticas, se suele evitar toda experimentación con ellos.

El tiempo es otra limitación, ya que los estudios con animales tienen una duración relativamente corta y no existen apenas datos a largo plazo, siendo el seguimiento menos de 6 meses en la mayoría de los experimentos (19). En los estudios preclínicos se han utilizado ampliamente las células madre y han demostrado mejorar la regeneración nerviosa; pero aún se desconocen los efectos a largo plazo del uso de células madre pluripotentes o de los virus transducidos.

Tampoco existe un consenso sobre una evaluación estandarizada de los resultados, pues los investigadores utilizan una gran variedad de parámetros para medir la recuperación del nervio (19). Los animales utilizados en experimentación generalmente son jóvenes y carecen de otras enfermedades y esto no es exactamente lo que ocurre en un escenario clínico. Para resolver estas incógnitas algunos investigadores han realizado experimentos con animales de más edad con infecciones y/o con enfermedades como la diabetes (192,193). La mayoría de los estudios preclínicos de regeneración nerviosa utilizan un modelo de neurorrafia nerviosa con una brecha nerviosa de menos de 10 mm provocada y reparada inmediatamente (18). Sin embargo, no es frecuente la descripción de modelos de reparación nerviosa retardada (realizando en una primera intervención el daño nervioso y en una segunda la reparación) (194), así como modelos de estiramiento, laceración, formación de neuromas o una combinación de todos ellos (161,195). Hay que tener en cuenta todas estas variables y limitaciones a la hora de interpretar los resultados de la regeneración nerviosa en los modelos animales (19).

El éxito que han supuesto los CNs artificiales en animales ha dado lugar a la generalización de su uso en las lesiones nerviosas humanas (18). La seguridad y eficacia del pegamento de fibrina se demostró en modelos animales y posteriormente se adoptó en humanos, igual que, tras el éxito de la estimulación eléctrica en el roedores, también se ha introducido en el ser humano (19). De hecho, una breve estimulación eléctrica del nervio

mediano después de la cirugía de liberación del túnel carpiano mostró una mejora significativa en la regeneración axonal y la reinervación (196). Otro factor estimulante en la investigación del nervio periférico es el uso de animales transgénicos. La utilización de animales transgénicos implica la inserción de ácido desoxirribonucleico (ADN) extraño en el cromosoma del huésped y, así, el animal es capaz de imitar fenotípicamente la enfermedad o la condición que se desea estudiar (197). Una de las alteraciones genéticas que se ha usado en animales transgénicos ha sido la de expresar proteínas fluorescentes en el lugar de los axones en regeneración, para poder visualizar directamente regeneración nerviosa durante los seguimientos en animales vivos (198–200).

Es fundamental que se haga una estandarización de los animales, las cepas, los modelos de LNP y sobre todo de los criterios de evaluación de los resultados (19). De este modo los datos obtenidos en las investigaciones de la regeneración y recuperación de los nervios podrán ser comparables entre sí y se mejorará la traslación de las distintas terapias al ámbito clínico (20).

7. MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU). Este Centro está acreditado como Centro Usuario y de Cría de Animales de Experimentación (ES 100370001499) por la Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural de la Junta de Extremadura. Para llevar a cabo este trabajo, se presentó una memoria del proyecto que fue evaluada y resuelta con un informe favorable por parte del Comité de Ética en Experimentación Animal del CCMIJU, así como la autorización por la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio de la Junta de Extremadura (Expediente Nro.: EXP-20210105).

Las diferentes fases del estudio se realizaron en base al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

7.1. Justificación del método

Según la bibliografía revisada, el modelo murino, y más concretamente la rata, es un buen modelo para realizar este tipo de estudios de investigación básica en nervio periférico. Tras una revisión sistemática de la bibliografía, utilizando la metodología PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) y publicada en marzo de 2020, se llegó a la conclusión de que era el animal ideal para este tipo de estudio (20).

Según los resultados obtenidos en dicha revisión, la rata sería el mejor modelo para realizar estudios de regeneración nerviosa de ciencia básica, y el nervio más utilizado en este caso es el nervio ciático. A pesar de que la revisión se centra en trabajos sobre regeneración directa de nervio periférico, actualmente se ha visto que el estudio de los implantes nerviosos para la regeneración del nervio cuando existe un *gap* tiene alta relevancia, pues puede suponer un gran avance en medicina al permitir utilizar estos implantes en situaciones en las que ahora mismo la mejor alternativa es el autoinjerto de un nervio donante. Dicha revisión también concluye que los roedores no son el mejor modelo para estudios de grandes *gaps* debido a su reducida longitud y la limitación del tamaño los mismos. No obstante, se ha observado en la bibliografía que brechas de 1 cm son aceptables en este modelo murino. Por todo lo anteriormente expuesto, se ha elegido hacer este trabajo en el nervio ciático y en la rata como modelo animal.

Tras realizar una revisión en la bibliografía sobre conductos nerviosos, se determinó que para este trabajo era más adecuado el uso de un implante fabricado con un material biológico, que redujese la reacción a cuerpo extraño e inflamatoria propia de una cirugía de estas características. El material elegido fue el colágeno tipo I, del cual es posible adquirir implantes ya aprobados por las autoridades sanitarias como la FDA.

No hay que fijarse únicamente en el modelo animal que se va a utilizar, sino también en el modelo quirúrgico. Para ello, el modelo de la neurotomía del nervio ciático es, como ya se ha comentado anteriormente, el nervio más estudiado en este tipo de trabajos. Se trata de un modelo sencillo y reproducible, pero para el cuál es importante contar con las herramientas adecuadas, así como con una determinada destreza microquirúrgica. En este sentido, también es necesario disponer de un buen microscopio quirúrgico, que nos permita identificar bien todas las estructuras anatómicas, diferenciar los tejidos y las distintas capas del nervio, va a suponer una parte importante para el éxito de las cirugías de creación del *gap* nervioso.

7.2. Diseño experimental

7.2.1. Modelo animal

Para el desarrollo de este trabajo, se ha elegido la rata Wistar (*rattus norvegicus*) como animal para el modelo experimental. Los modelos murinos tienen un balance coste-beneficio muy alto, ya que no son muy caros y tienen un fácil manejo, tanto de manipulación como quirúrgico, en comparación con los modelos de animal grande (19). Estos animales no están acostumbrados a la presencia del hombre, pero si se les dedica algo de tiempo sería posible hacer que se acostumbren al investigador, reduciendo el estrés, miedo y/o malestar ocasionados por la manipulación (18,161).

En el presente estudio se utilizaron un total de 27 ratas Wistar hembras, con un peso medio de $284,26 \pm 21,47$ gr al inicio del estudio y que fueron ubicadas en racks individuales. Los animales permanecieron en nuestras instalaciones el tiempo de cuarentena correspondiente a la rata para cumplir con el un periodo de aclimatación. Las condiciones de la sala donde se encontraban ubicadas fueron las siguientes: ciclos de luz y oscuridad de 12-12 horas, una temperatura de entre 19-23° C y una humedad relativa de entre el 30-70%. El alimento consistió en *pellets* de pienso y la bebida se facilitaba con biberones de agua, ambos *ad libitum*. Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de forma aleatoria, mediante la web "www.random.org", teniendo cada grupo de estudio 9 animales realizando el abordaje del miembro inferior derecho.

- Grupo 1 (n=9) Control. Abordaje y disección sin traumatizar el nervio.
- Grupo 2 (n=9) Conducto nervioso. Abordaje y disección con neurotomía y reparación con un NeuraGen® vacío.
- Grupo 3 (n=9) Tratamiento. Abordaje y disección con neurotomía y reparación con un CN y 10µl de Sec-CMMAd de rata.

Dentro de la metodología se estableció que en caso de que algún animal no llegara a sobrevivir a la cirugía, o hubiera que proceder a su eutanasia por motivos humanitarios según la escala de valoración del dolor (ver tabla 4), sería reemplazado por otro para mantener los tres grupos homogéneos con 9 individuos en cada uno de ellos. Se administró una pauta vía subcutánea (SC) de fármacos como terapia antimicrobiana (enrofloxacin) y terapia antiinflamatoria/analgésica (meloxicam) durante 7 días tras la cirugía.

TABLA 4. ESCALA DE VALORACIÓN DEL DOLOR EN RATA

Observaciones	Variables para considerar y Puntuación	
PÉRDIDA DE PESO (DE 0 A 3)	- Normal (no pérdida o crece normalmente).	0
	- Pérdida de peso < 10%.	1
	- Pérdida de peso 11-20%, pero come.	2
	- Pérdida de peso > 20%, no come.	3
ASPECTO (DE 0 A 3)	- Normal.	0
	- Pelo en mal estado, acicalamiento anormal.	1
	- Pelo en mal estado, acicalamiento excesivo. - Postura anormal, arqueado, piloerección.	2 3
COMPORTAMIENTO ESPONTÁNEO (DE 0 A 4)	- Normal.	0
	- Alteración leve, excitabilidad.	1
	- Menos móvil o cuidadoso, aislado o poco activo.	2
	- Inquieto o casi inmóvil, comportamiento compulsivo, dando vueltas. - Inmovilidad > 24 horas.	3 4
PARÁMETROS CLÍNICOS GENERALES ADICIONALES Y CONSTANTES VITALES (DE 0 A 5)	- Normal.	0
	- Dacriorrea y ojos rojos.	1
	- Secreciones nasales.	1
	- Secreciones oculares.	2
	- Infección de las heridas.	2
	- Cambios en la temperatura corporal de 1-2° C, incremento del 30% en la frecuencia cardiaca, hiperventilación franca.	2
	- Ojos estrecho o medio cerrados.	3
	- Orejas rotadas.	3
	- Cambios en la temperatura corporal de > 2° C, incremento del 50% en la frecuencia cardiaca, hiperventilación con boca abierta, bradipnea o patrón superficial.	3
	- Parestesia.	5
- Canibalismo.	5	

0-4: Normal. 4-9: Supervisar cuidadosamente. Analgesia en función de la valoración clínica u otras correcciones farmacológicas. 9-14: Dolor intenso. Analgesia y/u otras correcciones farmacológicas. Si al reevaluar el estado del animal la puntuación no varía, se procede a la eutanasia. 15-20: Eutanasia. Cuando el animal presenta una puntuación de 3 en más de dos parámetros, todos los 3 pasan a 4.

Antes de someter a los animales a la cirugía de sección del nervio ciático se obtuvo un registro de valores basales del índice funcional del nervio ciático (IFC) a través de la impresión de la huella en la marcha (201,202).

La realización de la cirugía tuvo lugar bajo anestesia general inhalatoria con sevoflurano y todo el procedimiento anestésico (inducción, mantenimiento y recuperación) se llevó a cabo bajo la supervisión de profesionales veterinarios.

7.2.2. Fases de Laboratorio

- Aislamiento, expansión y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata.

Las CMMAd de rata se aislaron a partir de tejido adiposo procedente de la zona inguinal de ratas adultas mediante intervención quirúrgica. Este tejido se lavó con tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) y fue sometido a digestión enzimática durante una hora con colagenasa tipo I en PBS. El tejido digerido se lavó con medio de cultivo (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) y suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) al 10%. Posteriormente, se trató con cloruro amónico 160mM para eliminar las células sanguíneas, y fue resuspendido en DMEM con FBS al 10%. El siguiente paso fue pasar la muestra a través de un filtro de nylon de 40 μm . La suspensión celular obtenida se sembró en frascos de cultivo y su expansión se llevó a cabo en incubadoras con un 5% CO_2 y a 37° C, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se transfirieron a nuevos frascos de cultivos anotándose los pases que se iban dando.

Para comprobar que el perfil fenotípico de las células aisladas se correspondía con el característico de células madre mesenquimales, 2×10^5 CMMAd se marcaron con anticuerpos y se analizó la presencia o ausencia de estos mediante citometría de flujo. Se incubaron, a 4° C durante 30 minutos, para marcar las células con los anticuerpos monoclonales de rata biotinilados. Los anticuerpos que se emplearon fueron: CD18, CD29, CD45, CD54, CD90, CD106, MHC-I, MHC-II sacados de los clones WT-3, HM β 1-1, OC-1, ICAM-1, Thy-1, MR106, OX-18, y 14-4-45 respectivamente. Después se lavaron con PBS y se devolvieron a la incubadora otros 30 minutos a 4° C con alofococianina conjugada con estreptavidina (Ex Máx 650 nm/Em Máx 660 nm). Finalmente se lavaron y resuspendieron en PBS. Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, California, Estados Unidos de América) para el análisis de citometría.

Para evidenciar la diferenciación en adipocitos, condrocitos, y osteocitos se tiñeron 2×10^5 células con *y Oil Red O*, *Alcain Blue 8GX*, y *Alizarin Red S* respectivamente, tras cultivarlas durante 21 días en medio de cultivo de diferenciación (StemPro, Gibco) y alcanzar una confluencia del 80%.

➤ Aislamiento y conservación del secretoma.

El Sec-CMMAd se obtuvo a partir de las CMMAds cultivadas en frascos de cultivo de 175 cm². Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, el medio de cultivo (DMEM con FBS al 10%) se reemplazó por un medio de aislamiento de secretoma (DMEM con insulina-transferrina-selenio al 1%). Los sobrenadantes de estos cultivos fueron recogidos cada 3-4 días. El Sec-CMMAd se aisló de los sobrenadantes mediante la realización de dos centrifugaciones sucesivas, la primera a 1000x g durante 10 minutos y la segunda a 5000x g durante 20 minutos, ambas a 4° C para eliminar los restos celulares y detritus. Los sobrenadantes se filtraron en primer lugar con un filtro de acetato de celulosa estéril con poros de 450 nm de diámetro, y seguidamente con otro filtro de 200 nm de diámetro. Posteriormente, se utilizaron 3 kDa MWCO *Amicon Ultra devices (Merck-Millipore Sigma)* para concentrar los sobrenadantes en 15 ml, centrifugando durante 60 minutos a 4° C y 4000x g. El concentrado obtenido se recogió, caracterizó y posteriormente se conservó a -20° C hasta su posterior uso. Para su aplicación durante la cirugía el secretoma se descongeló previamente, por lo que se aplicó a temperatura ambiente.

La concentración de Sec-CCMAd se determinó de manera indirecta mediante cuantificación de proteína total a través de un ensayo Bradford obteniendo un valor de 1.526 µg de proteína/ml. Para la cuantificación de proteínas, se incubaron 20 µl del concentrado de Sec-CMMAd con 180 µl de reactivo Bradford (Bio Rad Laboratorios, Hercules, California, Estados Unidos de América) a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 595 nm, y la concentración de proteínas se extrapoló a partir de una curva de concentración estándar de albúmina sérica bovina.

7.2.3. Procedimientos quirúrgicos

➤ Protocolo anestésico

En primera instancia, se tomó el peso de cada animal para adecuar la dosis de fármacos que precisaba. El agente anestésico inhalatorio empleado fue el sevoflurano y se administró con oxígeno, a 1,2 veces la concentración alveolar mínima en la rata durante todo el procedimiento. Para la anestesia de las ratas, inicialmente se introdujo al animal en

una cámara de inducción anestésica específica para roedores. A la cámara se le acopló un circuito cerrado a una máquina de anestesia con un vaporizador de sevoflurano al 3,5-4% y oxígeno al 90%. Una vez realizada la inducción anestésica, se extrajo al animal de la cámara y se le colocó una mascarilla. La mascarilla se conectó al circuito circular de un sistema de anestesia equipado con ventilador, así como ventilación mecánica para mantener la normocapnia durante la anestesia y proporcionar adecuada oxigenación. El flujo de gas fresco al inicio fue de 1 l/min y, 15 minutos después, de 0,5 l/min.

➤ Protocolo quirúrgico

Tras dejar al animal en un plano profundo de anestesia, se preparó el campo quirúrgico mediante rasurado de pelo en la zona lateral del miembro derecho y posteriormente se lavó con solución yodada como método antiséptico al menos 2 veces. El animal ya preparado fue recostado sobre una manta térmica, para mantener su temperatura y evitar una posible hipotermia. Para el abordaje del nervio ciático se colocó al animal en decúbito lateral izquierdo. Mediante palpación directa se identificó el fémur y se realizó una incisión recta con una tijera de Iris y una pinza de Adson sobre la región glútea, disecando la piel y el tejido subcutáneo. Se identificaron los músculos glúteo superficial y bíceps femoral. Se incidió la fascia glútea entre las dos cabezas del músculo bíceps femoral y se disecó en profundidad para localizar el nervio ciático, en el que se observan 4 fascículos: dos de posición cráneo-ventral, correspondientes a los nervios tibial y peroneo, y dos caudo-dorsales, más delgados, que son ramas musculares para los músculos isquio-tibiales. Los procedimientos de disección y reparación nerviosa se realizaron bajo visión microscópica y por el mismo cirujano. El instrumental empleado para llevar a cabo el acto quirúrgico fue específico para la realización de procedimientos microquirúrgicos (S&T AG *Microsurgical instruments*, Suiza), la magnificación operatoria se obtuvo utilizando un microscopio quirúrgico (Opmi Pentero 800, Carl Zeiss, Alemania).

Una vez expuesto el nervio ciático se colocaron unos retractores para permitir una manipulación del nervio más cómoda, se disecó e independizó una longitud de nervio superior a un centímetro. En los animales de los grupos 2 y 3 se practicó una neurotomía del nervio ciático derecho, mediante el empleo de una micro-tijera específica para nervios y tendones con una de sus ramas dentada (SDC-15T, S&T AG *Microsurgical instruments*, Suiza). Con dicho instrumental se extrajeron 3 mm de nervio para crear el *gap* (Figura 7A), y posteriormente se introdujeron los bordes del nervio dentro de un CN de colágeno. Los bordes del nervio se suturaron al conducto que medía 10 mm con 2-4 puntos simples discontinuos. La sutura usada para reparar el nervio fue un monofilamento de nylon 10/0

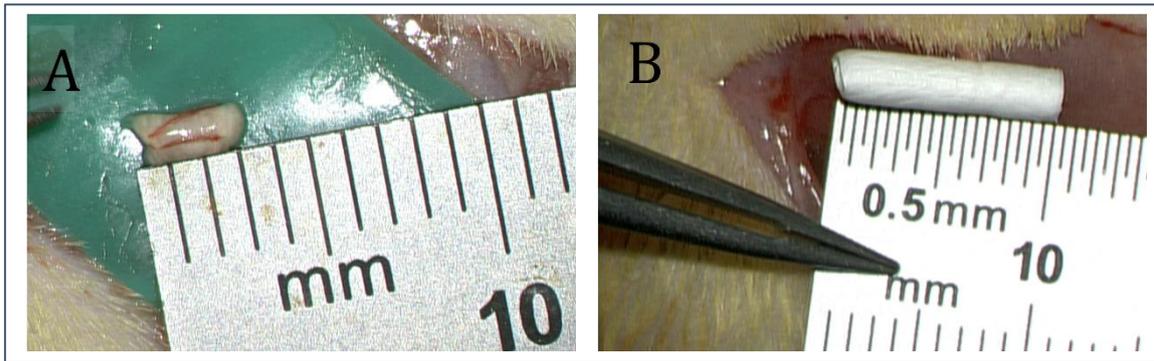
no absorbible (Laboratorio Aragón, España), con las siguientes características: aguja cilíndrica, de 4mm de longitud y 100 micras de diámetro, con forma de 3/8 y. La longitud de la hebra fue de 15 cm y de color negro. En el grupo 3 se administraron 10 μ l del tratamiento correspondiente, cuya concentración era de 1526 μ g/ml, dentro del CN. Finalmente, se utilizó un multifilamento trenzado incoloro recubierto de PGA 5/0 absorbible del Laboratorio Aragón, cuyas características eran: aguja triangular, de 16 mm de longitud, con forma de 3/8 y longitud de la hebra era de 45 cm; para realizar el cierre de la piel de los animales. La técnica de sutura utilizada para el cierre cutáneo fue un patrón intradérmico para evitar que los animales se mordiesen la sutura y se abriese, reforzada con algunos puntos simples si era necesario. Sin embargo, en algunos casos no fue suficiente y hubo animales que requirieron un segundo cierre.

Una vez elegido el tipo de material de los CNs, en este caso estaban hechos de colágeno tipo I (NeuraGen®, *Integra LifeScience*, Estados Unidos de América, se adquirieron 6 unidades de implantes de 1,5 mm de diámetro interno y una longitud de 30 mm. Cada unidad se dividió en otras 3 partes de 10 mm (Figura 7B), para ser implantadas en los animales de los grupos 2 y 3 de estudio. Una vez cortados en tres partes iguales utilizando el microscopio quirúrgico, una regla milimétrica y unas tijeras de microcirugía, los conductos quedaron implantados de la siguiente manera:

- Caja 1 NeuraGen®: Lote: 5211116 y caducidad 31/12/2022. Se implantó en los animales RT21- 0265, RT21- 0266 y RT21- 0267.
- Caja 2 NeuraGen®: Lote: 5022035 y caducidad 31/10/2022. Se implantó en los animales RT21- 0268, RT21- 0269 y RT21- 0270.
- Caja 3 NeuraGen®: Lote: 5022035 y caducidad 31/10/2022. Se implantó en los animales RT21- 0271, RT21- 0272 y RT21- 0273.
- Caja 4 NeuraGen®: Lote: 5788559 y caducidad 31/08/2023. Se implantó en los animales RT21- 0276, RT21- 0277 y RT21- 0278.
- Caja 5 NeuraGen®: Lote: 5788559 y caducidad 31/08/2023. Se implantó en los animales RT21- 0279, RT21- 0280 y RT21- 0282.
- Caja 6 NeuraGen®: Lote: 5211116 y caducidad 31/12/2022. Se implantó en los animales RT21- 0283, RT21- 0284 y RT21- 0285.

Se recogieron los tiempos quirúrgicos para valorar si se puede considerar un factor crítico de esta práctica y para comparar entre los grupos si hay diferencias significativas.

FIGURA 7. IMÁGENES DE LA CIRUGÍA



La imagen A muestra el fragmento de nervio de 3 mm que se extirpó a los animales para crear la brecha. En la imagen B observamos el NeuroGen ya cortado a una longitud de 10 mm para implantarlo.

➤ Protocolo postquirúrgico

Tras la cirugía, se realizó un control exhaustivo diario de cada uno de los animales, estableciéndose durante la primera semana una terapia antibiótica con enrofloxacina a una dosis de 7'5mg/kg/día y analgésica mediante meloxicam cuya dosis fue 1mg/kg/día.

7.2.4. Seguimiento de los animales y toma de muestras

Se realizó un seguimiento del peso de los animales tras la cirugía a modo de control del estado de salud de las ratas. Al igual que antes de la cirugía, los animales se sometieron a la prueba de la impresión plantar de los miembros posteriores sobre un folio en blanco tras aplicar tinta en la planta de las extremidades traseras. Mediante este proceso se pretendía evaluar la progresión de la regeneración nerviosa midiendo el índice funcional del nervio ciático. Este índice sirve para medir la funcionalidad del nervio, siendo un método de evaluación de la condición motora, pues es mejor indicador que la evaluación sensorial (201). Para el cálculo es preciso tomar una serie de medidas de las impresiones de las huellas que los animales han dejado sobre el papel.

- Proyección ortogonal de la distancia al miembro opuesto (POD), que consiste en medir desde la punta de los dedos de una huella hasta la punta de los dedos de la siguiente del miembro contrario. Aunque esta medida no entra en la ecuación es interesante medirla. (Figura 8 A, 1).

- La longitud de la huella (LH), Desde el punto más caudal a la punta del dedo III (Figura 8 B, 2).

- La distancia que hay entre los dedos I y V de los pies (D1'5) (Figura 8 B, 3).

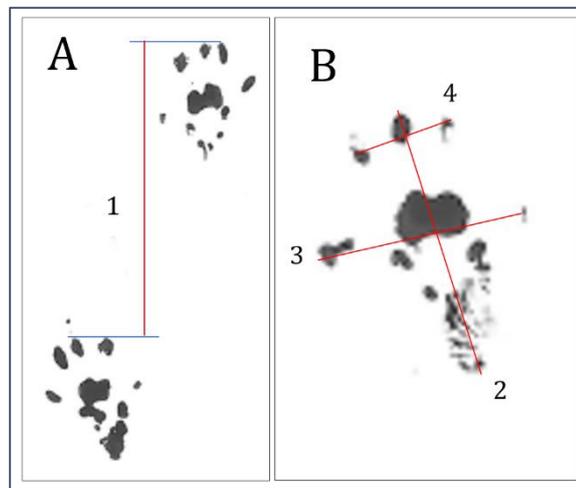
- La distancia que hay entre los dedos II y IV (D2'4) (Figura 8 B, 4).

Después hay que aplicar la fórmula siguiente y el resultado se expresa en porcentaje, que va desde -100%, pérdida total de la función; $0\% \pm 11\%$, función normal del nervio (201).

$$IFC = \left(-38,3 \times \frac{LHe - LHn}{LHn}\right) + \left(109,5 \times \frac{D1'5e - D1'5n}{D1'5n}\right) + \left(13,3 \times \frac{D2'4e - D2'4n}{D2'4n}\right) - 8,8$$

La toma de muestras se realizó con el animal bajo anestesia general. Utilizando el mismo abordaje que en la cirugía, se extrajo una porción de nervio desde 5 mm antes y después de la neurotomía para su estudio histopatológico y determinación genética. Una vez obtenida la muestra, se procedió a la eutanasia del animal con una inyección intracardiaca de cloruro potásico a una dosis de 2 meq/kg.

FIGURA 8. MEDIDAS PARA EL CÁLCULO DEL IFC



En la figura A el número 1 representa la POD. En la figura B se muestran las otras 3 medidas necesarias para calcular el IFC: Longitud de la huella (2), Distancia entre dedos 1 y 5 (3) y distancia entre los dedos 2 y 4 (4).

7.3. Histopatología

Las muestras una vez extraídas de cada animal se fueron introduciendo en Falcon® de 15 ml con 12 ml de formaldehído al 4%. Para el procesado de las muestras se siguió un programa de fijación con inmersiones progresivas de las muestras en vasos con alcohol cada vez más puros y con realización de vacío. Comenzando con una inmersión de 2 horas en alcohol al 50%, pasando a inmersiones de una hora y media en alcohol al 70%, 80% y 96% consecutivamente. Después pasaron por tres inmersiones en alcohol absoluto (100%), dos de ellas de una hora y media y la última de una hora de duración. Una vez terminaron de fijarse en alcohol se realizaron dos lavados en xileno de una hora cada uno, para eliminar el alcohol que podía haber quedado dentro de las muestras. Para finalizar las muestras se sumergieron en dos baños de parafina de una hora cada uno. Todas las inmersiones se

realizaron con vacío y efecto muelle, para que el líquido se moviese y se renovase en las muestras que quedaban abajo.

Una vez las muestras estaban embebidas en parafina se pasaron por un microtomo de rotación Leica RM2255 (Leica *Biosystems*, Alemania) para desbastarlas y quitar la parafina sobrante con cortes de 20 micrómetros. Cuando el corte iba acercándose al nervio, éste se redujo a 3 micras para dejar las muestras bien presentadas sin perder demasiado contenido de la misma.

Las tinciones que se realizaron en los cortes de la muestra fueron azul de toluidina, *Luxol Fast Blue* (LFB) y neurofilamento mediante inmunohistoquímica, todas según las instrucciones del fabricante en cuanto a los diferentes pasos a seguir. Para la inmunohistoquímica es necesario hacer un paso previo a la tinción que es el desenmascaramiento antigénico, para que los anticuerpos puedan adherirse y teñir la muestra.

La evaluación histopatológica fue ciega y se evaluaron la cantidad de axones que componen el tejido regenerado, así como, la cantidad de mielina a su alrededor. Tiñendo las muestras con LFB, es posible diferenciar las fibras de colágeno de la matriz extracelular de la de otras estructuras, no obstante, no es posible identificar bien las vainas de mielina (203). El azul de toluidina a diferencia del LFB, sí que permite identificar fácilmente los axones con vaina de mielina y es el *gold standard* en la histología de regeneración nerviosa, permitiendo identificar la mayor parte de los axones mielinizados (203–205). Con la inmunohistoquímica de neurofilamento se distinguen los axones regenerados que han crecido a lo largo del CN con mejores resultados comparado con el GAP-43 (206).

7.4. RTq-PCR

La expresión génica de las muestras de nervios seleccionados (n= 12) se evaluó mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTq-PCR). Para dicho estudio, se extrajo de forma aleatoria la parte proximal del nervio de 12 individuos divididos en 3 grupos: grupo control (n=4), grupo conducto nervioso (n= 4) y grupo tratamiento (n=4). El tejido se almacenó a -20° C hasta su procesamiento en el reactivo de conservación *Allprotect Tissue Reagent* (QIAGEN, Frankfurt, Alemania).

Se utilizó el *kit PureLink® RNA Mini* (número de catálogo 12183018A; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) para aislar el ARN mensajero (ARNm) de las muestras según las indicaciones del fabricante. Seguidamente, se determinó la concentración y la pureza de las muestras.

El ADNc se sintetizó utilizando el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA™* (número de catálogo 4387406; 50 reacciones; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) a partir de 36,36 ng de ARNm en una reacción de transcripción inversa, según las instrucciones del fabricante. Para el proceso de amplificación se utilizaron sondas comerciales (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) específicas de 13 genes (Tabla 5) junto con la mezcla que contiene la polimeras TaqMan *Fast Advance Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Este proceso tuvo lugar en el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). Los productos de amplificación se cuantificaron por el método de fluorescencia utilizando la expresión de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con *Gusb* como gen de referencia. La elección de estos genes fue determinada por estar presente tanto en humanos como en ratas haciendo una selección de genes en la aplicación web de *Gene Ontology* y comprobando cuales de ellos coincidían en ambas especies (207,208).

TABLA 5. GENES ESTUDIADOS MEDIANTE RTq-PCR.

Símbolo del gen (nombre del gen)	ID del gen	Tipo de gen
<i>Angpt2</i> (<i>Angiopoietin 2</i>)	Rn.138360	Angiogénesis
<i>Bcl2</i> (<i>B-Cell Lymphoma 2</i>)	Rn.9996	Apoptosis/necrosis
<i>Casp3</i> (<i>Caspase 3</i>)	Rn.10562	Apoptosis/necrosis
<i>Casp9</i> (<i>Caspase 9</i>)	Rn.32199	Apoptosis/necrosis
<i>Fgf2</i> (<i>Fibroblast growth factor 2</i>)	Rn.31808	Angiogénesis
<i>Gusb</i> (<i>Glucuronidase, beta</i>)	Rn.3692	Gen de referencia
<i>Hif1a</i> (<i>Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit</i>)	Rn.10852	Estrés oxidativo
<i>Il1b</i> (<i>Interleukin 1 beta</i>)	Rn.9869	Inflamación
<i>Il6</i> (<i>Interleukin 6</i>)	Rn.9873	Inflamación
<i>Il10</i> (<i>Interleukin 10</i>)	Rn.9868	Inflamación
<i>Sod1</i> (<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>)	Rn.6059	Estrés oxidativo
<i>Tnf</i> (<i>Tumor necrosis factor</i>)	Rn.2275	Inflamación
<i>Vegfa</i> (<i>Vascular endothelial growth factor A</i>)	Rn.1923	Angiogénesis

Listado de genes utilizados en este estudio para el análisis de expresión génica.

7.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables a estudiar se realizó con el programa estadístico SPSS 17.0 (SPSS INC., Chicago, Illinois, USA). Las variables fueron descritas mediante la media \pm desviación estándar para cada uno de los grupos. Debido al tamaño muestral se asumió la normalidad de la población. Al no seguir una distribución normal, se realizaron las pruebas no paramétricas: en primer lugar, un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias estadísticamente significativas se marcaron para un (p valor $\leq 0,05$).

8. RESULTADOS

Todos los animales incluidos en el estudio presentaron un estado de salud normal en el examen clínico previo. Los resultados de esta tesis doctoral se presentan de acuerdo con los materiales y métodos expuestos anteriormente. Por tanto, comenzaremos con los resultados de las partes correspondientes a la fase de laboratorio, seguiremos con los resultados de la fase quirúrgica y terminaremos con los resultados de los seguimientos, toma de muestras, histología y expresión de genes.

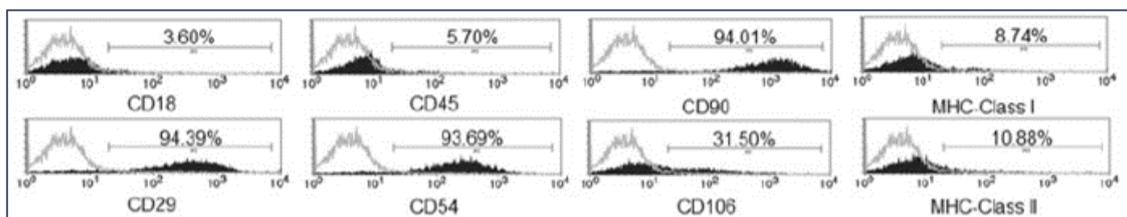
8.1. Fase de laboratorio

En esta fase, los resultados obtenidos en los diferentes puntos permitieron seguir adelante con el proceso de obtención de Sec-CMMAd y poder utilizarlo como tratamiento en nuestro estudio.

8.1.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata

Mediante citometría de flujo se determinó la caracterización fenotípica de las CMMAd. La población celular fue seleccionada mediante el tamaño y complejidad y se evaluó la expresión de los siguientes marcadores: CD18, CD29, CD45, CD54, CD90, CD106, MHC-I, MHC-II (Figura 9). La mayoría de las células mostraron expresión positiva de los marcadores CD29, CD54 y CD90.

FIGURA 9. MARCADORES CELULARES DE LAS POBLACIONES DE CMM

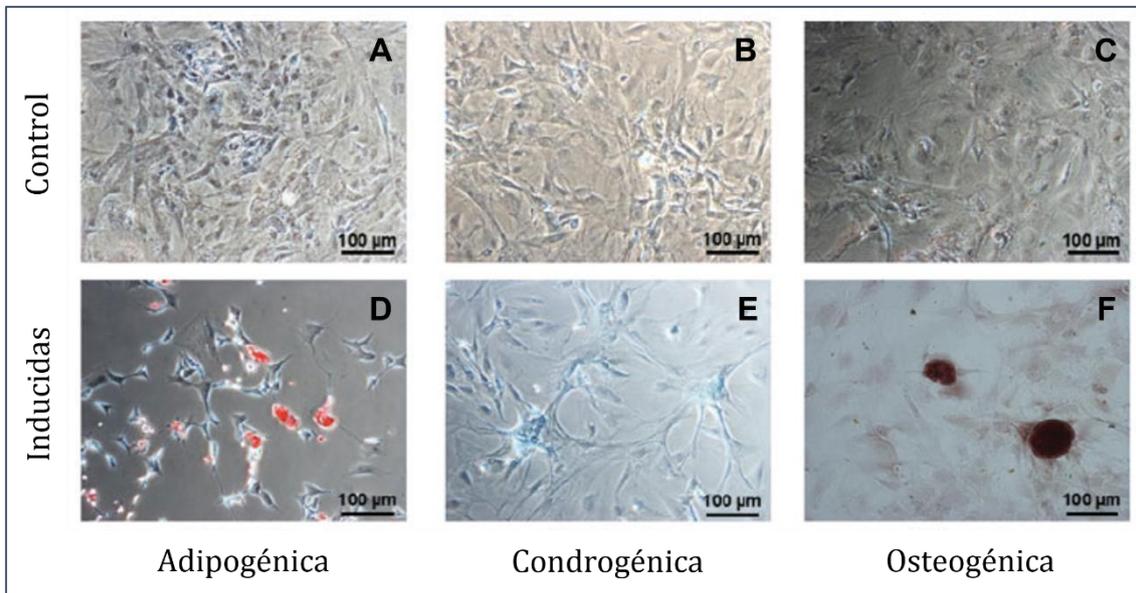


Histogramas con niveles de expresión de los diferentes marcadores de superficie celular representados como el porcentaje de células positivas sobre el control negativo (controles isotipo, histogramas en línea gris) (Ballestín et al., *Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Skin Free Flap Model*, *J Reconstr Microsurg.* 2018 Oct.;34(8):601-609).

Además, se comprobó que las CMMAd poseían la capacidad de diferenciarse en las tres siguientes líneas mediante tinciones: adipogénica usando *Oil Red* (Figura 10 A y D) O,

condrogénica mediante *Alcain Blue 8GX* (Figura 10 B y E), y osteogénica con la tinción *Alizarin Red S* (Figura 10 C y F).

FIGURA 10. DIFERENCIACIÓN DE LAS CMMAD EN LAS TRES LÍNEAS CELULARES



Diferenciación *in vitro* de las CMMAD de rata. A, B y C muestran las células cultivadas 21 días con medio de cultivo estándar. Tras 21 días con medio de cultivo de inducción a la diferenciación adipogénica (D), condrogénica (E) y osteogénica (F) (Ballestín et al., *Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Skin Free Flap Model*, *J Reconstr Microsurg.* 2018 Oct.;34(8):601-609).

8.2. Fase quirúrgica y seguimientos

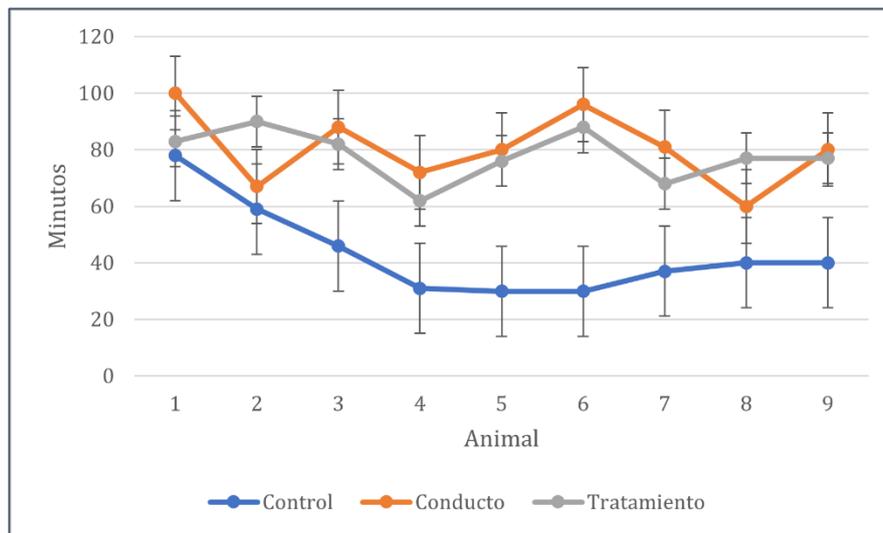
En esta fase analizamos los resultados de los tiempos quirúrgicos, peso y estado de los animales durante el estudio, así como el análisis de la marcha y el IFC.

8.2.1. Tiempos quirúrgicos

Los tiempos de las intervenciones se midieron desde el inicio de la anestesia hasta la recuperación del animal. La duración del promedio quirúrgico osciló entre 30-100 minutos (min) (Figura 11). Dentro de los animales del grupo control (grupo 1) los tiempos estuvieron entre 30-78 min, teniendo una duración media de cirugía de $43,44 \pm 15,91$ min. Dentro del grupo del conducto nervioso vacío (grupo 2) los tiempos quirúrgicos oscilaron entre 60-100 min, la media de la cirugía fue de $80,44 \pm 13$ min. Por otro lado, las cirugías del grupo con secretoma (grupo 3) duraron entre 62-88 min, siendo la media de $78,11 \pm 8,99$ min. Además, se cronometró la duración de la reparación del nervio en los grupos 2 y 3, desde la realización de la neurotomía hasta finalizar el último punto entre el tubo y el muñón. También se tuvieron en cuenta el número de puntos simples que se dieron para

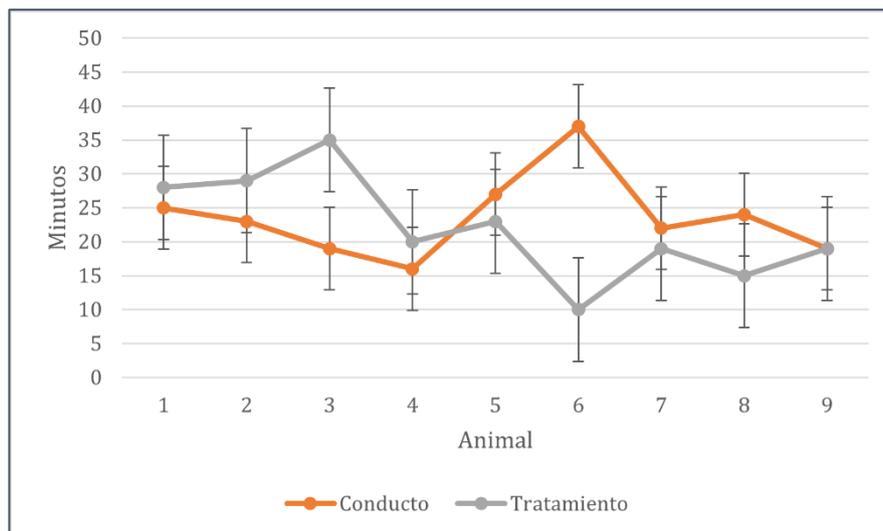
anclar el nervio al interior del CN. Los tiempos de reparación oscilaron entre los 16-37 min y los 10-35 min en los grupos 2 y 3 respectivamente (Figura 12). La media del grupo 2 fue de $23,56 \pm 6,09$ min y la del grupos 3 fue de $22 \pm 7,66$ min. En el animal 6 correspondiente a los grupos 2 y 3 se observa un aumento del tiempo quirúrgico, que coincidió con el reinicio de las cirugías una semana más tarde. Este aumento puede ser debido al impasse que hubo entre cirugías en el animal del grupo tratamiento y a que el NeuraGen® del animal del grupo 2 necesitó un mayor número de puntos simples discontinuos.

FIGURA 11. TIEMPOS QUIRÚRGICOS



Duración de la cirugía de cada animal expresada en minutos.

FIGURA 12. TIEMPO DE NEURORRAFIA



Duración de la neurorrafia de cada animal de cada grupo expresada en minutos.

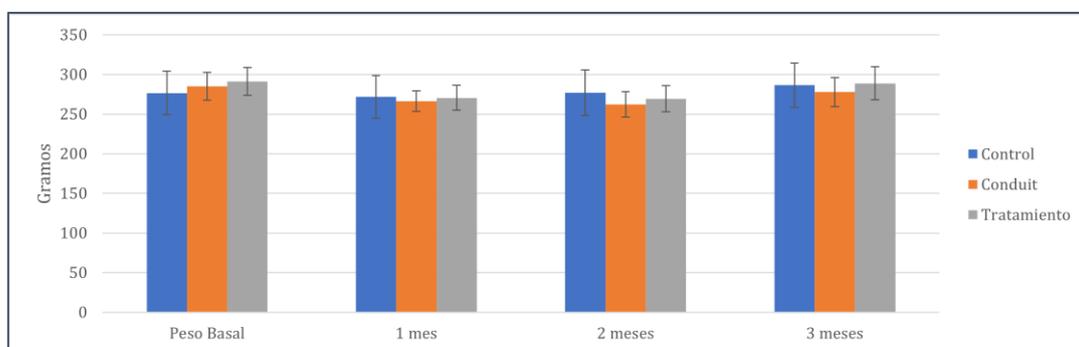
8.2.2. Peso y estado de los animales

Los pesos basales de los animales estuvieron dentro del rango entre 245-315 gr, con un peso medio de $284,26 \pm 21,47$ gr. Un mes después de la cirugía se observó un descenso del peso en la mayoría de los animales. Esta pérdida de peso fue de $14,82$ gr de media y una desviación estándar de $11,22$ gr por animal, dando un peso medio de $269,44 \pm 18,83$ gr. A los dos meses apenas hubo diferencias a nivel de población con un peso medio de $269,63 \pm 21,31$ gr. Finalmente, el peso que alcanzaron los animales el día del final de estudio fue de $284,33 \pm 22,29$ gr, volviendo a valores similares a los basales.

Analizando los pesos entre los diferentes grupos (ver Figura 13) se observa que en el grupo control, que partía de unos $276,67$ gr de media, los pesos descienden entrono a 5 gr de media el primer mes, volviendo a valores similares al basal en el segundo mes y finalmente teniendo un peso medio de casi 10 gr más que al inicio. En el grupo conducto nervioso partimos de un peso medio inicial de 285 gr, al primer y segundo mes desciende casi 19 gr y hasta 23 gr de media con respecto al peso basal, recuperando algo más de 15 gr en el último mes. Con respecto al grupo tratamiento comenzaron con un peso medio de $291,11$ gr, que bajó en $20,5$ gr el primer mes y $1,25$ gr el mes siguiente, llegando a recuperar $19,5$ gr en el último periodo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos a lo largo del tiempo.

Por otro lado, se observó que algunos animales se automutilaban, abriéndose heridas en las zonas donde se aplicó la terapia postquirúrgica vía SC, y en las extremidades donde se practicó la sección del nervio. En total se encontraron 5 animales del grupo conducto nervioso y 5 del grupo tratamiento con mutilaciones de alguna de las falanges. No obstante, ningún animal alcanzó una valoración alta en la escala de dolor que supusiera la eutanasia humanitaria del mismo.

FIGURA 13. PESO MEDIO DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

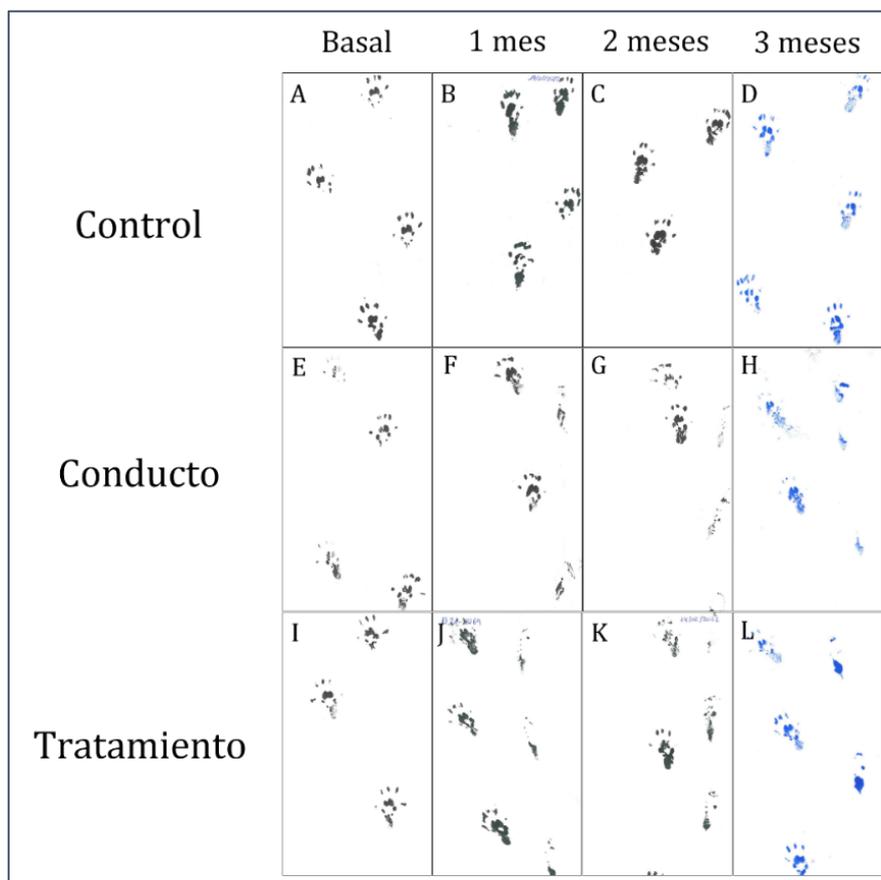


Gráfica que muestra el peso medio de los animales de cada grupo con la desviación estándar, expresados en gramos, en los 4 momentos del estudio: basal, primer mes, segundo mes y tercer mes.

8.2.3. Análisis del Índice Funcional del Ciático.

Los resultados obtenidos de esta prueba indican que la incisión y el abordaje del nervio ciático no afecta a la marcha de los animales. Sin embargo, en el periodo de tiempo que duró el estudio (12 semanas tras la cirugía), no se observó una recuperación funcional a nivel de la marcha y al apoyo plantar en los animales de los grupos 2 y 3 (Figura 14). Durante la marcha, se aprecia un movimiento del miembro afectado forzado, sin corresponderse con el del miembro intacto en ambos grupos. También se observó un mal apoyo plantar en los animales de los grupos con el nervio seccionado, independientemente de si presentaban falanges amputadas. Como hemos comentado en el apartado anterior, había 10 animales en total de los grupos conducto (n=5) y tratamiento (n=5) a los que les faltaba una o varias falanges. Por otro lado, un animal presentó una úlcera de gran tamaño a nivel del tobillo que le impedía realizar una marcha normal en el tramo final del estudio.

FIGURA 14. IMPRESIÓN DE LAS HUELLAS PLANTAR



En esta figura se muestra un ejemplo de una animal de cada grupo en los diferentes tiempos donde se tomaron las medidas. Control: basal (A), 1 mes (B), 2 meses (C), y 3 meses (D); Conducto: basal (E), 1 mes (F), 2 meses (G), y 3 meses (H); Tratamiento: basal (I), 1 mes (J), 2 meses (K), y 3 meses (L).

Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 6 y el valor del IFC en la figura 15 y presentaron diferencias estadísticamente significativas a 1 mes (p -valor = 0,002), 2 meses (p -valor = 0,001) y 3 meses (p -valor < 0,001) mediante el ANOVA de Kruskal-Wallis. Mediante la prueba U de Mann-Whitney, se observa que las diferencias aparecen entre los grupos 1 y 2 en las mediciones tras la cirugía (p -valor = 0,008 a 1 mes; 0,002 a los 2 meses; y 0,001 a los 3 meses) y entre los grupos 1 y 3 a los meses 1, 2 y 3 con una significación de (p -valor = 0,001; 0,002; y 0,001) respectivamente. Entre los grupos 2 y 3 no se observan diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a diferencias dentro de grupos a lo largo del tiempo aparecen, utilizando el ANOVA de Kruskal-Wallis, diferencias significativas en los grupos 2 (p -valor < 0,001) y 3 (p -valor = 0,001). Tras realizar la prueba U de Mann-Whitney no se observaron diferencias en el grupo control comparando los tiempos distintos entre sí. En el grupo tratamiento, sí se observan diferencias significativas únicamente comparando el tiempo basal con los otros 3 (p -valor = 0,003 a 1 mes; 0,001 a los 2 meses; y 0,001 a los 3 meses) respectivamente. Finalmente, en el grupo conducto se observaron diferencias comparando todos los tiempos entre sí a excepción de los 2 y 3 meses. Entre el tiempo basal y el primer mes el p -valor = 0,030; comparando el basal con los tiempos 2 y 3 meses el p -valor = 0,001; y entre el mes 1 y los otros 2 tiempos el p -valor = 0,032 para ambos tiempos.

TABLA 6. MEDIAS DE LAS DISTANCIAS PARA EL CÁLCULO DEL IFC

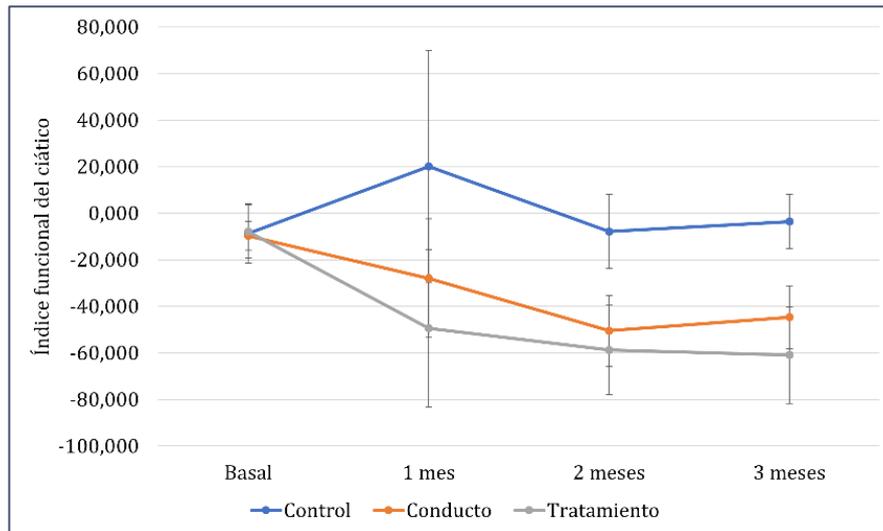
Grupo	Tiempo	PODe	PODn	LHn	D1'5n	D2'4n	LHe	D1'5e	D2'4e
Control	Basal	55,222	65,222	31,333	22,222	11,667	30,889	22,111	11,444
Control	4 Sem.	66,875	52,750	31,875	17,750	10,875	30,125	20,875	11,000
Control	8 Sem.	58,250	54,500	30,625	21,000	11,500	30,750	21,125	11,250
Control	12 Sem.	61,333	56,889	31,889	20,778	11,222	31,333	21,444	11,222
Conducto	Basal	55,889	65,111	30,667	22,333	12,222	30,333	22,111	12,000
Conducto	4 Sem.	53,429	62,857	33,429	17,000	9,143	33,571	14,000	7,000
Conducto	8 Sem.	45,667	66,333	32,333	20,667	12,500	36,167	14,333	8,500
Conducto	12 Sem.	40,333	62,167	32,333	20,167	12,333	31,833	14,500	6,667
Tratamiento	Basal	55,111	68,889	28,778	23,111	12,556	28,667	23,222	12,667
Tratamiento	4 Sem.	49,111	50,556	32,889	14,556	8,222	31,889	9,111	5,556
Tratamiento	8 Sem.	41,143	56,286	32,571	19,429	11,429	33,000	11,143	7,286

Evaluación de la reparación microquirúrgica del nervio periférico mediante el uso de conductos sintéticos y terapia celular en un modelo experimental

Tratamiento	12 Sem.	53,000	58,429	33,714	20,000	11,143	29,857	10,429	6,000
-------------	---------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

Valor medio de las diferentes medidas en mm para calcular el IFC. PODe = proyección ortogonal de distancia de la punta del pie intervenido al pie sano. PODn = proyección ortogonal de distancia de la punta del pie sano al pie intervenido. LHe = longitud de la huella del pie intervenido. LHn = longitud de la huella del pie sano. D1'5e = distancia entre dedos I-V del pie intervenido. D1'5n = distancia entre dedos I-V del pie sano. D2'4e = distancia entre dedos II-IV intervenido. D2'4n = distancia entre dedos II-IV sano. IFC = Índice funcional del ciático. Sem. = semanas.

FIGURA 15. VALOR MEDIO DEL IFC

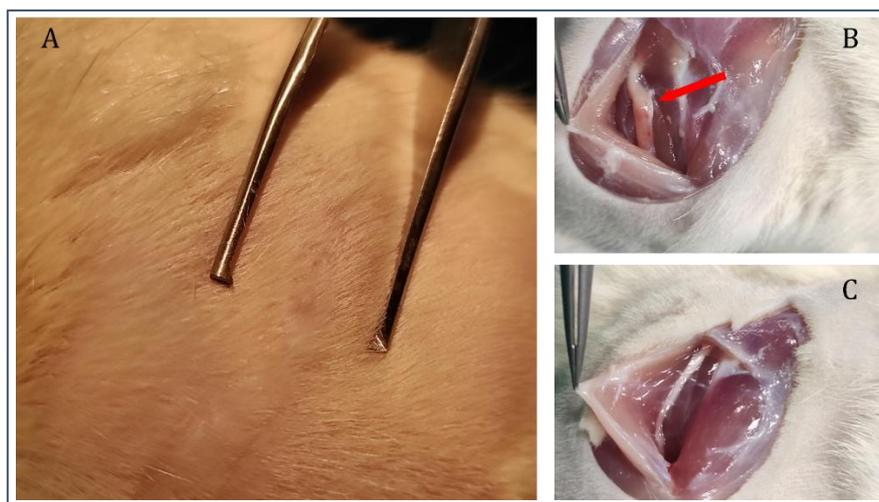


Valor medio del IFC de cada grupo en cada mes con su desviación estándar.

8.3. Final de estudio y hallazgos macroscópicos

Durante la necropsia de los animales para la obtención de las muestras de tejido nervioso, no se observó ninguna alteración del tejido internamente. La cicatriz de la incisión presentaba normalidad anatómica y funcional (Figura 16A), y no se observaron adherencias en la zona intervenida de los animales control (Figura 16 C). En los animales con el implante nervioso se observaron pequeñas adherencias alrededor del mismo (Figuras 16B).

FIGURA 16. HALLAZGOS MACROCÓPICOS

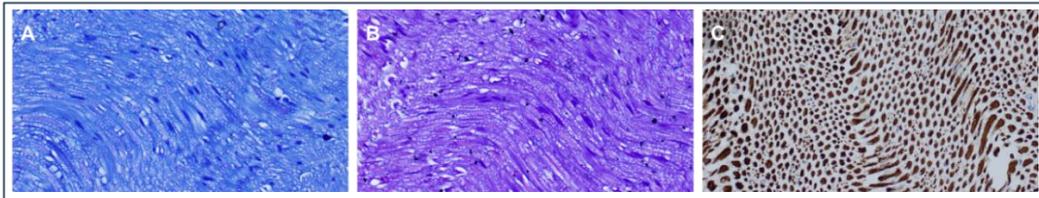


En la imagen A se observa la cicatriz del abordaje en la piel a los 3 meses de la cirugía. La imagen B muestra las adherencias que presentaban los animales con conducto implantado (flecha roja) en el momento de la toma de muestras. En la imagen C observamos la apariencia del nervio de los animales del grupo control al final del estudio.

8.4. Histopatología

Se analizaron cortes histológicos longitudinales de 27 muestras. De cada muestra se estudiaron los cortes con tres distintas tinciones de histoquímica e inmunohistoquímica (azul de toluidina, LFB y neurofilamentos) por parte de un patólogo ajeno al centro y de manera ciega (Figuras 17 y 18).

FIGURA 17. RESULTADOS HISTOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS CONTROL A 40X



A: tinción de azul de toluidina. B: tinción de LFB. C: tinción de inmunohistoquímica con anticuerpo de neurofilamento.

En los animales del grupo control se identificaron a través de las tres tinciones, nervios histológicamente normales constituidos por fibras nerviosas longitudinales y onduladas, que presentaron núcleos alargados. En la periferia de las fibras nerviosas se identificó el perineuro. Sin embargo, las técnicas de azul de toluidina y LFB en el grupo control mostraron una imagen histológica similar, sin aportar información adicional entre ellas. No obstante, en estas dos tinciones en los otros grupos sí que se observan más estructuras diferenciadas entre sí.

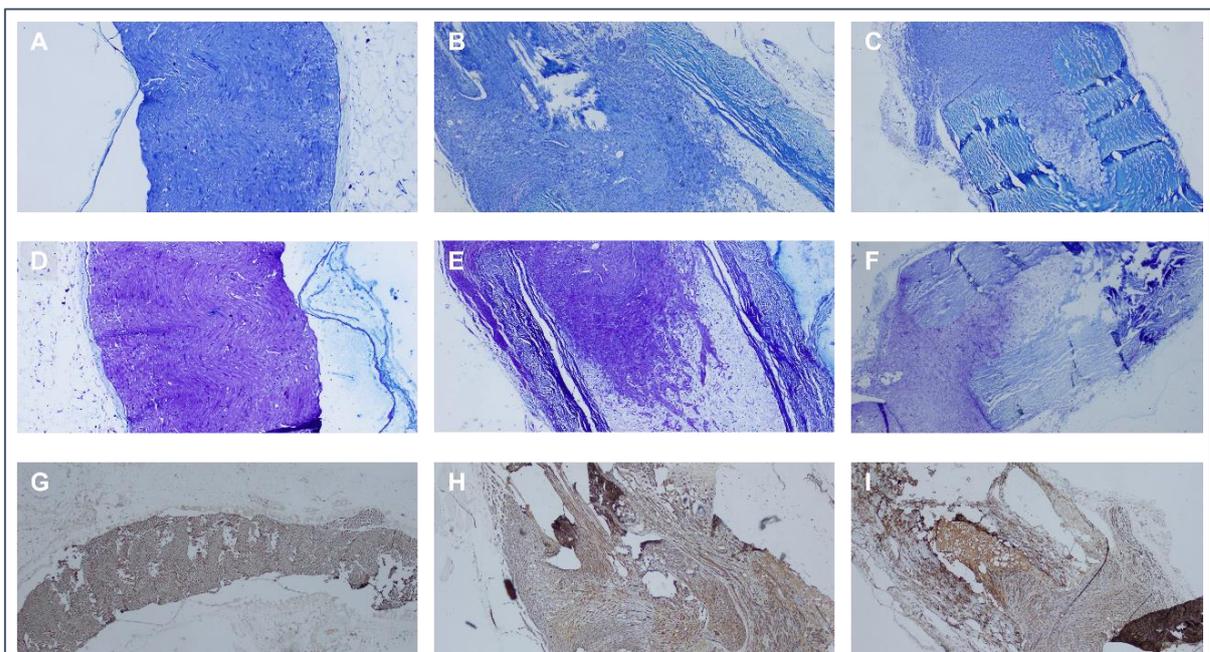
Tres casos del grupo control presentaron los siguientes artefactos histológicos que impidieron la valoración de algunas técnicas concretas:

- En uno de ellos la tinción con LFB no presentó tejido neural valorable.
- En otro ocurrió lo mismo, pero con las tinciones de LFB y neurofilamentos.
- Y en otro de ellos, los cristales de azul de toluidina y LFB no estaban teñidos, valorando este caso únicamente con neurofilamentos.

En las muestras correspondientes a los grupos 2 y 3 teñidas con LFB, lo que se observó fue una sección compuesta por una porción de nervio histológicamente normal, la cual se continuó de manera abrupta por un tejido de colágeno que focalmente engloba parte del nervio, correspondiente al conducto nervioso. A su vez también se identificó en relación con estas zonas, lo que parece corresponder a celularidad inflamatoria (difícilmente valorable por las técnicas empleadas), en mayor cantidad en las muestras correspondientes a los animales del grupo 2. Mediante la tinción con azul de toluidina es posible identificar axones con banda de mielina en la zona proximal, no obstante, su número y grosor es bastante reducido, siendo el grupo con secretoma donde más se evidencia este hallazgo. En

un caso del grupo 2, se observó a nivel histológico únicamente colágeno, sin presencia de tejido nervioso valorable. Este hecho hace sospechar que la regeneración nerviosa en dicho animal fue nula, pero no se puede valorar el motivo al no haber más que el tejido correspondiente al conducto nervioso. Utilizando la inmunohistoquímica se pudo comprobar, de manera más clara, la presencia de axones regenerados a lo largo del conducto en ambos grupos, aunque, al igual que se ha comentado anteriormente con la tinción de azul de toluidina, el número de ellos es bajo en ambos grupos y de poco grosor. Por tanto, a pesar de no haber obtenidos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos donde se ha realizado la neurotomía, sí que se aprecian menos diferencias anatómicas del tipo de tejido neuronal entre el grupo 3 y el grupo 1.

FIGURA 18. TINCIONES HISTOLÓGICAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS



Las tinciones con azul de toluidina se corresponden con las imágenes A, B y C; de los grupos control, conducto y tratamiento respectivamente. Las imágenes D, E y F se corresponden con los grupos control, conducto y tratamiento respectivamente, con la tinción LFB. El resto pertenecen a la tinción con neurofilamento: G control, H conducto e I tratamiento.

8.5. RTq-PCR

Mediante PCR se analizó la expresión de genes relacionados con: apoptosis/necrosis, estrés oxidativo, inflamación y angiogénesis en un total de 12 individuos (grupo control n=4, grupo conducto n=4, y grupo tratamiento n=4) y un total de 13 genes. Como se puede observar en la figura 18, únicamente se encuentran sobre expresados los genes *Casp3*, *Il1b*, *Il6*, y *Tnf* en los grupos conducto y tratamiento con respecto al control. Realizando la ANOVA de Kruskal-Wallis se observan diferencias

estadísticamente significativas en la expresión génica de *Bcl2* y *Sod1*, siendo para ambos el (p -valor = 0,024). Los p -valor obtenidos para los genes *Fgf2* y *Vegfa* fue (0,050), muy próximo a ser significativo.

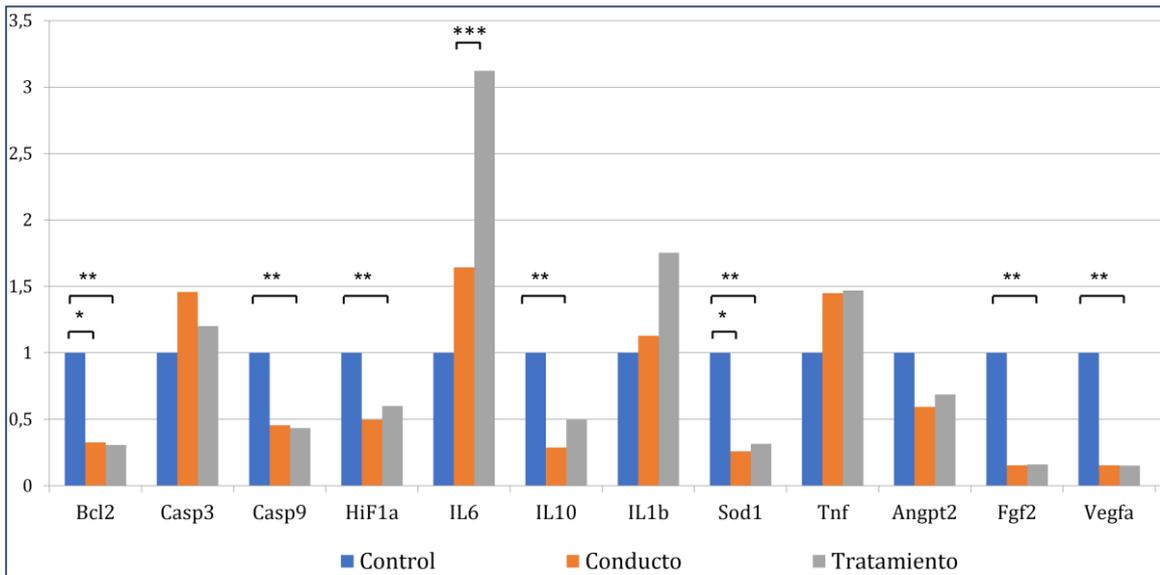
La expresión de los genes relacionados con la apoptosis/necrosis, *Bcl2* y *Casp9*, en los grupos conducto y tratamiento fue menor que en el control. Aplicando la prueba U de Mann-Whitney, se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratamiento para ambos genes (p -valor = 0,021 y 0,021), y en el grupo conducto para el gen *Bcl2* (p -valor = 0,021), comparando ambos con el grupo control, pero no entre ellos. Sin embargo, el gen *Casp3* estaba sobre expresado en ambos, siendo en el grupo conducto donde mayor expresión había, sin llegar a expresar diferencias significativas.

En cuanto a los genes relacionados con el estrés oxidativo, *Hif1a* y *Sod1*, presentaron una expresión génica inferior en los grupos conducto y tratamiento, siendo únicamente la expresión de *Hif1a* estadísticamente significativa en el grupo tratamiento frente al grupo control (p -valor=0,021). El gen *Sod1* presentó diferencias significativas tanto en los grupos tratamiento como conducto frente al control (p -valor=0,021 para ambos grupos). Entre los grupos conducto y tratamiento no se observaron diferencias.

Como se ha mencionado anteriormente, se observó una sobre expresión en los genes que determinan la inflamación (*Il1b*, *Il6* y *Tnf*) en los grupos 2 y 3 y comparando la expresión de ellos entre un grupo y otro se observó que la expresión de *Il6* era significativamente mayor en el grupo tratamiento (p -valor=0,021). Comparando la expresión entre los grupos en los que se practicó la neurorrafia y el control no hubo diferencias significativas. En cuanto al gen *Il10*, se observó una expresión inferior en las muestras de los grupos 2 y 3 frente al control, habiendo diferencias significativas entre el grupo 3 y el 1 (p -valor=0,034).

Finalmente, cuando se comparó la expresión de los genes relacionados con la angiogénesis (*Angpt2*, *Fgf2* y *Vegfa*), todos presentaron una expresión inferior en los grupos tratamiento y conducto nervioso, con respecto al grupo control. Los genes *Fgf2* y *Vegfa* presentaron un (p -valor=0,034) en los grupos 2 y 3 para ambos genes cuando se compararon con el grupo control.

FIGURA 19. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS MUESTRAS



Expresión de los diferentes genes utilizados en este estudio tras la aplicación del método de fluorescencia utilizando la expresión de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con *Gusb* como gen de referencia y las diferencias estadísticamente significativas para un (p -valor $<0,05$). (*) Diferencias entre el grupo 2 y grupo 1. (**) Diferencias entre el grupo 3 y el grupo 1. (***) Diferencias entre el grupo 3 y el grupo 2.

9. DISCUSIÓN

La elección del modelo animal específico es fundamental para el diseño de un estudio experimental (18). Los criterios de selección del modelo animal deben incluir: la disponibilidad, la tolerancia al cautiverio, la facilidad de manejo y alojamiento, el coste de adquirir y cuidar a los animales, así como la aceptabilidad para la sociedad (160). Los modelos de animal grande presentan algunos inconvenientes con respecto a los pequeños animales de laboratorio como son el manejo y el coste (209). Debido a su tamaño es necesario disponer de unas instalaciones donde puedan alojarse cumpliendo con los requisitos que marca la ley de bienestar animal (R.D. 53/2013), lo que requiere de una infraestructura grande. El quirófano experimental debe contar con un equipamiento más especializado, mesa de cirugía, máquina de anestesia, así como tener unas dimensiones que permitan trabajar. Por último, a estos factores hay que sumarle que el coste de los animales y su mantenimiento es mayor, y que es necesario más de una persona para manejarlos. No obstante, al igual que mencionaron *Talac y colaboradores*, ningún modelo animal sería apropiado para todos los fines, ni se podría rechazar un modelo por ser inapropiado para todos los fines (210).

El modelo de neurotomía del nervio ciático en animal experimental murino se lleva estudiando desde hace muchas décadas y es sin duda el más utilizado para la investigación básica (18,20,183). A pesar de que la rata representa el modelo de elección, no hay que descartar otros como el ratón o el conejo, ya que son apropiados para estudios en los que se buscan objetivos específicos. Por ejemplo, el uso de ratones debido a su disponibilidad como animales manipulados genéticamente (211–214) o el conejo para estudios de implantes que son demasiado largos en los que se aborda un gran *gap* nervioso ($>1,5$ cm) (215–217). Por otra parte, algunos autores como *Vasudevan y colaboradores* han descrito un modelo de *gap* largo en rata, demostrando la posibilidad y viabilidad de este modelo (218). De esta manera el enfoque que dan permite superar la limitación de tamaño del animal pequeño y además aprovecha las características ventajosas de la rata como modelo de elección para los estudios preliminares de los nervios (218). En nuestro estudio, el ratón se descartó como modelo debido a su pequeño tamaño y mayor dificultad para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico. A pesar de que el conejo es mejor candidato para estudios de *gaps* que la rata, en el caso de la regeneración del nervio ciático la rata es la mejor opción, y además la longitud de la brecha entraba dentro de los límites que permite estudiarse en esta especie (20). Por ello, para el desarrollo de este trabajo se ha decidido utilizar el modelo de animal pequeño frente al grande, y en concreto la rata.

En cuanto a la reproductibilidad del modelo experimental empleado en este estudio, se trata de un modelo animal contrastado, asequible y fiable, tras la revisión realizada, ya que es el modelo por excelencia para estudios de regeneración nerviosa (20). Como ya se ha ido comentando a lo largo de este trabajo, es el modelo más utilizado para la investigación de la regeneración nerviosa.

Centrándonos en el procedimiento quirúrgico, en primer lugar, el método anestésico es un factor a tener en cuenta. La anestesia inhalatoria es muy ventajosa ya que tanto la inducción como la recuperación de los animales es más rápida, no obstante, la inyección intraperitoneal es la más utilizada (219). Posiblemente se deba a que la anestesia con agentes gaseosos es mucho más costosa y requiere de mayor preparación, pero también es más segura, puesto que hay un mayor control sobre los parámetros hemodinámicos y ventilatorios de los animales (220). Como ya se ha mencionado, la mayoría de los autores utiliza un coctel de medicamentos que se inyecta vía intraperitoneal o intramuscular, ya que la intubación para la vía inhalatoria de los animales de laboratorio pequeños es muy compleja y requiere de mucha destreza (221). No obstante, no es necesario intubar a los animales si se utiliza una mascarilla, y para este trabajo hemos elegido una anestesia inhalatoria utilizando dicha mascarilla.

La coaptación de los nervios suele realizarse mediante microsutura utilizando un monofilamento de entre 8/0 hasta 12-0, siendo el 10-0 la más utilizada (20), como en este estudio que el procedimiento quirúrgico se llevó a cabo con nylon 10/0. Algunos autores aseguran que es posible reducir el número de puntos de sutura usando pegamento tisular para unir los bordes del nervio, obteniendo resultados similares a la sutura (74,75,222,223). Actualmente, los pegamentos de fibrina son la alternativa principal a la sutura para coaptaciones de reparación nerviosa, ya que poseen menor reacción a cuerpo extraño que los cianoacrilatos. Las principales diferencias entre los adhesivos y la sutura son: la fuerza tensil, la dehiscencia, las funciones musculares y electrofisiológicas, e incluso en la apariencia histomorfométrica. Debido a estas diferencias, para este estudio se ha seleccionado la microsutura con nylon 10/0, con el objeto de evitar posibles problemas con la dehiscencia y asegurar la coaptación de los muñones a los extremos del conducto nervioso. En sus trabajos, *Cruz y colaboradores*, comentan una dehiscencia del 80% en secciones del nervio ciático de rata reparados con pegamento de fibrina (224) y *Sames y colaboradores* afirman en un estudio que un 20% de los conejos fracasaron en el mantenimiento de la coaptación (225). En este sentido *Moy y colaboradores* sostienen que las reparaciones nerviosas con adhesivos son más rápidas, reduciendo por tanto los tiempos quirúrgicos, pero comparados con la microsutura la efectividad es menor para mantener los

bordes unidos (226). Es por estos autores con sus trabajos que hemos elegido utilizar para nuestro estudio la neurorrafia con sutura en lugar de pegamentos, a pesar de alargar los tiempos quirúrgicos. Sin embargo, no hay que descartar que con el avance de la ciencia llegue un día en el que se consigan suplir estas carencias de los pegamentos tisulares actuales.

En cuanto a los tiempos quirúrgicos que se han evaluado, se han medido tanto el tiempo total de la cirugía, como el de la colocación del implante. Las variaciones en este último punto van desde los 37 minutos hasta los 15 minutos. Estas diferencias se deben a la capacidad de mejora del cirujano conforme avanza en las cirugías, ya que no es lo mismo realizar una cirugía en un momento determinado, que una serie de éstas. En este último caso, la curva de aprendizaje o destreza va aumentando, por lo que el tiempo que se necesita invertir para realizar la tarea disminuye (227).

Las automutilaciones de los animales tras una resección del nervio son muy comunes, sobre todo en ratas, siendo uno de los mayores inconvenientes de este modelo animal (228). *Kaupila* en uno de sus trabajos expone que suturando el nervio dañado se reduce la autotomía o automutilación en las ratas (229). Este autor describe que existe reducción, no que desaparezca este síntoma, pues este problema sigue presente en los estudios recientes como describen *Xu y colaboradores* en uno de sus trabajos donde evaluaron la automutilación hasta las 12 semanas de estudio (228). El porcentaje de automutilaciones de las ratas Wistar en estos estudios fue incrementándose, llegando a un porcentaje del 85,7% al final del estudio, mientras que, en nuestro caso, el porcentaje de automutilaciones fue del 55,56% en los animales en los que se realizó la neurotomía. En un estudio se compara el ratio de automutilaciones comparando hembras y machos de la raza Sprague-Dawley (230). En su trabajo concluye que las hembras son menos propensas a mutilarse que los machos. También analizan los porcentajes de amputaciones entre diferentes trabajos donde se estudiaba el IFC en diferentes razas de rata. Los porcentajes de amputación oscilaron entre el 0 y el 71 %, siendo la raza Lewis la que menor ratio de amputaciones presenta (230). Los animales del grupo control no presentaron ningún tipo de mutilación en las patas. Por otro lado, uno de los animales presentó una úlcera en la pata derecha, posiblemente debido a un mal apoyo constante provocado por la insensibilidad del miembro.

Otro dato que apreciamos en nuestros animales fue la aparición de úlceras en las zonas donde se aplicó la antibioterapia con enrofloxacin vía SC, posiblemente debida a autolesiones por molestia en la zona de inyección. El fabricante de este medicamento

(Baytril, Bayer e Informed Data Systems Inc., Alemania) indica que el uso de este tipo de vía puede provocar reacciones inflamatorias e irritación en perros. Este dato es importante ya que puede suponer un foco de infección, dolor y malestar, pudiendo provocar una alteración, por ejemplo, en los resultados derivados del estudio de la marcha. Además, se ha encontrado un trabajo donde se expone que la eliminación del enrofloxacin en ratas tiene propiedades farmacocinéticas no lineales con dosis altas, por lo que hay que considerar que estas dosis altas pueden provocar efectos adversos (231).

Cuando el nervio es seccionado, los músculos dejan de estar inervados, perdiendo masa por falta de actividad y la autofagia (232). Este hecho podría justificar la pérdida de peso que observamos en los animales de los grupos 2 y 3 de nuestro estudio tras la intervención quirúrgica. A pesar de que en el grupo 1 no se ha seccionado el nervio, también se observa una pérdida de peso, siendo menor que en los otros dos grupos. La causa de esta leve pérdida de peso se puede deber a que los animales han sido sometidos a una cirugía y al estrés ocasionado por la manipulación previa y posterior (233). No obstante, *Fitton y colaboradores* han tratado de reducir esta pérdida utilizando clenbuterol con unos resultados prometedores (234), pero al ser justificada esta pérdida de peso, el hecho de añadir otra variable al estudio podría suponer una lectura de los resultados errónea.

En cuanto a los tratamientos empleados en reparación de brechas, los conductos nerviosos y los injertos descelularizados (18,235) se están estudiando como posibles sustitutos a los autoinjertos. Dado que el uso de autoinjertos conlleva a una morbilidad de la zona donante, nos planteamos investigar sobre el uso combinado de conducto nervioso ya testado con terapia coadyuvante. Para nuestro estudio hemos seleccionado un implante aprobado por la FDA (NeuraGen®) compuesto por colágeno tipo I. *Di Summa y colaboradores* describen en sus trabajos que los conductos a base de colágeno son de los más versátiles y efectivos para la regeneración nerviosa, aunque sugieren modificaciones en su composición que permitan la adhesión de células con propiedades terapéuticas (236). Según estos autores habría que considerar el uso de múltiples enfoques que garanticen el mejor diseño de conducto que combine las propiedades mecánicas ideales con el rendimiento óptimo celular (236). El principal objetivo de la futura investigación sobre estas alternativas al autoinjerto es hacerlos funcionales, mediante la incorporación de células madre, factores neurotróficos y fármacos (69). De ahí que en nuestro estudio veamos importante la incorporación de un grupo en el que se combinen varias alternativas terapéuticas como el conducto con Sec-CMMAd. En un estudio recientemente publicado, se utiliza secretoma de CMM, procedentes de mucosa olfatoria, en un conducto sintético a base de quitosano en un modelo de defecto nervioso en rata (237). En este trabajo se comparan

varios grupos en un periodo de tiempo de 20 semanas, utilizando en comparando los diferentes grupos con conducto y secretoma con una neurografía directa.

El uso de la terapia celular como método coadyuvante a la regeneración nerviosa se estudia desde finales de los 90. En estos 30 años ha evolucionado mucho desde el uso de las propias CMM, hasta los derivados secretados por estas. Para el desarrollo de este trabajo se ha optado por el uso de Sec-CMMAd de rata. Desafortunadamente, en este trabajo no se han conseguido resultados que demuestren que su uso mejora la capacidad regenerativa de los nervios. Se han realizado numerosos estudios utilizando diferentes poblaciones de CMM en conductos nerviosos (células Schwann, CMM de tejido adiposo y CMM de médula ósea) en los que, el uso combinado de células y NeuraGen® favorece significativamente la infiltración de células de Schwann en el muñón distal comparado con el conducto vacío. (236).

Como todo tratamiento, el uso de terapia celular tiene sus inconvenientes. En el caso de la administración de células autólogas, sería necesario: una primera intervención para obtenerlas, esperar un tiempo mínimo de unas 2 semanas para poder cultivarlas y expandirlas (y otras 2 semanas si queremos diferenciarlas *in vitro*), y finalmente reintervenir al paciente para aplicarlas (236). Por otro lado, si son alogénicas, es posible que al paciente se le someta a una terapia de inmunosupresión para evitar rechazo (238). Por tanto, las opciones implican inmunosupresión o esperar un tiempo que puede significar la posible no regeneración nerviosa. Los secretomas derivados de las CMM por su parte permiten su aplicación inmediata, ya que pueden obtenerse de CMM alogénicas sin el inconveniente de la reacción inmunológica (239,240). De ahí que se haya optado por esta terapia para estudiar su eficacia. Sin embargo, hemos descubierto tras la realización del estudio que la conservación del secretoma podría no haber sido la adecuada. Varios estudios han sugerido que el modo de conservación ideal para que el secretoma mantenga todas sus propiedades es almacenarlos a -80 °C en viales de vidrio (241-246). En nuestro caso esta conservación se realizó en criotubos de plástico y a -20 °C, como venía haciendo previamente la unidad de terapia celular del CCMIJU (247). Este hecho podría justificar que los resultados obtenidos no sean tan beneficiosos como los que cabría esperar, como sí ha ocurrido en el trabajo de *Alvites y colaboradores* (237). Otros factores que pueden influir significativamente son la concentración del secretoma, el método de aplicación y el tiempo de almacenado. Para nuestro trabajo el secretoma se conservó almacenado durante varios meses, pudiendo ser uno de los motivos que hayan repercutido en los resultados.

Respecto a los seguimientos, la evaluación de los resultados de los parámetros funcionales es posiblemente la parte más importante en los ensayos preclínicos. En este

punto encontramos que actualmente la mayoría de los métodos para medir dicha recuperación tienen un grado de variabilidad muy alto y, por tanto, la interpretación de los resultados está limitada (183). El cálculo del índice funcional del nervio ciático es sin duda la prueba que más se utiliza para evaluar la recuperación de la funcionalidad motora (248). Según *De Leonibus y colaboradores* este índice debe medirse a partir de la segunda semana tras la cirugía hasta la semana 26 (249). Algunos trabajos realizan un seguimiento a corto plazo. Nosotros lo hemos establecido en 12 semanas, tiempo que se estima suficiente para observar regeneración. Otros autores han seleccionado tiempos más largos para estudiar el tipo de regeneración, como *Giusti y colaboradores*, que establecieron dos periodos de estudio, a las 12 y a las 16 semanas (250). En nuestro estudio hemos observado la falta de recuperación de la movilidad y funcionalidad de los animales en los que se ha seccionado el nervio. Mediante el análisis de la marcha mediante el IFC, se ha comprobado que no ha habido mejora funcional de miembros afectados. Sí se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3, pero no entre estos dos últimos. Algunos autores cuestionan la fiabilidad y reproductibilidad de esta prueba y medida del IFC, pues se trata de una valoración subjetiva, lo que supone un riesgo de sesgo en función del investigador o examinador que evalúe dichos resultados (163,251). Es posible que sea necesario más tiempo para poder observar estos cambios en nuestros animales tal como sugiere *De Leonibus y colaboradores* que podría retrasarse la regeneración hasta las 26 semanas (249). Por ejemplo, en el trabajo de *Alvites y colaboradores*, que es a 20 semanas observan diferencias significativas en su modelo (237).

En cuanto al estudio histológico, la técnica utilizada en este trabajo ha sido mediante cortes longitudinales del nervio con la intención de estudiar su capacidad regenerativa, al igual que en el estudio de *Lasso y colaboradores* (103). No obstante, los resultados obtenidos no muestran este hecho, ya que no se ha conseguido una tinción clara en los grupos donde se ha realizado la sección del nervio. Esto no indica que el corte longitudinal no sea de utilidad, ya que es posible que en los cortes de las muestras no se haya alcanzado la profundidad suficiente como para llegar a los muñones en regeneración. Por otro lado, algunos autores realizan cortes sagitales a distintas alturas del corte como es el trabajo de *Lasso y colaboradores* (103). Las tinciones que se eligieron para este estudio fueron azul de toluidina, LFB y la inmunohistoquímica con neurofilamento. Según *Carriel y colaboradores* estas tinciones son las idóneas para comprobar la remielinización de los axones en regeneración (203). Sin embargo, es verdad que otras tinciones también podrían ser útiles para poder evaluar la reacción inflamatoria como la de hematoxilina y eosina o el tricrómico de Masson (203). El uso de un CN supone un cuerpo extraño para el organismo, por lo que

la reacción inflamatoria es una respuesta muy común, no suponiendo un problema siempre que la reacción no sea excesiva (252). De ser así, esta reacción podría ocasionar el fracaso de la intervención como ya ha ocurrido en algún caso clínico (253).

Al igual que *Reid y colaboradores*, en este estudio hemos evaluado la expresión de genes de apoptosis *Bcl2* y *Casp3* y además el gen de *Casp9* (118). El gen *Bcl2* tiene la función de favorecer la supervivencia de las células por lo que, si se encuentra sobre expresado, va a favorecer que no se produzca apoptosis en las células del medio circundante, en nuestro caso se encontraba menos expresado en los grupos 2 y 3 comparados con el grupo 1. En un estudio realizado por *Olivé y Ferrer*, analizaron la expresión de *Bax* y *Bcl2* a nivel muscular en un modelo de rata de denervación y reinervación, en el que los niveles de este último gen no aumentaron, a diferencia de *Bax* (254). En otro estudio reciente de un modelo de músculo denervado, sugiere que la inducción de la apoptosis por TNF- α ocurre por una vía independiente de la mitocondria, ya que los niveles de *Bax* y *Bcl2* no cambiaron (255). *Liu y colaboradores*, también estudiaron los niveles de expresión de *Bcl2* y *Bax* en un modelo de LNP por aplastamiento y a las 24h. En su trabajo compararon un grupo aplicando exosomas derivados de CMMAd y observaron que su aplicación aumentaba los niveles de *Bcl2* y disminuían los de *Bax* (256). Teniendo en cuenta la gran diferencia de tiempo que existe entre su trabajo y el nuestro, es difícil comparar ambos resultados. Por su parte, el gen *Casp3* es proapoptótico y su sobre expresión indica que se está procediendo a la degeneración controlada de las células, que es lo que se observó en nuestros resultados. En el trabajo de *Rbia y colaboradores* la expresión de *Casp3* se vio aumentada, a diferencia de lo que se esperaba, pues la supervivencia de las células dentro del conducto comienza a disminuir a las 4 semanas (257). En nuestro caso se observa que el aumento de *Casp3* es menor en el grupo con secretoma comparado con el grupo que lleva únicamente el CN. No obstante, se ha demostrado en el estudio de *Kingham y colaboradores* que utilizando células estimuladas para rellenar los conductos nerviosos los niveles de *Casp3* se reducían significativamente, mientras que las CMM no estimuladas no tenían un efecto significativo (258). En un trabajo de *Yan y colaboradores* se utilizó el gen *Casp9*, entre otros, para evaluar la actividad proapoptótica. A pesar de no estar muy relacionado con nuestro estudio, pues compara la supervivencia celular en dos medios de cultivo, sí que coincide con que los niveles de este gen se encuentren disminuidos a los 90 días (259). Se hace necesario el estudio de este gen en modelos de regeneración nerviosa, para poder comparar los resultados que van surgiendo a lo largo de las investigaciones.

Los genes relacionados con angiogénesis que hemos estudiado en este trabajo han sido *Fgf2*, *Vegfa* y *Angpt2*. No se ha encontrado bibliografía sobre el estudio de *Angpt2* para

la regeneración nerviosa, pero sí en estudios de ratones diabéticos como el del *Liu y colaboradores* donde este gen se utilizó junto con *Vegfa*, entre otros, para determinar la angiogénesis, mostrando una expresión mayor en ratones jóvenes que en adultos a corto plazo (260). A pesar de que este trabajo haga referencia a la capacidad de angiogénesis sobre la curación de heridas, se ha demostrado que estos genes están relacionados también con la regeneración nerviosa (261,262). En nuestro caso, la expresión de los genes *Vegfa* y *Angpt2* en los grupos del conducto nervioso y tratamiento fue inferior al grupo control. Los factores de crecimiento VEGF y FGF son conocidos porque están involucrados en la regeneración de varios órganos y tejidos incluido el sistema nervioso periférico (261,263). Se han estudiado en ensayos preclínicos de regeneración nerviosa recientes como el de *Masgutov y colaboradores*, donde se inoculaba una construcción plasmídica modificada de dos casetes (pBud-coVEGF165-coFGF2) que aumenta la expresión de ambos genes para promover la angiogénesis y regenerar el nervio. Demostraron que este plásmido no es inmunogénico y que los niveles de expresión génica aumentados de *Vegfa* y *Fgf2* implican una situación que favorece la regeneración (263). Nuestros resultados, por el contrario, mostraron una expresión menor de ambos genes en los grupos 2 y 3 comparados con el control. *Grothe y colaboradores* realizaron otro estudio estudiando el gen *Fgf2*, con un tiempo final de estudio a los 28 días y, aunque sigue siendo lejos de los tres meses de nuestro estudio, se observó un aumento de expresión al poco tiempo de la cirugía y un descenso al final del estudio (264), coincidiendo con nuestros resultados en los que los valores de expresión de este gen eran bajos en los dos grupos comprándolos con los valores del grupo control.

Los genes *Hif1a* y *Sod1* se estudiaron con el fin de conocer los niveles de estrés oxidativo y al final de nuestro estudio ambos tenían en los grupos 2 y 3 una expresión inferior al grupo control. En el trabajo de *Cho y colaboradores* se demuestra que VEGF es un factor de crecimiento dependiente de *Hif1a*. Además un gen diana de *Hif1a* es *Vegfa*, y se expresa en las neuronas lesionadas y contribuye a estimular la regeneración de los axones (265). En su estudio *in vivo*, estudiando la expresión del gen *Hif1a* en un modelo de ratón sobre nervios que han sufrido aplastamiento, se observó que a los 3 días los niveles de dicho gen eran bajos o ausentes, concluyendo que este gen contribuye a la regeneración nerviosa (265). Esto coincide con nuestros resultados, aunque nosotros lo medimos a los 90 días, ya que observamos una expresión baja de este gen y una vaga regeneración del nervio. Por su parte el gen *Sod1* se ha estudiado en ratones de enfermedad de neurona motora (266). El tiempo de estudio fue de 60 días y ya se observó un descenso en la expresión de *Sod1* y un aumento en *Casp3* lo que sugería el inicio de la muerte celular de las células de Schwann

que estaban tratando de reconectar los bordes nerviosos. Estos resultados coinciden con los que hemos obtenido nosotros a las 12 semanas de estudio.

Tnf, *Il1b*, *Il6*, y *Il10* fueron los genes estudiados para evaluar el nivel de reacción inflamatoria. En el estudio de *Bizette y colaboradores* estudiaron la expresión de *Il1b*, *Il6* y *Tnf* determinando que la expresión de citoquinas proinflamatorias en especial la *Il6* juegan un gran papel promoviendo la regeneración axonal (267). La expresión de los tres genes se encontraba aumentada en los grupos 2 y 3 de nuestro estudio con diferencias estadísticamente significativas. El gen de la *Il10* ha sido estudiado en ensayo preclínicos de lesión de médula espinal como el realizado por *Kuo y colaboradores* en el que tras 14 días la expresión génica de *Il10* se reducía (268). En nuestro trabajo también se encontraba disminuida su expresión.

9.1. Limitaciones del estudio

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y tras revisar una extensa bibliografía, se observa que dentro de las limitaciones de nuestro estudio está el uso de animales relativamente jóvenes, ya que su capacidad regenerativa es mayor. Según *Haines* la esperanza de vida de las ratas, de laboratorio y domésticas, es de entre 2,5 y 3 años, aunque hay evidencia de que podrían llegar a los cuatro o más años (269). Por lo tanto, los resultados obtenidos en animales jóvenes no se corresponden con los que se obtendrán en humanos, debido a que se encuentran en edad de desarrollo.

El tamaño muestral es algo limitado, ya que lo ideal sería contar con un mayor número de animales que permita poder realizar pruebas paramétricas, en lugar de no paramétricas, en busca de resultados estadísticamente significativos entre los grupos, así como aumentar el número de grupos para poder comparar mejor las diferentes variables. En este estudio hemos contado con 3 grupos (control, conducto vacío y conducto con secretoma) de 9 animales cada uno, comparado con otros autores que en su trabajo utilizaron 65 individuos en 3 grupos de estudio (250).

De cara a futuros estudios, se plantea la inclusión de más grupos como, por ejemplo: uno con la implantación de un conducto sin realizar neurotomía, nos permitiría estudiar la reacción que este implante provoca de por sí. Otro grupo en el que se realice una neurorrafia T-T para tener un control positivo de regeneración nerviosa y otro con un autoinjerto de 10 mm poder compararlo con los conductos nerviosos. Todos ellos pueden aportar datos que solventen las áreas que todavía siguen quedando pendientes de resolver.

Además, otro factor importante que podría arrojar más luz a este tipo de estudios, puesto que es lo que ocurre en la práctica clínica, es el hecho de realizar las cirugías de reparación en 2 tiempos, es decir, realizar la neurotomía en un primer momento, para después intervenir el nervio al cabo de unos días o semanas. *Wu y colaboradores* realizaron un estudio parecido, en el que demostraron que, tras la avulsión de una raíz motora de la médula, esta podía regenerar un nervio periférico incluso si se reparaba la avulsión hasta 3 semanas después (270). De este modo se comprobó que la capacidad regenerativa no dependía únicamente de ser reparada la avulsión inmediatamente, aunque sí que se observó que cuanto antes se realizase mayor cantidad de neuronas sobrevivirían.

El hecho de tener un único tiempo de final de estudio limita los resultados del estudio, ya que se ha podido perder información en el tiempo previo a la toma de muestras. Esto se podría resolver añadiendo más animales a cada grupo y realizando fines de estudio en diferentes momentos. Dato interesante tanto a nivel histológico para ver la progresión de la regeneración, si la hubiese, como a nivel de expresión génica, ya que algunos genes permanecen en la zona de regeneración un periodo de tiempo determinado. A nivel de genes *Pan y colaboradores* realizaron un ensayo *in vivo* con diferentes tiempos para evaluar la progresión de la degeneración walleriana tras una lesión de nervio (271).

Otra gran limitación del estudio ha sido la falta de pruebas electrofisiológicas en los seguimientos de los animales. Según *Haastert-Talini y colaboradores*, estas pruebas son necesarias para conocer la evolución funcional del nervio (272). El parámetro más estudiado es el potencial de acción muscular compuesto.

10. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en este trabajo mediante el análisis del índice funcional del nervio ciático, indican que la incisión y el abordaje de dicho nervio no afectan a la marcha normal de los animales.

2. La administración del secretoma derivado de células madre mesenquimales de tejido adiposo dentro del conducto nervioso es un método seguro, aunque no parece influir en una mejora de la regeneración nerviosa en el plazo de 3 meses, resultando interesante su estudio a más corto plazo.

3. El método de conservación del secretoma, la concentración y el número de ciclos de congelación-descongelación para su aplicación parecen influir en la capacidad terapéutica de su efecto regenerador.

4. La expresión de genes proinflamatorios se evidencia con el uso de implantes nerviosos tras 3 meses de implantación, por lo que estudios con toma de muestras en periodos de tiempo más tempranos pueden evidenciar el efecto inmunomodulador del secretoma durante la regeneración.

5. Es necesario realizar más estudios preclínicos para evaluar y mejorar la efectividad del tratamiento previo a su utilización en ensayos clínicos, realizando los procedimientos descritos recientemente que podrían suponer la calve de su efecto regenerador, mediante su administración en diferentes tiempos desde la neurorrafia, realizando diferentes tiempos de estudio, y/o utilizando diferentes dosis de este.

11. BIBLIOGRAFÍA / REFERENCIAS

1. Daly WT, Yao L, Abu-rub MT, O'Connell C, Zeugolis DI, Windebank AJ, et al. The effect of intraluminal contact mediated guidance signals on axonal mismatch during peripheral nerve repair. *Biomaterials*. octubre de 2012;33(28):6660-71.
2. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. junio de 2000;23(6):863-73.
3. Robinson LR. traumatic injury to peripheral nerves. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2004;57:173-86.
4. Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, Gelderblom M, Lefering R, TraumaRegister DGU®. Nerve trauma of the lower extremity: evaluation of 60,422 leg injured patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 15 de mayo de 2018;26(1):40.
5. Birch R, Misra P, Stewart MPM, Eardley WGP, Ramasamy A, Brown K, et al. Nerve injuries sustained during warfare: part I-Epidemiology. *J Bone Joint Surg Br*. abril de 2012;94(4):523-8.
6. Siemionow M, Brzezicki G. Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. En: Geuna S, Tos P, Battiston B, editores. *Essays on Peripheral Nerve Repair and Regeneration*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc; 2009. p. 141-72.
7. Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, Lefering R, TraumaRegister DGU. Nerve injury in severe trauma with upper extremity involvement: evaluation of 49,382 patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 10 de septiembre de 2018;26(1):76.
8. Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve*. diciembre de 2006;34(6):785-8.
9. Dvali L, Mackinnon S. The role of microsurgery in nerve repair and nerve grafting. *Hand Clin*. febrero de 2007;23(1):73-81.
10. Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. abril de 1964;33:317-29.
11. Griffin MF, Malahias M, Hindocha S, Wasim S K. Peripheral nerve injury: principles for repair and regeneration. *Open Orthop J*. 2014;8:199-203.
12. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. noviembre de 1992;12(11):4565-74.
13. Yu T, Xu Y, Ahmad MA, Javed R, Hagiwara H, Tian X. Exosomes as a Promising Therapeutic Strategy for Peripheral Nerve Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(12):2141-51.
14. Lopez-Verrilli MA, Court FA. Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Front Physiol*. 2012;3:205.

15. Qing L, Chen H, Tang J, Jia X. Exosomes and Their MicroRNA Cargo: New Players in Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabil Neural Repair*. septiembre de 2018;32(9):765-76.
16. Trzyna A, Banaś-Ząbczyk A. Adipose-Derived Stem Cells Secretome and Its Potential Application in «Stem Cell-Free Therapy». *Biomolecules*. 13 de junio de 2021;11(6):878.
17. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology*. 29 de junio de 2010;8(6):e1000412.
18. Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*. noviembre de 2012;33(32):8034-9.
19. Mohanty CB, Bhat DI, Devi BI. Use of animal models in peripheral nerve surgery and research. *Neurol India*. febrero de 2019;67(Supplement):S100-5.
20. Vela FJ, Martínez-Chacón G, Ballestín A, Campos JL, Sánchez-Margallo FM, Abellán E. Animal models used to study direct peripheral nerve repair: a systematic review. *Neural Regen Res*. marzo de 2020;15(3):491-502.
21. Sanders FK, Young JZ. The degeneration and re-innervation of grafted nerves. *J Anat*. enero de 1942;76(Pt 2):143-166.7.
22. Snell RS. *Clinical Neuroanatomy*. 6ª. USA: Panamericana; 2006. 612 p.
23. Ramon Y Cajal S. Structure and connections of neurons. *Bull Los Angel Neuro Soc*. 1952;17(1-2):5-46.
24. Tessier-Lavigne M, Kolodkin AL. *Neuronal Guidance: The Biology of Brain Wiring (Cold Spring Harbor Perspectives in Biology)*. Primera. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 330 p. (Cold Spring Harbor Perspectives in Biology).
25. Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol*. 5 de julio de 2021;220(7):e202103052.
26. Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. mayo de 2002;132(1):1-15.
27. Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. noviembre de 2010;5(6):933-46.
28. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Sáez J. *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill Interamericana de España; 2002.
29. Barrientos Llosa Z. *Zoología general*. 1ª. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia; 2003. 505 p.
30. Naff NJ, Ecklund JM. History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am*. enero de 2001;12(1):197-+.

31. Artico M, Cervoni L, Nucci F, Giuffré R. Birthday of peripheral nervous system surgery: the contribution of Gabriele Ferrara (1543-1627). *Neurosurgery*. agosto de 1996;39(2):380-2; discussion 382-383.
32. Guthrie GJ. A treatise on gun-shot wounds. London, C Wood. 1827;559.
33. Mitchell SW, Morehouse GR, Keen WW. Gunshot wounds and other injuries of nerves. *Clin Orthop Rel Res*. mayo de 2007;(458):35-9.
34. Socolovsky M, Bortz J. Historia de la Cirugía de los Nervios Perifericos, con Especial Interés en la Influencia que tuvieron los Conflictos Armados. *Rev Argent Neuroc*. diciembre de 2005;19(4):237-42.
35. Waller A. New Method for the Study of the Nervous System. *Lond J Med*. julio de 1852;4(43):609-25.
36. Létiévant JJE. Traite des sections nerveuses : physiologie pathologique, indications, procedes operatoires. En Paris: J.B. Bailliere & Fils; 1873. p. 541.
37. MacKinnon S, Dellon A. *Surgery of the peripheral nerve*. Thieme Medical Publishers. 1988;
38. MacKenzie K. Resection of the sciatic nerve: Neuroplasty, end results, exhibit of case. *Surg Gynecol Obstet*. 1909;9:30.
39. Huber GC. Operative treatment of peripheral nerves after severance, more particularly after loss of substance - A critical review. *J Lab Clin Med*. septiembre de 1917;2:837-48.
40. Stookey B. The futility of bridging nerve defects by means of nerve flaps. *Surg Gynecol Obstet*. diciembre de 1919;29:287-311.
41. Stookey B. Surgical and mechanical treatment of peripheral nerves. En Philadelphia: WB Saunders; 1922. p. 475.
42. Elsberg CA. Technic of nerve suture and nerve grafting. *J Am Med Assoc*. diciembre de 1919;73:1422-7.
43. Ney KW. Technic of nerve surgery. *Ann Surg*. diciembre de 1921;74:37-60.
44. Babcock W. A standard technique for operations on peripheral nerves: With especial reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet*. 1927;45:364.
45. Davis L, Cleveland DA. Experimental studies in nerve transplants. *Ann Surg*. junio de 1934;99:271-83.
46. Dandy WE. A method of restoring nerves requiring resection. *J Am Med Assoc*. agosto de 1943;122:35-6.
47. Delangeniere H. A contribution to the study of surgical repair of peripheral nerves: Based on the three hundred and seventy five cases. *Surg Gynecol Obstet*. 1924;39:543.

48. Woodhall B, Bebe G. Peripheral nerve regeneration: A follow-up study of 3656 World War II injuries. En Whashington DC, US: Government Printing Office; 1956. p. 6.
49. Woodhall B. Peripheral Nerve Injuries .2. Basic Data from the Peripheral Nerve Registry Concerning 7,050 Nerve Sutures and 67 Nerve Grafts. J Neurosurg. 1947;4(2):146-63.
50. Hight WB, Holmes W. Traction injuries to the lateral popliteal nerve and traction injuries to peripheral nerves after suture. Br J Surg. enero de 1943;30(119):212-33.
51. Seddon HJ. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. Br J Surg. octubre de 1947;35(138):151-67.
52. Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain. 1943;66:237-88.
53. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain. diciembre de 1951;74(4):491-516.
54. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. Acta Orthop Scand. abril de 1987;58(2):145-69.
55. Sunderland S. Nerve injuries and their repair. En: The history of nerve repair. Edimburg, Churchill Livingstone; 1991. p. 361.
56. Sunderland S. Observations on the Treatment of Traumatic Injuries of Peripheral Nerves. Br J Surg. 1947;35(137):36-42.
57. Millesi H, Berger A, Meissl G. Interfascicular Nerve-Grafting of Median and Ulnar Nerves. J Bone Joint Surg-Am Vol. 1972;A 54(4):727-.
58. Millesi H, Meissl G, Berger A. Further Experience with Interfascicular Grafting of Median, Ulnar, and Radial Nerves. J Bone Joint Surg-Am Vol. 1976;58(2):209-18.
59. Kline D, Hackett E, May P. Evaluation of Nerve Injuries by Evoked Potentials and Electromyography. J Neurosurg. 1969;31(2):128-.
60. Kline D, Nulsen F. Neuroma in Continuity Its Preoperative and Operative Management. Surg Clin-North Am. 1972;52(5):1189-+.
61. Dailey AT, Tsuruda JS, Filler AG, Maravilla KR, Goodkin R, Kliot M. Magnetic resonance neurography of peripheral nerve degeneration and regeneration. Lancet. 25 de octubre de 1997;350(9086):1221-2.
62. Filler A, Howe F, Hayes C, Kliot M, Winn H, Bell B, et al. Magnetic-Resonance Neurography. Lancet. 13 de marzo de 1993;341(8846):659-61.
63. Filler AG, Kliot M, Howe FA, Hayes CE, Saunders DE, Goodkin R, et al. Application of magnetic resonance neurography in the evaluation of patients with peripheral nerve pathology. J Neurosurg. agosto de 1996;85(2):299-309.
64. Carlstedt T, Noren G. Repair of Ruptured Spinal Nerve Roots in a Brachial-Plexus Lesion - Case-Report. J Neurosurg. abril de 1995;82(4):661-3.

65. Carlstedt T, Grane P, Hallin R, Noren G. Return of Function After Spinal-Cord Implantation of Avulsed Spinal Nerve Roots. *Lancet*. 18 de noviembre de 1995;346(8986):1323-5.
66. Petersen J, Russell L, Andrus K, MacKinnon M, Silver J, Kliot M. Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery*. mayo de 1996;38(5):976-83.
67. Mackinnon S, Dellon A. Clinical Nerve Reconstruction with a Bioabsorbable Polyglycolic Acid Tube. *Plast Reconstr Surg*. marzo de 1990;85(3):419-24.
68. Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics*. 1 de enero de 2017;40(1):e141-56.
69. Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater*. 1 de abril de 2020;106:54-69.
70. de Winter F, Hoyng S, Tannemaat M, Eggers R, Mason M, Malessy M, et al. Gene therapy approaches to enhance regeneration of the injured peripheral nerve. *Eur J Pharmacol*. 5 de noviembre de 2013;719(1-3):145-52.
71. Beris A, Gkiatas I, Gelalis I, Papadopoulos D, Kostas-Agnantis I. Current concepts in peripheral nerve surgery. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. febrero de 2019;29(2):263-9.
72. Isaacs J. Treatment of acute peripheral nerve injuries: current concepts. *J Hand Surg Am*. marzo de 2010;35(3):491-7; quiz 498.
73. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: An experimental study. *Neurol India*. marzo de 2002;50(1):23-6.
74. Wieken K, Angioi-Duprez K, Lim A, Marchal L, Merle M. Nerve anastomosis with glue: comparative histologic study of fibrin and cyanoacrylate glue. *J Reconstr Microsurg*. enero de 2003;19(1):17-20.
75. Félix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AMB. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery*. septiembre de 2013;33(6):468-77.
76. Attar BM, Zalzali H, Razavi M, Ghoreishian M, Rezaei M. Effectiveness of Fibrin Adhesive in Facial Nerve Anastomosis in Dogs Compared With Standard Microsuturing Technique. *J Oral Maxillofac Surg*. octubre de 2012;70(10):2427-32.
77. Adel M, Abdo Elgamal D, Bakry R, Abdelkader M, Elshazly M, Kamel A. Suture versus fibrin glue microneural anastomosis of the femoral nerve in Sprague Dawley rat model. A comparative experimental assessment of the clinical, histological and statistical features. *Acta Chir Plast*. 2017;59(2):65-71.
78. Koopman JE, Duraku LS, de Jong T, de Vries RBM, Michiel Zuidam J, Hundepool CA. A systematic review and meta-analysis on the use of fibrin glue in peripheral nerve repair: Can we just glue it? *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. marzo de 2022;75(3):1018-33.

79. Tsao B, Boulis N, Bethoux F, Murray B. Peripheral nerve trauma. En: Bradley's Neurology in Clinical Practice. 6.^a ed. Philadelphia: Elsevier Academic Press Inc; 2012. p. 984-1002.
80. Ray W, MacKinnon S. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol*. 1 de mayo de 2010;223(1):77-85.
81. Farnebo S, Thorfinn J, Dahlin L. Peripheral nerve injuries of the upper extremity. En: *Plastic surgery: Hand and Upper Extremity*. 3.^a ed. Philadelphia: Elsevier Academic Press Inc; 2013. p. 694-718.
82. Colen KL, Choi M, Chiu DTW. Nerve grafts and conduits. *Plast Reconstr Surg*. diciembre de 2009;124(6 Suppl):e386-94.
83. Terzis JK, Kostopoulos VK. Vascularized nerve grafts and vascularized fascia for upper extremity nerve reconstruction. *Hand (N Y)*. marzo de 2010;5(1):19-30.
84. Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, et al. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*. octubre de 1995;18(10):1128-38.
85. Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int*. 2014;2014:698256.
86. Sachanandani NF, Pothula A, Tung TH. Nerve gaps. *Plast Reconstr Surg*. febrero de 2014;133(2):313-9.
87. Tuttle HK. Exposure of the brachial plexus with nerve-transplantation. *J Am Med Assoc*. diciembre de 1913;61:15-7.
88. Kotani T, Toshima Y, Matsuda H, Suzuki T, Ishizaki Y. [Postoperative results of nerve transposition in brachial plexus injury]. *Seikei Geka*. octubre de 1971;22(11):963-6.
89. Lee SK, Wolfe SW. Nerve transfers for the upper extremity: new horizons in nerve reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg*. agosto de 2012;20(8):506-17.
90. Tung TH, Mackinnon SE. Nerve transfers: indications, techniques, and outcomes. *J Hand Surg Am*. febrero de 2010;35(2):332-41.
91. Wong AH, Pianta TJ, Mastella DJ. Nerve transfers. *Hand Clin*. noviembre de 2012;28(4):571-7.
92. Tos P, Colzani G, Ciclamini D, Titolo P, Pugliese P, Artiano S. Clinical applications of end-to-side neurorrhaphy: an update. *Biomed Res Int*. 2014;2014:646128.
93. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg*. diciembre de 1994;94(7):1038-47.
94. Geuna S, Papalia I, Tos P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: a challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. *Brain Res Rev*. septiembre de 2006;52(2):381-8.

95. Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneux J, Geuna S, et al. Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I-experimental models. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:47-79.
96. Tos P, Artiaco S, Papalia I, Marcoccio I, Geuna S, Battiston B. Chapter 14: End-to-side nerve regeneration: from the laboratory bench to clinical applications. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:281-94.
97. Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* julio de 2007;120(1):215-23.
98. Terzis JK, Tzafetta K. The «babysitter» procedure: minihypoglossal to facial nerve transfer and cross-facial nerve grafting. *Plast Reconstr Surg.* marzo de 2009;123(3):865-76.
99. Davidge KM, Yee A, Moore AM, Mackinnon SE. The Supercharge End-to-Side Anterior Interosseous-to-Ulnar Motor Nerve Transfer for Restoring Intrinsic Function: Clinical Experience. *Plast Reconstr Surg.* septiembre de 2015;136(3):344e-52e.
100. Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg.* marzo de 2013;29(3):149-64.
101. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury.* mayo de 2012;43(5):553-72.
102. Karacaoglu E, Yüksel F, Peker F, Güler MM. Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery.* 2001;21(5):196-201.
103. Lasso JM, Pérez Cano R, Castro Y, Arenas L, García J, Fernández-Santos ME. Xenotransplantation of human adipose-derived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* diciembre de 2015;68(12):e189-197.
104. Chen YS, Chang JY, Cheng CY, Tsai FJ, Yao CH, Liu BS. An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials.* junio de 2005;26(18):3911-8.
105. Patel M, Mao L, Wu B, Vandevord PJ. GDNF-chitosan blended nerve guides: a functional study. *J Tissue Eng Regen Med.* octubre de 2007;1(5):360-7.
106. Uebersax L, Mattotti M, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B, Meinel L. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials.* octubre de 2007;28(30):4449-60.
107. Jiang X, Lim SH, Mao HQ, Chew SY. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp Neurol.* mayo de 2010;223(1):86-101.
108. Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G. Chapter 9: Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:173-98.

109. Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*. agosto de 2000;21(15):1541-7.
110. Stanec S, Stanec Z. Reconstruction of upper-extremity peripheral-nerve injuries with ePTFE conduits. *J Reconstr Microsurg*. mayo de 1998;14(4):227-32.
111. Yan H, Zhang F, Chen MB, Lineaweaver WC. Chapter 10: Conduit luminal additives for peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:199-225.
112. Chan KM, Gordon T, Zochodne DW, Power HA. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *Exp Neurol*. noviembre de 2014;261:826-35.
113. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. junio de 2000;10(3):381-91.
114. Cheng C, Webber CA, Wang J, Xu Y, Martinez JA, Liu WQ, et al. Activated RHOA and peripheral axon regeneration. *Exp Neurol*. agosto de 2008;212(2):358-69.
115. Fujioka T, Fujioka A, Duman RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci*. 14 de enero de 2004;24(2):319-28.
116. Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am*. agosto de 2008;90(8):1644-53.
117. Mohammadi R, Hirsae MA, Amini K. Improvement of functional recovery of transected peripheral nerve by means of artery grafts filled with diclofenac. *Int J Surg*. 2013;11(3):259-64.
118. Reid AJ, Shawcross SG, Hamilton AE, Wiberg M, Terenghi G. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. *Neurosci Res*. octubre de 2009;65(2):148-55.
119. Kostopoulos VK, Davis CL, Terzis JK. Effects of Acetylo-L-Carnitine in End-to-Side Neurorrhaphy: A Pilot Study. *Microsurgery*. 2009;29(6):456-63.
120. Yan Y, Sun HH, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Efficacy of short-term FK506 administration on accelerating nerve regeneration. *Neurorehabil Neural Repair*. agosto de 2012;26(6):570-80.
121. Odaci E, Kaplan S. Chapter 16: Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:317-35.
122. Fleming CE, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin enhances nerve regeneration. *J Neurochem*. octubre de 2007;103(2):831-9.
123. Zuo J, Neubauer D, Graham J, Krekoski CA, Ferguson TA, Muir D. Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Neurol*. julio de 2002;176(1):221-8.

124. Madura T, Kubo T, Tanag M, Matsuda K, Tomita K, Yano K, et al. The Rho-associated kinase inhibitor fasudil hydrochloride enhances neural regeneration after axotomy in the peripheral nervous system. *Plast Reconstr Surg*. febrero de 2007;119(2):526-35.
125. Sharma N, Coughlin L, Porter RG, Tanzer L, Wurster RD, Marzo SJ, et al. Effects of electrical stimulation and gonadal steroids on rat facial nerve regenerative properties. *Restor Neurol Neurosci*. 2009;27(6):633-44.
126. Udina E, Ladak A, Furey M, Brushart T, Tyreman N, Gordon T. Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix promotes peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. mayo de 2010;223(1):143-52.
127. Sun HH, Saheb-Al-Zamani M, Yan Y, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Geldanamycin accelerated peripheral nerve regeneration in comparison to FK-506 in vivo. *Neuroscience*. 25 de octubre de 2012;223:114-23.
128. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. septiembre de 1987;40(9):1256-65.
129. Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther*. agosto de 1997;282(2):1084-93.
130. Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci*. noviembre de 1995;15(11):7509-16.
131. Konofaos P, Terzis JK. FK506 and nerve regeneration: past, present, and future. *J Reconstr Microsurg*. marzo de 2013;29(3):141-8.
132. Tajdaran K, Shoichet MS, Gordon T, Borschel GH. A novel polymeric drug delivery system for localized and sustained release of tacrolimus (FK506). *Biotechnol Bioeng*. septiembre de 2015;112(9):1948-53.
133. Shakhbazau A, Mohanty C, Shcharbin D, Bryszewska M, Caminade AM, Majoral JP, et al. Doxycycline-regulated GDNF expression promotes axonal regeneration and functional recovery in transected peripheral nerve. *J Control Release*. 28 de diciembre de 2013;172(3):841-51.
134. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem Cell Transplantation for Peripheral Nerve Regeneration: Current Options and Opportunities. *Int J Mol Sci*. 5 de enero de 2017;18(1):E94.
135. Terenghi G, Wiberg M, Kingham PJ. Chapter 21: Use of stem cells for improving nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:393-403.
136. Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells*. 26 de enero de 2015;7(1):11-26.
137. Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*. septiembre de 1992;12(9):3310-20.

138. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. agosto de 2004;40(Pt 1):17-24.
139. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. septiembre de 2010;63(9):1544-52.
140. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci*. diciembre de 2001;14(11):1771-6.
141. Hong SQ, Zhang HT, You J, Zhang MY, Cai YQ, Jiang XD, et al. Comparison of transdifferentiated and untransdifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Res*. diciembre de 2011;36(12):2391-400.
142. Chen X, Wang XD, Chen G, Lin WW, Yao J, Gu XS. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into schwann cell-like cells. *Microsurgery*. 2006;26(2):111-5.
143. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25 de agosto de 2006;126(4):663-76.
144. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 6 de noviembre de 1998;282(5391):1145-7.
145. McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci*. 14 de junio de 2006;26(24):6651-60.
146. Paspala SAB, Murthy TVRK, Mahaboob VS, Habeeb MA. Pluripotent stem cells - a review of the current status in neural regeneration. *Neurol India*. agosto de 2011;59(4):558-65.
147. Safford KM, Rice HE. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets*. febrero de 2005;6(1):57-62.
148. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. enero de 2006;206(1):229-37.
149. Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev*. 20 de julio de 2012;21(11):1852-62.
150. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 16 de mayo de 2019;8(5):E467.
151. Mason MRJ, Tannemaat MR, Malessy MJA, Verhaagen J. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr Gene Ther*. abril de 2011;11(2):75-89.

152. Hastie E, Samulski RJ. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success--a personal perspective. *Hum Gene Ther.* mayo de 2015;26(5):257-65.
153. Hoyng SA, de Winter F, Tannemaat MR, Blits B, Malessy MJA, Verhaagen J. Gene therapy and peripheral nerve repair: a perspective. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:32.
154. Shakhbazau A, Mohanty C, Kumar R, Midha R. Sensory recovery after cell therapy in peripheral nerve repair: effects of naïve and skin precursor-derived Schwann cells. *J Neurosurg.* agosto de 2014;121(2):423-31.
155. Gordon T, Brushart TM, Chan KM. Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation. *Neurol Res.* diciembre de 2008;30(10):1012-22.
156. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:445-64.
157. Radtke C, Kocsis JD, Vogt PM. Chapter 22: Transplantation of olfactory ensheathing cells for peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:405-15.
158. Buchthal F, Kühl V. Nerve conduction, tactile sensibility, and the electromyogram after suture or compression of peripheral nerve: a longitudinal study in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mayo de 1979;42(5):436-51.
159. Dolenc V, Janko M. Nerve regeneration following primary repair. *Acta Neurochir (Wien).* 1976;34(1-4):223-34.
160. Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1 de septiembre de 1994;19(17):1998-2006.
161. Toia F, Giesen T, Giovanoli P, Calcagni M. A systematic review of animal models for experimental neuroma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* octubre de 2015;68(10):1447-63.
162. Griffin JW, Pan B, Polley MA, Hoffman PN, Farah MH. Measuring nerve regeneration in the mouse. *Exp Neurol.* mayo de 2010;223(1):60-71.
163. Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res.* marzo de 2004;26(2):186-94.
164. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol.* agosto de 2008;212(2):370-6.
165. Kemp SWP, Walsh SK, Midha R. Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. *Neurol Res.* diciembre de 2008;30(10):1030-8.
166. Khuong HT, Midha R. Advances in nerve repair. *Curr Neurol Neurosci Rep.* enero de 2013;13(1):322.

167. Gordon T, English AW. Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *Eur J Neurosci.* febrero de 2016;43(3):336-50.
168. Chang CJ, Hsu SH, Yen HJ, Chang H, Hsu SK. Effects of unidirectional permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits on peripheral nerve regeneration: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* octubre de 2007;83(1):206-15.
169. Temple CLF, Ross DC, Dunning CE, Johnson JA. Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques. *J Reconstr Microsurg.* noviembre de 2004;20(8):645-50.
170. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg.* junio de 2011;127(6):2381-90.
171. Bittner GD, Schallert T, Peduzzi JD. Degeneration, trophic interactions, and repair of severed axons: A reconsideration of some common assumptions. *Neuroscientist.* abril de 2000;6(2):88-109.
172. Bittner GD, Sengelaub DR, Trevino RC, Peduzzi JD, Mikesch M, Ghergherehchi CL, et al. The curious ability of polyethylene glycol fusion technologies to restore lost behaviors after nerve severance. *J Neurosci Res.* marzo de 2016;94(3):207-30.
173. Williams HB. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery.* 1996;17(11):589-96.
174. Mohanty CB, Bhat D, Devi BI. Role of Central Plasticity in the Outcome of Peripheral Nerve Regeneration. *Neurosurgery.* septiembre de 2015;77(3):418-23.
175. Mohanty CB, Midha R. Nerve Section Causes Brain Reaction. *World Neurosurg.* octubre de 2015;84(4):886-8.
176. Mohanty CB. Central Plasticity in Brachial Plexus Injury: A Neural Domino Effect. *World Neurosurg.* febrero de 2016;86:22-4.
177. Navarro X. Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:483-505.
178. Bahari Z, Sadr SS, Meftahi GH, Ghasemi M, Manaheji H, Mohammadi A, et al. Nerve Injury-Induced Plasticity in the Nociceptive Pathways. *Arch Neurosci [Internet].* 1 de julio de 2014 [citado 26 de junio de 2022];2(3). Disponible en: <https://brief.land/ans/articles/20514.html>
179. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol.* febrero de 2011;25(1):1-28.
180. Shurey S, Akelina Y, Legagneux J, Malzone G, Jiga L, Ghanem AM. The rat model in microsurgery education: classical exercises and new horizons. *Arch Plast Surg.* mayo de 2014;41(3):201-8.
181. Mandal J, Parija SC. Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol.* enero de 2013;3(1):4-6.

182. Pereira S, Tettamanti M. Ahimsa and alternatives -- the concept of the 4th R. The CPCSEA in India. *ALTEX*. 2005;22(1):3-6.
183. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods*. 30 de marzo de 2015;243:39-46.
184. Speck AE, Ilha J, do Espírito Santo CC, Aguiar AS, Dos Santos ARS, Swarowsky A. The IBB forelimb scale as a tool to assess functional recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Neurosci Methods*. 15 de abril de 2014;226:66-72.
185. Stößel M, Rehra L, Haastert-Talini K. Reflex-based grasping, skilled forelimb reaching, and electrodiagnostic evaluation for comprehensive analysis of functional recovery-The 7-mm rat median nerve gap repair model revisited. *Brain Behav*. octubre de 2017;7(10):e00813.
186. Cobianchi S, de Cruz J, Navarro X. Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain. *Exp Neurol*. mayo de 2014;255:1-11.
187. Gramsbergen A, IJkema-Paassen J, Meek MF. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. *Exp Neurol*. enero de 2000;161(1):183-93.
188. Navarro X, Udina E. Chapter 6: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part III-electrophysiological evaluation. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:105-26.
189. Chen X, Yin Y, Zhang T, Zhao Y, Yang Y, Yu X, et al. Ultrasound imaging of chitosan nerve conduits that bridge sciatic nerve defects in rats. *Neural Regen Res*. 15 de julio de 2014;9(14):1386-8.
190. Yu YL, Li HY, Zhang PX, Yin XF, Han N, Kou YH, et al. Comparison of commonly used retrograde tracers in rat spinal motor neurons. *Neural Regen Res*. octubre de 2015;10(10):1700-5.
191. Hayashi A, Moradzadeh A, Hunter DA, Kawamura DH, Puppala VK, Tung THH, et al. Retrograde labeling in peripheral nerve research: it is not all black and white. *J Reconstr Microsurg*. octubre de 2007;23(7):381-9.
192. Clavijo-Alvarez JA, Nguyen VT, Santiago LY, Doctor JS, Lee WPA, Marra KG. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plast Reconstr Surg*. mayo de 2007;119(6):1839-51.
193. Jolivald CG, Vu Y, Mizisin LM, Mizisin AP, Calcutt NA. Impaired prosaposin secretion during nerve regeneration in diabetic rats and protection of nerve regeneration by a prosaposin-derived peptide. *J Neuropathol Exp Neurol*. julio de 2008;67(7):702-10.
194. Khuong HT, Kumar R, Senjaya F, Grochmal J, Ivanovic A, Shakhbazau A, et al. Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Exp Neurol*. abril de 2014;254:168-79.

195. Alant JD de V, Kemp SWP, Khu KJOL, Kumar R, Webb AA, Midha R. Traumatic neuroma in continuity injury model in rodents. *J Neurotrauma*. 20 de mayo de 2012;29(8):1691-703.
196. Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Exp Neurol*. mayo de 2010;223(1):192-202.
197. Kumar TR, Larson M, Wang H, McDermott J, Bronshteyn I. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol*. 2009;590:335-62.
198. Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadanian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg*. octubre de 2004;20(7):533-44.
199. Unezaki S, Yoshii S, Mabuchi T, Saito A, Ito S. Effects of neurotrophic factors on nerve regeneration monitored by in vivo imaging in thy1-YFP transgenic mice. *J Neurosci Methods*. 15 de abril de 2009;178(2):308-15.
200. Bhat DI. Animal models for cerebral vasospasm: Where do we stand? *Neurol India*. octubre de 2017;65(5):1043-5.
201. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. septiembre de 1982;77(3):634-43.
202. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. enero de 1989;83(1):129-38.
203. Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Cornelissen M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res*. 15 de septiembre de 2014;9(18):1657-60.
204. Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Campos A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochem Cell Biol*. diciembre de 2011;136(6):709-17.
205. Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:81-103.
206. Carriel V, Garzón I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*. febrero de 2017;11(2):553-63.
207. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. mayo de 2000;25(1):25-9.
208. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2021;49(D1):D325-34.

209. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. diciembre de 2013;9(12):668-76.
210. Talac R, Friedman JA, Moore MJ, Lu L, Jabbari E, Windebank AJ, et al. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*. abril de 2004;25(9):1505-10.
211. Tos P, Ronchi G, Nicolino S, Audisio C, Raimondo S, Fornaro M, et al. Employment of the mouse median nerve model for the experimental assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods*. 30 de marzo de 2008;169(1):119-27.
212. Willemen HLD, Eijkelkamp N, Wang H, Dantzer R, Dorn GW, Kelley KW, et al. Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1beta-induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling. *Pain*. septiembre de 2010;150(3):550-60.
213. Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Willemen HLD, Deumens R, Joosten EAJ, Kleibeuker W, et al. GRK2: a novel cell-specific regulator of severity and duration of inflammatory pain. *J Neurosci*. 10 de febrero de 2010;30(6):2138-49.
214. Ronchi G, Raimondo S, Varejão ASP, Tos P, Perroteau I, Geuna S. Standardized crush injury of the mouse median nerve. *J Neurosci Methods*. 30 de abril de 2010;188(1):71-5.
215. Geuna S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides. *Neurol Res*. marzo de 2004;26(2):139-44.
216. Hsu SH, Chan SH, Chiang CM, Chen CCC, Jiang CF. Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model. *Biomaterials*. mayo de 2011;32(15):3764-75.
217. Gao H, You Y, Zhang G, Zhao F, Sha Z, Shen Y. The use of fiber-reinforced scaffolds cocultured with Schwann cells and vascular endothelial cells to repair rabbit sciatic nerve defect with vascularization. *Biomed Res Int*. 2013;2013:362918.
218. Vasudevan S, Yan JG, Zhang LL, Matloub HS, Cheng JJ. A rat model for long-gap peripheral nerve reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. octubre de 2013;132(4):871-6.
219. Konno K, Shiotani Y, Itano N, Ogawa T, Hatakeyama M, Shioya K, et al. Visible, safe and certain endotracheal intubation using endoscope system and inhalation anesthesia for rats. *J Vet Med Sci*. octubre de 2014;76(10):1375-81.
220. Greenfield EA. Administering Anesthesia to Mice, Rats, and Hamsters. *Cold Spring Harb Protoc*. 3 de junio de 2019;2019(6).
221. Cicero L, Fazzotta S, Palumbo VD, Cassata G, Lo Monte AI. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. *Acta Biomed*. 8 de octubre de 2018;89(3):337-42.
222. Knox CJ, Hohman MH, Kleiss IJ, Weinberg JS, Heaton JT, Hadlock TA. Facial nerve repair: Fibrin Adhesive Coaptation versus Epineurial Suture Repair in a Rodent Model. *Laryngoscope*. julio de 2013;123(7):1618-21.

223. Benfield C, Isaacs J, Mallu S, Kurtz C, Smith M. Comparison of Nylon Suture Versus 2 Fibrin Glue Products for Delayed Nerve Coaptation in an Animal Model. *J Hand Surg Am.* febrero de 2021;46(2):119-25.
224. Cruz NI, Debs N, Fiol RE. Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg.* septiembre de 1986;78(3):369-73.
225. Sames M, Blahos J, Rokyta R, Benes V. Comparison of microsurgical suture with fibrin glue connection of the sciatic nerve in rabbits. *Physiol Res.* 1997;46(4):303-6.
226. Moy OJ, Peimer CA, Koniuch MP, Howard C, Zielezny M, Katikaneni PR. Fibrin seal adhesive versus nonabsorbable microsuture in peripheral nerve repair. *J Hand Surg Am.* marzo de 1988;13(2):273-8.
227. Mokhtari P, Tayebi Meybodi A, Benet A, Lawton MT. Microvascular Anastomosis: Proposition of a Learning Curve. *Oper Neurosurg (Hagerstown).* 1 de febrero de 2019;16(2):211-6.
228. Xu X, Zhou X, Du J, Liu X, Qing L, Johnson BN, et al. Macrophage Activation in the Dorsal Root Ganglion in Rats Developing Autotomy after Peripheral Nerve Injury. *Int J Mol Sci.* 26 de noviembre de 2021;22(23):12801.
229. Kauppila T. Nerve resuturation decreases autotomy in the rat. *Exp Neurol.* enero de 1994;125(1):106-10.
230. Weber RA, Proctor WH, Warner MR, Verheyden CN. Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery.* 1993;14(5):323-7.
231. Yi H, Shin MJ, Cho SM, Lee DG, Cho K, Cho HJ, et al. Nonlinear toxicokinetics of enrofloxacin in rats. *Arch Pharm Res.* noviembre de 2010;33(11):1851-7.
232. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mayo de 2013;16(3):243-50.
233. Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* febrero de 2004;79(2):109-18.
234. Fitton AR, Berry MS, McGregor AD. Preservation of denervated muscle form and function by clenbuterol in a rat model of peripheral nerve injury. *J Hand Surg Br.* agosto de 2001;26(4):335-46.
235. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* agosto de 2014;35(24):6143-56.
236. di Summa PG, Kingham PJ, Campisi CC, Raffoul W, Kalbermatten DF. Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair. *Neurosci Lett.* 20 de junio de 2014;572:26-31.
237. Alvites RD, Branquinho MV, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Prada J, et al. Effects of Olfactory Mucosa Stem/Stromal Cell and Olfactory Ensheathing Cells Secretome on Peripheral Nerve Regeneration. *Biomolecules.* 11 de junio de 2022;12(6):818.

238. Wi H, Lee S, Kim Y, No JG, Lee P, Lee BR, et al. Immunosuppression-enhancing effect of the administration of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stem cells (cA-MSCs) compared with autologous cA-MSCs in vitro. *J Vet Sci.* septiembre de 2021;22(5):e63.
239. Sun DZ, Abelson B, Babbar P, Damaser MS. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology. *Nat Rev Urol.* junio de 2019;16(6):363-75.
240. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 26 de diciembre de 2020;12(12):1529-52.
241. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res.* abril de 2011;127(4):370-7.
242. Lórinicz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, Veres DS, Otrokocsi L, Kittel Á, et al. Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:25465.
243. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods.* septiembre de 2014;411:55-65.
244. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research.* 12 de mayo de 2017;120(10):1632-48.
245. Michaelis ML, Jiang L, Michaelis EK. Isolation of Synaptosomes, Synaptic Plasma Membranes, and Synaptic Junctional Complexes. *Methods Mol Biol.* 2017;1538:107-19.
246. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles.* 1 de diciembre de 2018;7(1):1535750.
247. López E, Marinaro F, de Pedro M de LÁ, Sánchez-Margallo FM, Gómez-Serrano M, Ponath V, et al. The Immunomodulatory Signature of Extracellular Vesicles From Cardiosphere-Derived Cells: A Proteomic and miRNA Profiling. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:321.
248. Bustamante JL, Arévalo RP, Lafata JM, Medina L, Herrera JM, Martin C. Estudio prospectivo de microcirugía experimental en neurorrafias con tensión. *Rev Argent Neuroc.* marzo de 2015;29(1):11-38.
249. DeLeonibus A, Rezaei M, Fahradyan V, Silver J, Rampazzo A, Bassiri Gharb B. A meta-analysis of functional outcomes in rat sciatic nerve injury models. *Microsurgery.* marzo de 2021;41(3):286-95.
250. Giusti G, Willems WF, Kremer T, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen). *J Bone Joint Surg Am.* 7 de marzo de 2012;94(5):410-7.

251. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods*. 30 de mayo de 2008;170(2):255-61.
252. Belkas JS, Munro CA, Shoichet MS, Johnston M, Midha R. Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials*. mayo de 2005;26(14):1741-9.
253. Hernández-Cortés P, Garrido J, Cámara M, Ravassa FO. Failed digital nerve reconstruction by foreign body reaction to Neurolac nerve conduit. *Microsurgery*. julio de 2010;30(5):414-6.
254. Olivé M, Ferrer I. Bcl-2 and bax immunohistochemistry in denervation-reinnervation and necrosis-regeneration of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve*. diciembre de 2000;23(12):1862-7.
255. El-Habta R, Andersson G, Kingham PJ, Backman LJ. Anti-apoptotic effect of adipose tissue-derived stromal vascular fraction in denervated rat muscle. *Stem Cell Res Ther*. 4 de marzo de 2021;12(1):162.
256. Liu C, Yin G, Sun Y, Lin Y, Xie Z, English AW, et al. Effect of exosomes from adipose-derived stem cells on the apoptosis of Schwann cells in peripheral nerve injury. *CNS Neurosci Ther*. 6 de julio de 2019;26(2):189-96.
257. Rbia N, Bulstra LF, Friedrich PF, Bishop AT, Nijhuis THJ, Shin AY. Gene expression and growth factor analysis in early nerve regeneration following segmental nerve defect reconstruction with a mesenchymal stromal cell-enhanced decellularized nerve allograft. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. enero de 2020;8(1):e2579.
258. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 1 de abril de 2014;23(7):741-54.
259. Yan W, Liu W, Qi J, Fang Q, Fan Z, Sun G, et al. A Three-Dimensional Culture System with Matrigel Promotes Purified Spiral Ganglion Neuron Survival and Function In Vitro. *Mol Neurobiol*. marzo de 2017;55(3):2070-84.
260. Liu L, Marti GP, Wei X, Zhang X, Zhang H, Liu YV, et al. Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J Cell Physiol*. noviembre de 2008;217(2):319-27.
261. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat*. noviembre de 2000;197(Pt 4):591-605.
262. Saio S, Konishi K, Hohjoh H, Tamura Y, Masutani T, Iddamalgoda A, et al. Extracellular Environment-Controlled Angiogenesis, and Potential Application for Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci*. 16 de octubre de 2021;22(20):11169.
263. Masgutov R, Zeinalova A, Bogov A, Masgutova G, Salafutdinov I, Garanina E, et al. Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of plasmid pBud-coVEGF165-coFGF2 into the intact rat sciatic nerve. *Neural Regen Res*. 25 de enero de 2021;16(9):1882-9.

264. Grothe C, Meisinger C, Claus P. In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia. *J Comp Neurol.* 4 de junio de 2001;434(3):342-57.
265. Cho Y, Shin JE, Ewan EE, Oh YM, Pita-Thomas W, Cavalli V. Activating injury-responsive genes with hypoxia enhances axon regeneration through neuronal HIF-1 α . *Neuron.* 18 de noviembre de 2015;88(4):720-34.
266. Carrasco DI, Bahr BA, Seburn KL, Pinter MJ. Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol.* abril de 2016;278:116-26.
267. Bizette C, Chan-Chi-Song P, Fontaine M, Tadie M. [Expression of mRNA, interleukin-1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha during regeneration of the sciatic nerve in rats after tissue loss]. *Chirurgie.* 1996;121(6):474-81.
268. Kuo HS, Tsai MJ, Huang MC, Chiu CW, Tsai CY, Lee MJ, et al. Acid fibroblast growth factor and peripheral nerve grafts regulate Th2 cytokine expression, macrophage activation, polyamine synthesis, and neurotrophin expression in transected rat spinal cords. *J Neurosci.* 16 de marzo de 2011;31(11):4137-47.
269. Haines VL. The ancient rat. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* enero de 2010;13(1):95-105.
270. Wu W, Chai H, Zhang J, Gu H, Xie Y, Zhou L. Delayed implantation of a peripheral nerve graft reduces motoneuron survival but does not affect regeneration following spinal root avulsion in adult rats. *J Neurotrauma.* agosto de 2004;21(8):1050-8.
271. Pan B, Liu Y, Yan JY, Wang Y, Yao X, Zhou HX, et al. Gene expression analysis at multiple time-points identifies key genes for nerve regeneration. *Muscle Nerve.* marzo de 2017;55(3):373-83.
272. Haastert-Talini K, Schmitte R, Korte N, Klode D, Ratzka A, Grothe C. Electrical stimulation accelerates axonal and functional peripheral nerve regeneration across long gaps. *J Neurotrauma.* abril de 2011;28(4):661-74.

12. TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS

12.1. Artículos científicos

- Blanco-Blázquez V, Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Torrescusa A, Vela FJ, Abellán E, Crisóstomo V. Swine Models of Aneurysmal Diseases for Training and Research. *J Vis Exp*. 2022 Mar 23;(181). doi: 10.3791/63616. PMID: 35404358.
- Martínez-Chacón G, Vela FJ, Campos JL, Abellán E, Yakhine-Diop SMS, Ballestín A. Autophagy modulation in animal models of corneal diseases: a systematic review. *Mol Cell Biochem*. 2020 Nov;474(1-2):41-55. doi: 10.1007/s11010-020-03832-5. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32710189.
- Vela FJ, Martínez-Chacón G, Ballestín A, Campos JL, Sánchez-Margallo FM, Abellán E. Animal models used to study direct peripheral nerve repair: a systematic review. *Neural Regen Res*. 2020 Mar;15(3):491-502. doi: 10.4103/1673-5374.266068. PMID: 31571661; PMCID: PMC6921335.
- Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Campos JL, Martínez-Chacón G, Bote J, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM. A Pre-clinical Rat Model for the Study of Ischemia-reperfusion Injury in Reconstructive Microsurgery. *J Vis Exp*. 2019 Nov 8;(153). doi: 10.3791/60292. PMID: 31762459.
- Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Usón A, López E, Marinaro F, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM. Ischemia-reperfusion injury in a rat microvascular skin free flap model: A histological, genetic, and blood flow study. *PLoS One*. 2018 Dec 27;13(12):e0209624. doi: 10.1371/journal.pone.0209624. PMID: 30589864; PMCID: PMC6307726.
- Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Usón A, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM. Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Skin Free Flap Model. *J Reconstr Microsurg*. 2018 Oct;34(8):601-609. doi: 10.1055/s-0038-1648246. Epub 2018 May 3. PMID: 29723883.

12.2. Abstracts publicados en revistas científicas indexadas en JCR

- Vela FJ, Ballestín A, Sánchez-Margallo FM, Abellán E. Mean blood flow of femoral and carotid arteries on rat using a flow meter before and after microsurgical anastomoses. *British Journal of Surgery*. 105 – S2, pp. 5-14. 06/2018.

12.3. Comunicaciones a congresos

- Campos JL, Vela FJ, Pires L, Jara JM, Abellán E. A systematic review on the suitability of large animals as secondary lymphedema experimental models. 11th Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery. Cancún 1-4 de junio de 2022.
- Campos JL, Vela FJ, Pires L, Jara JM, Pons G, Rodríguez E, Tom LK, Ballestín A, Masiá J, Abellán E. Animal model for training and research in vascularized lymph node transfer. 11th Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery. Cancún 1-4 de junio de 2022.
- Vela FJ. A preclinical view of peripheral nerve reconstructive microsurgery. XVIII Congreso de la Asociación Española de Microcirugía, AEM 2021. Cáceres 21-23 de octubre de 2021.
- Campos JL, Vela FJ, Pires L, Jara JM, Abellán E. Research Methodology: How to do a research Project in microsurgery. XVIII Congreso de la Asociación Española de Microcirugía, AEM 2021. Cáceres 21-23 de octubre de 2021.
- Vela FJ. DIRECT PERIPHERAL NERVE REPAIR ANIMAL MODELS: A SYSTEMATIC REVIEW OF NEW MILLENNIUM LITERATURE. 5th International Symposium on Peripheral Nerve Regeneration – ISPNR. Oporto 8-9 de julio de 2019.
- Vela FJ. A PRISMA® REVIEW ABOUT DIFFERENT TECHNIQUES OF DIRECT PERIPHERAL NERVE REPAIR. XVII Congreso Nacional de Microcirugía, AEM 2018. Sevilla 7-10 de noviembre de 2018.
- Ballestín A, Vela FJ. Magnificación óptica en microcirugía. 55^o Congreso de la SECOT (Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología). Valladolid 26-28 de septiembre de 2018.
- Ballestín A, Vela FJ. Microsurgery essentials. V International SCOI Congress. Bilbao 22-24 de febrero de 2018.
- Ballestín A, Abellán E, Casado JG, Vela FJ, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM. Usefulness of Transit Time Ultrasound Flowmetry to predict Long-Term Postoperative Microvascular Patency: Preclinical Study. Annual Meeting of the American Society for Reconstructive Microsurgery. Phoenix, Arizona, Estados Unidos de América 13-16 de enero de 2018.

- Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Blázquez R, Álvarez V, Usón A, Sánchez-Margallo FM. Use of Mesenchymal Stem Cells and Microvesicles to Reduce Ischemia-reperfusion Injury in a Rat Cutaneous Free Flap Model. Annual Meeting of the American Society for Reconstructive Microsurgery. Phoenix, Arizona, Estados Unidos de América 13-16 de enero de 2018.
- Vela FJ, Ballestín A, Sánchez-Margallo FM, Abellán E. Flujo medio de las arterias femoral y carótida de la rata usando equipo de medición de flujo antes y después de la anastomosis. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. Madrid 16-17 de octubre de 2017.
- Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Usón A, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM. Mesenchymal stem cells ameliorate ischemia-reperfusion injury in a rat fasciocutaneous flap model. 9th Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery. Seúl, Corea del sur 14-17 de junio de 2017.
- Ballestín A, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Blázquez R, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Microvesicles participating in intercellular communication: Potential novel therapeutic strategy to reduce ischemia-reperfusion injury in free flaps. 9th Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery. Seúl, Corea del sur 14-17 de junio de 2017.

12.4. Participación en proyectos de investigación

- “Efectividad de la terapia de células madre en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica canina como modelo translacional de la Enfermedad de Crohn”. IB-16133. Proyectos de Investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura. 12/06/2017-31/08/2020.

12.5. Experiencia docente y formadora

- Master’s Degree in Laboratory Animal Science and Welfare.

Profesor de Máster universitario de la Universidad Autònoma de Barcelona.

- International Master’s Degree in Reconstructive Microsurgery.

Profesor de Máster universitario de la Universidad Autònoma de Barcelona.

- Máster Oficial Universitario en Endoscopia y Cirugía de Mínima Invasión en Pequeños Animales.

Profesor de Máster universitario de la Universidad de Extremadura.

Evaluación de la reparación microquirúrgica del nervio periférico mediante el uso de conductos sintéticos y terapia celular en un modelo experimental

- Máster Oficial Universitario Cirugía de Mínima Invasión Urológica Avanzada.

Profesor de Máster universitario de la Universidad de Extremadura.

- Máster Universitario en Periodoncia.

Profesor de Máster universitario de la Universidad Complutense de Madrid.

- Máster Universitario en Cirugía Bucal, Implantología y Periodoncia.

Profesor de Máster universitario de la Universidad de Castilla y León

- Profesor y secretario técnico de cursos de Microcirugía celebrados en el CCMIJU durante el periodo de 2016-2022.